

## ***Listeria* spp., in churn storage of raw cow's milk in Tunja - Boyacá**

### ***Listeria* spp., en cantinas de almacenamiento de leche cruda de vaca en Tunja – Boyacá**

Eliana Urbano-Cáceres<sup>1\*</sup> M.Sc, Astrid Aguilera-Becerra<sup>1</sup> M-Sc,  
Claudia Jaimes-Bernal<sup>1</sup> M.Sc, Martín Pulido-Medellín<sup>2</sup> M.Sc.

<sup>1</sup>Universidad de Boyacá. Health Sciences Faculty. Bacteriology and Clinic laboratory research group. University campus. Cra 2ª Este N° 64-169. Tunja, Colombia. <sup>2</sup>Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Veterinary Medicine Program. GIDIMEVETZ research group. Avenida Central del Norte 39-115, 150003, Tunja, Colombia. \*Correspondence: [eliurbano@uniboyaca.edu.co](mailto:eliurbano@uniboyaca.edu.co)

Received: August 2017; Accepted: June 2018.

#### **ABSTRACT**

**Objective.** To determine the relationship between the type of detergent, time use of the churn and the type of water used to wash storage churns and the presence of *Listeria* spp., in samples collected from storage churns of raw cow's milk, in farms of Tunja-Boyacá-Colombia. **Materials and methods.** 293 samples were collected by non-probabilistic sampling at convenience, in a period of time of 9 months. Isolation of *Listeria* spp., was performed by microbiological methods and species identification using biochemical tests. A questionnaire was applied to assess the associated factors (the type of detergent, time use of the churn and the type of water used to wash storage churns). **Results.** The prevalence of *L. monocytogenes* was 2.7% (n=8). No statistically significant association was found between the variables related to cleaning of churns and the presence of *L. monocytogenes*. **Conclusions.** The existence of *L. monocytogenes* in raw milk was demonstrated, being the prevalence found lower than those reported in national and international studies. It is evidenced the circulation of species of *Listeria* in the dairy production chain in Boyacá. On the other hand, it is the first overview of *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* showing the need for the implementation of control measures in the dairy industry.

**Keywords:** Dairy products; food inspection; food safety; food storage; Gram-positive bacteria; (Source: DeCS).

#### **RESUMEN**

**Objetivo.** Determinar la relación entre el tipo de detergente, el tiempo de uso de la cantina y el tipo de agua utilizada para lavado de las cantinas y la presencia de *Listeria* spp., en muestras recolectadas a partir de cantinas de almacenamiento de leche cruda de vaca, en fincas del municipio de Tunja-Boyacá-Colombia. **Materiales y métodos.** Se recolectaron 293 muestras mediante muestreo no probabilístico a conveniencia, en un periodo de nueve meses. El aislamiento de *Listeria* spp., se realizó por métodos microbiológicos y la identificación de especies utilizando pruebas bioquímicas. Se aplicó

un cuestionario para evaluar los factores asociados (tipo de detergente, tipo de agua y tiempo de uso de las cantinas). **Resultados.** La prevalencia de *L. monocytogenes* fue de 2.7% (n=8). No se encontró asociación estadísticamente significativa entre las variables relacionadas con la limpieza de las cantinas y la presencia de *L. monocytogenes*. **Conclusiones.** Se demostró la existencia de *L. monocytogenes* en leche cruda, siendo la prevalencia encontrada inferior a las reportadas en estudios nacionales e internacionales. Se evidencia la circulación de especies de *Listeria* en la cadena productiva láctea del departamento de Boyacá. Por otra parte, es el primer panorama de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* mostrando la necesidad de la implementación de medidas de control en la industria láctea.

**Palabras clave:** Almacenamiento de alimento; bacterias Gram positivas; inocuidad de los alimentos; inspección de alimentos; productos lácteos (*Fuente: DeCS*).

## INTRODUCTION

Food security is an important characteristic for dairy customers; pasteurization protects the consumers from potential dangers when they consume raw milk, for instance foodborne diseases (1).

Listeriosis considered as a foodborne disease is caused by *Listeria monocytogenes*, from this disease numerous outbreaks have been reported (2) mainly caused by human contamination with *Listeria's* pathogenic strains, by consuming raw milk, derivatives or by the ingestion of processed contaminated food post-processing (3). The food cross contamination is produced due to the access of *L. monocytogenes* through the clothing, footwear, hands and the worker's tools, as well as through the equipments and materials used in their processing; mostly for the capacity that this bacteria has to develop biofilms on inert surfaces when the washing and disinfection process are unsuitable (4,5), being able to persist in the environment over long periods of time, for even more than 10 years.

To identify the source of contamination of raw milk with *Listeria spp.*, the storage tanks must be reviewed since the presence or absence of the bacteria in the milk might be determined by the farm's storage conditions and hygienic environments. Considering the above, the high consumption of raw milk, the low public health's reports of this pathogen in the state and the use of churns for the storage, this paper was raised with the objective of identifying the relationship between the type of detergent, the churn's use of time, and the type of water used to wash the churns and the presence of *Listeria spp.*, in collected samples from raw milk churns, in some farms of Tunja, Boyaca, Colombia.

## INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria es un atributo importante para los consumidores de leche cruda y sus derivados; la pasteurización protege a los consumidores de los peligros potenciales a los que se enfrentan cuando se consume leche cruda, como por ejemplo las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) (1).

La Listeriosis, considerada una ETA, es causada por *Listeria monocytogenes*, de la cual se han reportado numerosos brotes (2), originados principalmente por contaminación humana con cepas patógenas de *Listeria* por el consumo de leche cruda, derivados o por la ingestión de alimentos procesados contaminados post-proceso (3). La contaminación cruzada de alimentos se produce debido a que *L. monocytogenes* ingresa a través de la vestimenta, el calzado, las manos y utensilios de los operarios, así como también a través de los equipos y materiales utilizados en el procesamiento de los mismos, principalmente por la capacidad que tiene esta bacteria de desarrollar biopelículas sobre superficies inertes cuando el proceso de lavado y desinfección no es adecuado (4,5), pudiendo persistir en el ambiente durante largos períodos de tiempo, incluso más de 10 años.

Para identificar la fuente de contaminación de la leche cruda con *Listeria spp.*, se hace necesario revisar e inspeccionar los tanques de almacenamiento, puesto que las condiciones en las que estos se encuentran y los entornos higiénicos de la finca podrían determinar la presencia/ ausencia de la bacteria en las leches allí almacenadas. Considerando lo anterior y el alto consumo de leche cruda, la baja existencia de reportes de salud pública de este patógeno en el departamento y el uso de cantinas para el almacenamiento, se planteó desarrollar el presente trabajo, con el objetivo de determinar la relación entre el tipo de detergente, el tiempo de uso de la cantina y el tipo de agua utilizada para lavado de las cantinas y la presencia de *Listeria spp.*, en muestras recolectadas a partir

## MATERIALS AND METHODS

**Type of study.** It was developed a quantitative, descriptive and cross-sectional study.

**Sample.** The sample size calculated was 300, in total, 293 samples of raw cow's milk from the dairy livestock in Tunja. The 7 remaining samples were excluded due to the fact that they did not meet the conditions established by the protocol for the isolation of *Listeria* (insufficient volume, < 25ml). The collection was carried out between October 2014 and June 2015.

**Samples collection.** It was made under aseptic conditions directly from the storage churn of the farms included in the study; the churns were transported by means of refrigeration to the Universidad de Boyacá Microbiology Laboratory, where they were stored at 4°C until the processing. At the same time of the collection, a questionnaire was applied in order to inquire into the water, type of detergent and time that the churn is used.

**Laboratory methods.** The samples were processed in this way: A pre-enrichment was made, for which, 25 ml of sample were inoculated in 255 ml of enriched Fraser broth (Oxoid®), it was homogenized by shaking at 150 rpm during 2 minutes (Laboratory shaker incubator 10 - 500 rpm IKA - KS 4000) and they were incubated at 4°C for 15 days. After 15 days, they were spread in enriched PALCAM agar (Oxoid®) and they were incubated at 37°C during 24 hours, ending with their respective reading. For the processing of each batch, it was included both a negative control (pasteurized milk sample) and a positive control (*L. monocytogenes* ATCC 7744). The positive presumptive colonies were tested qualitatively by means of the immunological rapid test (Merck®) for detection of *Listeria monocytogenes* in food. When the rapid test was positive the presence of *Listeria* was confirmed by the following methods: Gram staining, mobility at 25°C catalase, hemolysis, rhamnase and xylose acid production, nitrate reduction; once the presence of *Listeria* was confirmed, the biochemical characterization was carried out by using the kit (Oxoid®), which allowed the identification of the different species of *Listeria*. The analysis of the questionnaires was done with the program SPSS® version 20.

**Ethical aspects.** Milk samples were collected with veterinary assistance. The investigation was approved by the Bioethics Committee at Universidad de Boyacá, according to the memo CB085 set in March, 2014.

de cantinas de almacenamiento de leche cruda de vaca, en fincas del municipio de Tunja-Boyacá-Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tipo de estudio.** Se ejecutó un estudio de tipo cuantitativo, descriptivo y transversal.

**Muestra.** El tamaño muestral calculado fue de 300, en total se analizaron 293 muestras de leche cruda de vaca, provenientes de los hatos lecheros del municipio de Tunja. Las 7 muestras restantes fueron excluidas dado que no cumplieron las condiciones establecidas en el protocolo para aislamiento de *Listeria* (volumen insuficiente, <25 ml). La recolección se realizó entre octubre de 2014 y junio de 2015.

**Recolección de muestras.** Se realizó en condiciones asépticas directamente de las cantinas de almacenamiento de las fincas incluidas en el estudio, fueron transportadas en refrigeración al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Boyacá, donde se almacenaron a 4°C hasta el momento del procesamiento. Al tiempo de realizar la recolección se aplicó un cuestionario para indagar respecto al tipo de agua, tipo de detergente y tiempo de uso de la cantina.

**Métodos de laboratorio.** Las muestras fueron procesadas así: se realizó un preenriquecimiento de la muestra, para lo cual se inocularon 25 ml de muestra en 225 ml de caldo Fraser (Oxoid®) enriquecido, se homogenizó por agitación a 150 rpm por 2 minutos (Incubadora agitador shaker de laboratorio 10 - 500 rpm IKA - KS 4000) y se incubaron a 4°C por 15 días. Posterior a los 15 días, se sembraron en agar PALCAM (Oxoid®) enriquecido, y fueron incubadas a 37°C por 24 horas, finalizando con la lectura de las mismas. Para el procesamiento de cada uno de los lotes se incluyó tanto un control negativo (muestra de leche pasteurizada), como control positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7744). A las colonias presuntivas positivas se les realizó detección cualitativa empleando el test rápido inmunológico (Merck®) para detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos. Cuando la prueba rápida fue positiva se confirmó la presencia de *Listeria* mediante los siguientes métodos: tinción de Gram, movilidad a 25°C, catalasa, hemólisis, producción de ácido de ramnosa y xilosa, reducción de nitrato; una vez se confirma la presencia de *Listeria* se procedió a la caracterización bioquímica con el uso del kit (Oxoid®), que permitió la identificación de las diferentes especies de *Listeria*. El análisis de los cuestionarios se realizó con el programa SPSS® versión 20.

## RESULTS

The prevalence of microorganisms isolated in the 293 samples analyzed was 32.76%, of which only 2.7%, which corresponds to *L. monocytogenes*, are important in public health. The 67.24%, that is 197 samples, were negative for microorganism as can be appreciated on table 1.

**Table 1.** Microorganisms isolated from storage churns of raw milk in Tunja-Boyacá

Isolated microorganisms	Frequency	Prevalence (%)
<i>Bacillus brevis</i>	3	1.02
<i>Bacillus megaterium</i>	11	3.75
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	15	5.12
<i>Enterococcus faecium</i>	8	2.73
<i>Enterococcus raffinosus</i>	2	0.68
<i>Enterococcus solitarius</i>	15	5.12
<i>Lactococcus lactis</i>	1	0.34
<i>Listeria grayi</i>	1	0.34
<i>Listeria ivanovii</i>	3	1.02
<i>Listeria monocytogenes</i>	8	2.73
<i>Listeria seeligeri</i>	21	7.17
<i>Listeria welshimeri</i>	3	1.02
<i>Streptococcus intermedius</i>	3	1.02
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	0.34
Negatives	197	67.24
<b>Total samples</b>	<b>293</b>	

Regarding to the type of component used for the cleaning, there is no difference in using a degreasing agent (51%) and a detergent one (49%). In terms of the type of detergent, from the 144 farms that reported using it, 75% (n=108) used alkaline detergent and 25% (n=36) acid detergent. On the other hand, when analyzing the period of use of the churns, it was found that 70% IC 95% (64.75% - 75.24%) of the respondents expressed that they were using the churns one year ago or less and 30% IC 95% (24.75% - 35.24%), declared that they were already using the same churns over a year. In the 35% (n=103) of the cases, the owners of the farms used aqueduct, a 10% (n=29) used treated water, but others employed rainwater 23% (n=67) or river/stream water, 32% (n= 94).

When analyzing the relationship between the detergent used for cleaning the churns ( $2=2.445$ ,  $p=0.118$ ), the period of use ( $2=0.224$ ,  $p=0.636$ ), the type of water ( $2=0.087$ ,  $p=0.767$ ) and the presence of the micro-organism, any statistically significant association was found as can be seen on table 2.

**Aspectos éticos.** Las muestras de leche fueron recogidas con asistencia veterinaria. La investigación fue aprobada por el Comité de Bioética de la Universidad de Boyacá, según memorando CB085.

## RESULTADOS

La prevalencia de microorganismos aislados en las 293 muestras analizadas fue del 32.76%, de los cuales, revisten importancia en salud pública únicamente el 2.7%, que corresponde a *L. monocytogenes*. El 67.24%, es decir 197 muestras, fueron negativas para microorganismos como se puede apreciar en la tabla 1.

Respecto al tipo de agente utilizado para la limpieza, no se observa diferencia entre el uso de desengrasante (51%) y el de detergente (49%). En cuanto a la clase de detergente, de las 144 fincas que reportaron usarlo, el 75% (n=108) usaban detergente alcalino y el 25% (n=36) detergente ácido. Por otra parte, al analizar el tiempo de uso de las cantinas, se encontró que el 70% IC 95% (64.75% - 75.24%) de las personas encuestadas manifestaron que las estaban usando desde hace un año o menos y un 30% IC 95% (24.75% - 35.24%), refieren que ya llevaban con las mismas cantinas un año. Los dueños de las fincas usaban agua de acueducto en un 35% (n=103) de los casos, agua tratada en un 10% (n=29), otros en cambio utilizaban agua lluvia 23% (n=67) o agua de río o quebrada, 32% (n=94).

Al realizar el análisis de relación entre el tipo de detergente utilizado para el lavado de las cantinas ( $2=2.445$ ,  $p=0.118$ ), el tiempo de uso ( $2=0.224$ ,  $p=0.636$ ), el tipo de agua ( $2=0.087$ ,  $p=0.767$ ) y la presencia del microorganismo, no se halló ninguna asociación estadísticamente significativa, como se observa en la tabla 2.

## DISCUSIÓN

El aislamiento de *Listeria* spp., a partir de muestras de diferentes orígenes, en ocasiones suele ser dispendiosa y difícil, dado que tiene un crecimiento lento y además existen múltiples factores que inhiben su crecimiento, entre ellos, alta contaminación microbiana en leches, presencia de residuos de sustancias químicas e inhibidores especialmente liberados por la microbiota autóctona presente en las muestras analizadas (6). Dentro de los géneros que hacen parte de esta microbiota se encuentran: *Enterococcus* y *Lactobacillus*, que interfieren

**Table 2.** Factors related to the use of churns versus positivity for *Listeria monocytogenes*.

Variable		PL		IC (95%)	Total	c <sup>2</sup> Fisher	Value p	OR - IC
		+	-					
Type of detergent	Degreasing	2	147	45.27% - 56.72%	149 (51%)	2.445	0.118	0.293 (0.056 - 1.526)
	Detergent*	6	138	43.27% - 54.72%	144 (49%)			
Time of use of the churns	Less than or equal to one year	5	200	64.75% - 75.24%	205 (70%)	0.224	0.636	0.692 (0.154 - 3.103)
	Greater than one year	3	85	24.75% - 35.24%	88 (30%)			
Time of water used to wash the churns	Treated or aqueduct water	4	128	39.30% - 50.69%	132 (45%)	0.087	0.767	1.244 (0.293 - 5.280)
	Rain or river water	4	157	49.30% - 60.69%	161 (55%)			

\*Alkaline or acid; PL=Presence of *Listeria monocytogenes*;

## DISCUSSION

Isolation of *Listeria* spp., from samples of different origins, sometimes could be extensive and difficult, since it grows slowly and there are different factors that disable its growing, among them, a high level of milk microbial contamination, a presence of residual of chemical substances and inhibitors specifically released by the autochthonous microbiota present in the samples analyzed. Within the genres that are part of this microbiota are: *Enterococcus* and *Lactobacillus*, which interfere during the phase in which the enrichment broth *Listeria* is used for its recovery, inhibiting its growth competitiveness (6). Likewise, the *L. monocytogenes* usually appears in the milk and the derivatives on the low concentrations (6). In this study, microbiota was also isolated, specially the bacteria from the *Enterococcus* (Table 1), a factor that is possibly the cause of the low prevalence of this.

Since the last century and up to this date, no study has been conducted whose research object lies in determining the relationship between the use of detergents and the presence of *L. monocytogenes*. A pilot study was conducted in 1989 to test the efficiency of several disinfectants or detergents against three strains of *L. monocytogenes* and one strain of *L. innocua* using water and raw milk, and synergistic effects were observed between the active agents and the matrix. It was evident that products containing iodine, peroxide or quaternary ammonium as active agents demonstrated to be efficient, even at relatively low concentrations (7).

In a research carried out in three farms where the presence of the bacterium was evidenced, it was possible to control its growth by continuously washing the churns with an alkaline detergent (8).

Several sanitizing and disinfecting agents used in the food industry have demonstrated to be effective against *L. monocytogenes* cells in

durante la fase en la cual se utiliza el caldo de enriquecimiento *Listeria* para su recuperación, inhibiendo su crecimiento por competitividad (6). Asimismo, *L. monocytogenes* usualmente está presente en la leche y en los derivados en bajas concentraciones (6). En el presente estudio, también se aisló microbiota, especialmente bacterias del género *Enterococcus* (Tabla 1), factor que posiblemente es el causante de la baja prevalencia de esta.

Hasta el momento y desde el siglo pasado no se han realizado estudios cuyo objeto de investigación esté enfocado a determinar la relación entre el uso de detergentes y la presencia de *L. monocytogenes*. Para el año 1989, un estudio piloto fue realizado con el fin de probar la eficiencia de varios desinfectantes o detergentes contra tres cepas de *L. monocytogenes* y una cepa de *L. innocua*, utilizando agua y leche cruda, y se observaron efectos sinérgicos entre los agentes activos y la matriz. Evidenciaron que los productos que contienen yodo, peróxido o de amonio cuaternario como agentes activos mostraron ser eficientes, incluso a concentraciones relativamente bajas (7).

En una investigación realizada en tres fincas donde se evidenció la presencia de la bacteria se logró controlar el crecimiento de la misma lavando continuamente las cantinas con detergente alcalino (8).

Se ha demostrado que varios de los agentes sanitizantes y desinfectantes empleados en la industria de alimentos son efectivos contra células de *L. monocytogenes* en suspensión; sin embargo, la formación de biopelículas sobre las superficies y la presencia de materia orgánica en estas disminuye la eficacia de los desinfectantes (9,10).

Un factor relacionado con el tiempo de uso de la cantina es la formación de biopelículas. Al respecto, la literatura menciona que uno de los principales problemas en la industria alimentaria está representado por la supervivencia de



suspension. However, the formation of biofilms on surfaces and the presence of organic matter in them reduces the effectiveness of disinfectants (9,10).

The time of use of the churn is a factor related to the formation of biofilms. In this regard, the literature mentions that one of the main problems in the food industry is the survival of pathogenic or altering microorganisms derived from insufficient disinfection of surfaces or instruments in contact with food (11).

The presence of biofilms in pipes, equipment and materials is a very common issue because they can be formed on any surface, including plastic, glass, wood, metal and food. Since these formations may contain pathogenic microorganisms and have a higher resistance to disinfection, probabilities of product contamination increase and thus, the risk of food infections; for this reason, the presence of biofilms in the contact surfaces of the food industry constitutes an obvious risk to human health (12).

In the storage tanks, as well as in the raw milk production devices without sufficient cleaning have origin the microbial community, some of these bacteria are able to generate biofilms that allow the growth of pathogens like *L. monocytogenes*, which can cause continuous contamination of food processing plants. In the year 2013, Weiler *et al.*, analyzed different strains of *L. monocytogenes* found in raw milk, which were biofilm forming, they also analyzed their stage of formation evidenced the time of use of milk production and storage devices (13). This becomes a critical point for the dairy industry; bearing in mind that the quality of the milk offered depends directly on the product that is originally obtained, this means that the quality of the product offered to the consumer is conditioned to the control applied to the raw milk that is obtained in farms (14).

To conclude, the prevalence obtained (2.7%) in the study from the analysis of raw cow milk stored in churns evidences the presence of the microorganism where it was found not only the species *L. monocytogenes* but also other species of *Listeria*. In this paper, no association between the type of detergent used, the time of use of the churn and the type of water used to wash the churns regarding the presence of *L. monocytogenes* was found. The results of this study prove that the microbiological quality of the milk produced in the dairy strip of Tunja is not what it was expected, which is probably directly related to the food security, since raw milk is the raw material for dairy products such as cheese and yogurt.

microorganismos patógenos o alterantes debido a una desinfección insuficiente de las superficies o de los instrumentos en contacto con los alimentos (11).

Es muy común la presencia de biopelículas en conducciones, equipos y materiales ya que pueden formarse en cualquier tipo de superficie, incluyendo plástico, cristal, madera, metal y sobre los alimentos. Dado que estas formaciones pueden contener microorganismos patógenos y presentan una mayor resistencia a la desinfección, se incrementan las probabilidades de contaminación del producto y de provocar infecciones alimentarias, razón por la que se considera que la presencia de biopelículas en las superficies de contacto de la industria alimentaria constituye un evidente riesgo para la salud (12).

En los tanques de almacenamiento, así como en los dispositivos de producción de leche cruda sin suficiente limpieza se origina la aparición de comunidad microbiana, algunas de estas bacterias tienen la capacidad de generar biopelículas que permiten el crecimiento de agentes patógenos como *L. monocytogenes*, que pueden causar una contaminación continua de las plantas de procesamiento de alimentos. En el año 2013 Weiler *et al* (13) analizaron diferentes cepas de *L. monocytogenes* que se encontraban en leche cruda, las cuales eran formadoras de biopelículas y analizaron la etapa de formación de las mismas evidenciado el tiempo de uso de los dispositivos de producción y almacenamiento de leche.

Esto se convierte en un punto crítico para la industria láctea; teniendo claro que la calidad de la leche que se ofrece depende directamente del producto que se obtiene originalmente, es así pues que la calidad del producto que llega al consumidor se debe al control que se realice a la leche cruda que se obtiene en cada finca (14).

En conclusión, la prevalencia obtenida (2.7%) en el estudio a partir del análisis de leche cruda de vaca almacenada en cantina evidencia la presencia del microorganismo encontrándose no sólo la especie de *L. monocytogenes* sino otras especies de *Listeria*. En el presente estudio no se encontró asociación entre el tipo de detergente utilizado, el tiempo de uso de la cantina y el tipo de agua utilizada para el lavado de las mismas frente a la presencia de *L. monocytogenes*. Los resultados de este estudio evidencian que la calidad microbiológica de la leche producida en el cordón lechero de Tunja no es la esperada, lo cual probablemente está directamente relacionada con la seguridad alimentaria; puesto que la leche cruda es la materia prima para productos lácteos tales como el queso y el yogurt.

Some limitations were displayed in this document in relation with the sample size and some further studies are suggested to be done determining the presence of the microorganism directly from the nipple.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgements

The authors thank the Rectory of the University of Boyacá and the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of the Pedagogical and Technological University of Colombia for financial support.

En el presente trabajo se presentaron limitaciones en relación con el tamaño muestral y se sugiere realizar estudios futuros determinando la presencia del microorganismo directamente del pezón o del cuarto.

#### Conflicto de intereses

Los autores del presente estudio declaramos que no existe conflicto de intereses

#### Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Rectoría de la Universidad de Boyacá y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, por el apoyo financiero.

## REFERENCES

- Latorre A, Van Kessel J, Karns J, Zurakowski M, Pradhan A, Boor K, et al. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J Dairy Sci*. 2010; 93(6):2792-802.
- Lepe JA, Torres MJ, Liró J, Luque R, Aznar J. Caracterización microbiológica de los aislados de *Listeria monocytogenes* procedentes de casos humanos en Andalucía. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012; 30(10):602-7.
- Gallegos J, Arrieta G, Máttar S, Poutou R, Trespalacios A, Carrascal A. Frequency of *Listeria* spp. in coastal Colombian cheeses. *Rev MVZ Cordoba*. 2007; 12(2):996-1012.
- Camacho AC, Contreras YA, Torres PS. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche de vaca expendida en el municipio de Pamplona, Colombia. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 2007; 5(2):49-57.
- Schobitz R, Ciampi L, Nahuelquin Y. *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur*. 2009; 37(1):1-8.
- Nero LA, de Mattos MR, Barros MdAF, Beloti V, de Melo Franco BDG. Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection. *Microbiol Res*. 2009; 164(5):529-35.
- Cordier J, Putallaz T, Cox L. Impedimetric determination of activity of disinfectants and detergents on *Listeria*: preliminary study. *Int J Food Microbiol*. 1989; 8(3):293-7.
- Yoshida T, Kato Y, Sato M, Hirai K. Sources and routes of contamination of raw milk with *Listeria monocytogenes* and its control. *J Vet Med Sci*. 1998; 60(10):1165-8.
- Aarnisalo K, Lundén J, Korkeala H, Wirtanen G. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. *LWT-Food Sci Technol*. 2007; 40(6):1041-8.
- Kastbjerg VG, Gram L. Model systems allowing quantification of sensitivity to disinfectants and comparison of disinfectant susceptibility of persistent and presumed nonpersistent *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol*. 2009; 106(5):1667-81.
- Meloni D. Presence of *Listeria monocytogenes* in Mediterranean-Style Dry Fermented Sausages. *Foods*. 2015; 4(1):34-50.
- Simões M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Sci Technol*. 2010; 43(4):573-83.
- Weiler C, Ifland A, Naumann A, Kleta S, Noll M. Incorporation of *Listeria monocytogenes* strains in raw milk biofilms. *Int J Food Microbiol*. 2013; 161(2):61-8.
- Vásquez FCM, Martínez GR, Mancera VMM, Ávila LEO, Vargas MR. Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (departamento de Boyacá). *Revista de Medicina Veterinaria*. 2007; 14:61-83.