



ESTUDIO EN EL ECUADOR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL CONTEO TOTAL DE BACTERIAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LECHE CRUDA BOVINA

A STUDY IN ECUADOR OF THE CALIBRATION CURVE FOR TOTAL BACTERIAL COUNT BY FLOW CYTOMETRY OF RAW BOVINE MILK

Rocio Contero¹, Elena Liceth Aquino¹, Paola Elizabeth Simbaña¹, Connie Gallardo² y Rachel Bueno²

¹ Dairy Research Group, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.

² Department of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidad Científica del Sur, Perú

³ Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, Brazil

*Autor para correspondencia: rcontero@ups.edu.ec

Manuscrito recibido el 24 de diciembre de 2018. Aceptado, tras revisión, el 26 de febrero de 2019. Publicado el 1 de marzo de 2019.

Resumen

El análisis del conteo total de bacterias (CBT) como parámetro de la calidad higiénica en leche cruda es uno de los más requeridos mundialmente por las industrias y entidades de vigilancia de la inocuidad de alimentos. Este análisis se realiza tradicionalmente por el método referencial del conteo en placas expresado en UFC/mL, sin embargo, el método alternativo por citometría de flujo actualmente, se muestra como un método confiable y más rápido, que permite determinar las poblaciones bacterianas a través del Conteo Individual de Bacterias (IBC/ml). El objetivo del presente estudio fue determinar la ecuación de regresión y correlación entre ambos métodos debido a que éstos pueden variar en cada país en función de las actividades de manejo del ganado durante el ordeño. Para su evaluación en Ecuador, fueron utilizadas 357 muestras de leche con rangos entre 100000 a 1,5 millones de UFC/mL provenientes de dos pisos altitudinales: Zona 1 (Z1) (> 3000 msnm) y Zona 2 (Z2) (1050 msnm). Los análisis fueron realizados bajo ambos métodos simultáneamente, (máximo de desviación de ± 1 h) y siguiendo las recomendaciones de la IDF/ISO-196 y la norma AOAC 986,33. Los resultados mostraron una alta correlación entre los métodos ($r = 0,91$) y al no encontrar diferencias estadísticas significativas para el efecto de las zonas (Z1 y Z2), el mismo no fue considerado, sugiriendo el uso de una única ecuación de regresión lineal.

Palabras clave: CBT, IBC, Bactoscan, citometría, calidad de leche.

Abstract

The total bacteria count (TBC) analysis, as a parameter of hygienic quality in raw milk, is one of the most requested analysis by dairy industries and food safety organizations. This analysis is done by the reference method of plate count expressed as colony-forming unit per milliliter (CFU/mL). However, the alternative method by flow cytometry currently is a reliable and faster method than the reference method of Individual Bacteria Count per milliliter (IBC/mL). The aim of the study was to determine the linear regression equation and correlation between the reference method and the alternative method by flow cytometry. Because the activities of livestock management during milking are different in each country, a total of 357 milk samples with a range from 100000 to 1,5 millions of UFC/mL from two altitudinal floors: Z1 (> 3000 masl) and Z2 (1050 masl) were done in Ecuador. Both methods were analyzed at the same time, (maximum deviation of ± 1 h), following the recommendations of the *IDF/ISO* – 196 and the *AOAC* 986.33 standard. The results showed a high correlation between the two methods ($r = 0,91$) and since there were no statistic differences for the effect of Zones 1 and 2, it was not considered, suggesting the use of a unique linear regression equation.

Keywords: CBT, IBC, Bactoscan, cytometry, quality milk.

Forma sugerida de citar: Contero, R., Aquino, E.L., Simbaña, P.E., Gallardo, C. y Bueno, R. (2019). Estudio en el Ecuador de la curva de calibración para el conteo total de bacterias por citometría de flujo de leche cruda bovina. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. Vol. 29(1):97-104. <http://doi.org/10.17163/lgr.n29.2019.08>.

IDs Orcid:

Rocio Contero: <https://orcid.org/0000-0001-5335-1283>

Elena Liceth Aquino: <https://orcid.org/0000-0003-2827-5674>

Paola Elizabeth Simbaña: <https://orcid.org/0000-0002-8977-455X>

Connie Gallardo: <https://orcid.org/0000-0002-8070-8767>

Rachel Bueno: <https://orcid.org/0000-0002-0555-1480>

1 Introducción

La producción de leche bovina tiene una función importante en el ámbito económico y social del Ecuador. El incremento en la producción en los últimos 15 años se ha visto favorecida, entre otros factores, por el establecimiento de industrias con nuevas tecnologías, formación de asociaciones de productores y diferentes posibilidades de financiamiento (Cuenca, 2015; CEPAL, 2017). Actualmente, la producción total del país se estima en 5,5 millones de litros de leche por día, con el 73 % proveniente de la región central del país (INEC, 2014) y su principal destino es el abastecimiento del mercado interno.

La leche, por su composición nutricional, destaca como un alimento completo que contiene proteínas, vitaminas, lípidos y minerales con beneficios biológicos importantes en la etapa de crecimiento y en el mantenimiento óseo del cuerpo (Micinski, 2013; Pereira, 2014). La globalización se presenta como el principal responsable para el aumento del consumo de leche y derivados, influenciado por cambios en los patrones alimenticios, el crecimiento poblacional y la prioridad de la sociedad actual, de disponer de alimentos nutritivos y sanos (Primary Industries, 2015; CEPAL, 2017). En países de América Latina se tiene una previsión de aumento del consumo del 1,6 % para leche fluida y 2,8 % para otros derivados lácteos (Hoddinott, Headey y Dereje, 2015; CEPAL, 2017).

Ecuador ofrece un gran potencial para expandir la oferta de alimentos pecuarios como leche y derivados debido a sus recursos naturales (Requielme y Bonifaz, 2012; Cuenca, 2015) y el control de la calidad esencial para garantizar la inocuidad de los alimentos comercializados. Siguiendo la recomendación de organismos internacionales, las entidades vinculadas al control de la salud pública en el Ecuador, han establecido normativas de vigilancia en todas las etapas de producción de la leche, desde la producción, ordeño, procesamiento hasta que llegue al consumidor (FAO e IDF, 2011; INEN, 2012; MAGAP, 2008; MAGAP, 2013).

El conteo total de bacterias (CTB) es el método más utilizado para caracterizar la calidad microbiológica o población de bacterias en los alimentos. El método no diferencia los tipos de bacterias, pero es útil para obtener una información general de la higiene de los productos y las condiciones del proceso (Silva, 2010; Sampaio, 2015).

Para su producción, la industria requiere leche con

conteos bacteriales bajos alrededor de 100000 a 300 000 UFC/ml (Belli, 2013; Botaro, Gameiro y Santos, 2013; MAGAP, 2013), dado que algunas esporas, enzimas y metabolitos bacteriales pueden sobrevivir a procesos térmicos y afectar las características sensoriales de los productos alimenticios como el sabor, textura o reducción de su vida útil (Barbano, Ma y Santos, 2006; Silva, 2010; Gopal, 2015). Además, los altos conteos de bacterias en leche cruda pueden ser alertas de deficiencias en la higiene y desinfección en las áreas de producción y procedimientos de ordeño, en materiales o equipos; así como errores en el control de la temperatura de almacenamiento y la calidad microbiológica del agua utilizada, entre otras (Matsubara, 2011; Ruiz-Cortés y col., 2012; Almeida, 2016; Reyes, 2017).

El conteo en placas microbiológicas es el método de referencia para el análisis del CTB. Su resultado se expresa como unidad formadora de colonias (UFC/mL) y determina la cantidad de bacterias mesófilas presentes en la leche cruda. A pesar de la importancia del análisis para la industria láctea resulta poco práctico, teniendo en cuenta que los resultados se obtienen a las 48 horas de incubada la muestra (Silva, 2010; Cassoli, 2016).

La búsqueda de métodos analíticos alternativos que simplifiquen los procedimientos de laboratorio y aceleren la entrega de resultados ha exigido el desarrollo de tecnologías confiables como la citometría de flujo, la cual permite el conteo de poblaciones bacterianas a través del Conteo Individual de Bacterias (IBC/mL) basadas en la dispersión de luz y fluorescencia de un marcador de ADN bacterial. La citometría de flujo tiene, además, la ventaja de que no requiere la preparación de medios de cultivo, reduciendo la manipulación de muestras de leche y el tiempo de entrega de resultados (Evangelista, 2008; Araujo, 2009. Silva, 2010; Jatobá, 2014; Numthuan, 2017). Este método electrónico es utilizado en el equipo Bactoscan (Foss Analytical Instruments).

El uso de métodos analíticos alternativos requiere el estudio comparativo con métodos referenciales, al igual que la definición de una ecuación de regresión lineal. En países de la Unión Europea, para la aplicación de este método se ha adoptado una sola ecuación de conversión por convención, pero en otros países, como los de América del Sur, se utiliza una ecuación por cada nación (Botaro, Gameiro y Santos, 2013; Cassoli, 2016).

También las regulaciones para los límites máximos permisibles de CBT en leche cruda son diferentes

en cada país. Así, en la Unión Europea los valores oscilan entre 100 000 a 500 000 UFC /ml, imponiéndose penalizaciones económicas para leches con conteos superiores (Botaro, Gameiro y Santos, 2013). En el Ecuador, desde el año 2008, el gobierno determinó los requisitos técnicos para el pago por calidad de leche cruda, donde estableció la necesidad de realizar análisis de laboratorio de la materia prima del conteo total de bacterias, antes que pueda ser comercializada y procesada en la industria (INEN, 2012; MAGAP, 2013).

El objetivo del presente estudio fue determinar la ecuación de regresión lineal y correlación entre el método de referencia por conteo en placas expresado en UFC/mL y la técnica de citometría de flujo expresada en IBC/mL, para la determinación del conteo total de bacterias (CBT) en leche cruda, que permita establecer la curva de calibración entre ambos métodos para la evaluación de la calidad microbiológica de leche cruda bovina en el Ecuador.

2 Materiales y métodos

2.1 Recolección de muestras

Se colectaron 357 muestras de leche para este estudio, entre los años 2013 y 2014, en los meses de enero, febrero, marzo, mayo, septiembre, octubre, noviembre y diciembre. Las muestras fueron colectadas de tanques de refrigeración de productores organizados (49%) y de tanques de refrigeración de productores individuales (51%).

Todos los productores de leche estaban localizados en la región central del país, en el sector de la provincia del Pichincha (0°5'14" N y 78°6'12" O); dentro de esta región fueron considerados dos pisos altitudinales, uno en Cayambe (Z1), ubicado a > 3000 msnm, y otro en San Miguel de los Bancos (Z2), a 1050 msnm. Z1 presentó una temperatura anual promedio entre 8 – 15°C y una humedad relativa del 65%; y Z2 presentó una temperatura promedio de 18 – 24°C y una humedad relativa del 85% (Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica-SIG-Universidad Salesiana Ecuador, 2018).

Durante la colecta de muestras de leche se siguieron los procedimientos de referencia, utilizando frascos estériles de 50ml y conservante Azidiol. Las muestras fueron transportadas en refrigeración a 4 – 7°C al Laboratorio de Calidad de Leche de la Universidad Politécnica Salesiana.

2.2 Análisis de laboratorio

El conteo en placa fue realizado de acuerdo con el procedimiento de referencia del Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización y la Organización Internacional de Estandarización (INEN y ISO, 2014), utilizando 1ml de muestra de leche (previa homogenización) diluido en 9ml de agua estéril peptonada al 0,1% con diluciones seriadas (10 – 1 a 10 – 5). Finalmente, 1000µl fueron sembrados en placas Petrifilm para conteos de aerobios (3 M, Saint Paul, MN, USA) por duplicado e incubados a 32°C (±1°C) × 48 h (± 3 h) según referencia de AOAC 986.33 para productos lácteos. Para el resultado total fueron seleccionadas placas que tenían entre 25 a 250 colonias de bacterias. Los resultados están expresados como UFC/mL (Cassoli, 2007; Silva, 2010). Todas las muestras fueron analizadas dentro del período de las 48 h de realizada la colecta (INEN, 2006; Cassoli, 2016) y por ambos métodos, analizados al mismo tiempo (máximo de desviación de ±1 h) según la norma IDF/ISO-196.

El método alternativo por análisis del IBC fue realizado utilizando la citometría de flujo, con equipo Bactoscan FC (Foss Analytical Instruments) con capacidad de análisis de 50 muestras/hora. Su principio analítico se basa en la adición de bromuro de etidio (una sustancia colorante) que se intercala en el ADN y ARN bacterial. La muestra inyectada pasa a través de una cámara de flujo donde el sistema óptico detecta partículas teñidas por emisión de fluorescencia. Además de la sustancia colorante, se requiere una solución tampón (buffer) con enzimas proteolíticas. La intensidad y la altura de la emisión de fluorescencia son los parámetros selectivos para la identificación de las bacterias de interés. Los resultados fueron expresados en IBC/ml (Jatobá, 2014; Numthum, 2017).

2.3 Análisis estadístico

En el análisis estadístico fue utilizado el programa SAS versión 9.3 (Statistical Analysis System). Para la verificación de la distribución normal de los datos todos los resultados, tanto de UFC/mL como IBC/mL, fueron transformados en logaritmos de base 10. La regresión lineal fue evaluada para verificar la correlación entre el método referencial y el método alternativo. El método de referencia fue considerado como variable dependiente y el método alternativo por citometría de flujo como variable independiente. El modelo lineal propuesto fue

$Y = ax + b$. Donde Y es la variable dependiente en \log (UFC), x es la variable independiente en \log (IBC), a es la pendiente de la curva, b el intercepto o coeficiente lineal. Adicionalmente, debido a las

diferencias en las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa, los resultados de las zonas Z1 y Z2 fueron analizados por separado.

Tabla 1. Distribución de las muestras de leche de acuerdo con los niveles de conteo total de bacterias. n indica el número de muestras.

Clasificación	Conteo total de bacterias (UFC/ml)	n	%
Bajo	< 100000	233	65,3
Medio	100000 – 500000	68	19,1
Alto	500000 – 1'000000	35	9,8
Muy alto	> 1'000000	21	5,9

3 Resultados y Discusión

Para este estudio, la distribución de muestras de mesófilos aerobios se presenta en la Tabla 1. De un total de 357 muestras de leche analizadas, 34,7% indicaron presencia de bacterias entre los rangos de clasificación de medio a muy alto. El 65,3% correspondió a rangos menores a los 100000 UFC/ml. Las muestras provinieron de ganado con un mayor porcentaje de vacas Holstein, Brown Swiss y Jersey presentes en las zonas evaluadas (Requelme y Bonifaz, 2012) y para cada una de ellas fue analizada la

correlación y ecuación de regresión lineal.

$$\text{Zona 1: } \log(UFC) = \log(IBC) * 1,08135 + 1,2798 \quad (1)$$

$$\text{Zona 2: } \log(UFC) = \log(IBC) * 0,9764 + 0,7836 \quad (2)$$

En la Figura 1 se muestra el análisis de regresión para el método alternativo expresado en $\log(UFC)$ frente al método alternativo $\log(IBC)$ para cada zona investigada; 80% ($n = 286$) de las muestras analizadas correspondieron a Z1 y 20% ($n = 71$) a Z2.

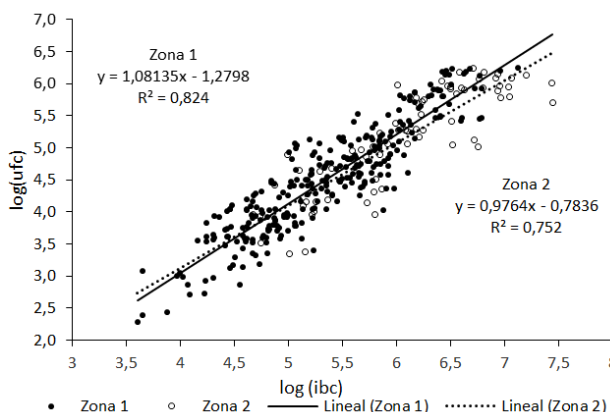


Figura 1. Distribución y línea de regresión en $\log(IBC/mL)$ y $\log(UFC/mL)$ para la zona 1 y zona 2.

En el análisis de residuos no se encontraron muestras consideradas atípicas en la población de estudio, ni patrones que indicasen heterogeneidad

de diferencia. Con referencia al coeficiente de variación que sugiere la calidad de los datos, los resultados obtenidos en este estudio fueron inferiores al

10%, sugiriendo que los métodos son reproducibles y confiables para el análisis microbiológico realizado (Sampaio, 2015). La probabilidad de que los conteos en cada una de las técnicas tengan un nivel de significación del 95% se determinó con el valor de p ; se concluyó que no había diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las técnicas en estudio.

El efecto de las zonas Z1 y Z2 no fue considerado en el método de análisis debido a que las diferencias observadas no fueron significativas estadísticamente (Figura 2). Así, fue definida una única ecuación: $\log(UFC) = \log(IBC) * 1,03466 - 1,05124$.

Los estudios realizados por Cassoli, (2007) indicaron la importancia de considerar la citometría de flujo como método alternativo para el conteo de bacterias en leche y la determinación de la calidad higiénica en la leche cruda antes de su comercialización. Un conteo elevado de microorganismos mesó-

filos aeróbicos puede estar relacionado con diferentes fuentes de contaminación al momento del ordeño y transporte de la leche, así como con variaciones en la temperatura de almacenamiento (Matsubara, 2011; Martins, 2017). La normativa ecuatoriana para mesófilos aerobios define un límite máximo de 1,5 millones de UFC/mL; sin embargo, las regulaciones industriales penalizan al productor en el pago por litro de leche para conteos superiores a 300000 UFC/mL. Los conteos superiores a 700000 UFC/mL fueron observados en el 6,1% al 10% de muestras de leche provenientes de tanques de refrigeración de asociaciones de productores (Almeida, 2014; Neppas, 2014), demostrando la necesidad de mayor control en la higiene durante el ordeño. De ahí la importancia de definir una ecuación de correlación con rangos entre 100000 y 1,5 millones de UFC/mL.

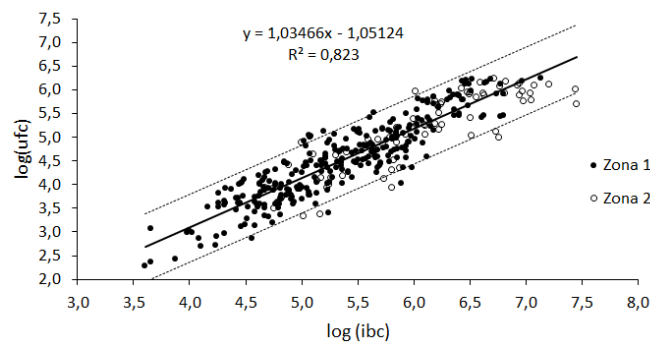


Figura 2. Distribución, línea de regresión e intervalo de predicción (95%) $\log(IBC/mL)$ y $\log(UFC/mL)$.

Aunque en países como Noruega, Canadá y Reino Unido se ha adoptado la expresión de resultados como IBC/mL directamente (sin conversión) a UFC/mL, el método de referencia en las normativas internacionales y nacionales exige su expresión como UFC/mL (ISO, 2006; Cassoli, 2007). La transformación de los resultados analíticos obtenidos por equipos de conteo electrónico basados en la citometría de flujo también se utiliza en otros países, junto con el uso de la curva de calibración y regresión lineal, como Brasil, Uruguay y Colombia (INEN, 2012; Ruiz-Cortés y col., 2012; Cassoli, 2016). En este estudio, el análisis estadístico mostró una correlación significativa entre la técnica estándar y la técnica de citometría de flujo ($r = 0,91$), resultado

similar al de trabajos previos que reportan un valor entre 0,80 a 0,93 (Cassoli, 2007; Jatobá, 2014). Sampaio, (2015) indicaron que la correlación entre ambos métodos puede ser afectada por el tamaño, la forma de las células bacterianas o su forma de agrupación.

La implementación de sistemas de gestión y control de calidad entre laboratorios permite actualmente comparar ecuaciones y verificar discrepancias. Además, otra ventaja importante de la citometría de flujo es el precio de este análisis: en el Ecuador representa una diferencia de 3 a 4 veces menor en comparación al precio del método referencial, posicionándolo como una herramienta útil en los programas de monitoreo y control de calidad de alta demanda.

4 Conclusiones

Ya que la demanda por análisis de muestras de leche en Ecuador es cada vez frecuente y no se observaron diferencias significativas para las zonas (> 2900 msnm y 1050 msnm) como las evaluadas en este estudio, es posible utilizar una única ecuación de regresión lineal para la determinación del CBT por el método alternativo de citometría de flujo utilizando el equipo Bactoscan FC.

Agradecimiento

Los autores agradecen a los productores de leche por su colaboración.

Referencias

- Almeida, D.I.A. (2014). *Prevalencia de mastitis bovina mediante la prueba de California Mastitis test e identificación del agente etiológico, en el centro de acopio de leche en la comunidad San Pablo Urco, Olmedo - Cayambe-Ecuador*. Inf. téc. Online: <https://bit.ly/2H3mle4>: Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Almeida, T (2016). «Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento de amostras de leite cru nos resultados das análises eletrônicas». En: *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 68.5, 1316-1324. Online: <https://bit.ly/2NKSE1Y>.
- Araujo, V. M. (2009). «Avaliação da metodologia no infravermelho com Transformada de Fourier para análises do pH e ponto de congelamento em leite bovino. Tesis Mestrado em Agronomia.» Tesis de mtría. Online: <https://bit.ly/2C6Pdhu>: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Barbano, D. M., Y. Ma y M. V. Santos (2006). «Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life». En: *Journal of Dairy Science* 89, 14-19. Online: <https://bit.ly/2Uo8O3T>.
- Belli, P. (2013). «Microbiological survey of milk and dairy products from a small scale dairy processing unit in Maroua (Cameroon)». En: *Food Control* 32.2, 366-370. Online: <https://bit.ly/2TkOgg4>.
- Botaro, B. G., A. H. Gameiro y M. V. Santos (2013). «Quality based payment program and milk quality in dairy cooperatives of Southern Brazil: An econometric analysis». En: *Scientia Agricola* 70, 21-26. Online: <https://bit.ly/2TFDY9T>.
- CEPAL FAO, IICA (2017). *Perspectivas de la agricultura y del desarrollo rural en las Américas: una mirada hacia América Latina 2017-2018*. Inf. téc. 41-61. Online: <https://bit.ly/2yhtW5g>. Comisión Económica para América Latina y el Caribe, Organizacin de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José.
- Cassoli, L. D. (2007). «Correlation study between standard plate count and flow cytometry for determination of raw milk total bacterial count». En: *International Journal of Dairy Technology* 60.1, 44-48. Online: <https://bit.ly/2NL87z2>.
- (2016). «Do different standard plate counting (IDF/ISSO or AOAC) methods interfere in the conversion of individual bacteria counts to colony forming units in raw milk?». En: *Journal of Applied Microbiology* 121.4, 1052-1058. Online: <https://bit.ly/2tTeAPb>.
- Cuenca, F. (2015). «Environmental Protection and agricultural food production assessment of storage, quality, and value chains parameters in southern Ecuador milk production: a rural areas approach. Thesis of Master.» Tesis de mtría. Online: <https://bit.ly/2EF0hmk>: University of Hohenheim, Stuttgart, Alemania.
- Evangelista, D. (2008). «Comparação entre metodos de referencia e eletrónico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de celulas somaticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos termicos. Tesis Master em Ciencia Animal.» Tesis de mtría. Online: <https://bit.ly/2tXendH>: Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- FAO e IDF. (2011). *Guide to good dairy farming practice, Guide to good dairy arming practice*. Inf. téc. Online: <https://bit.ly/2HoIwum>: Food, Agriculture Organization of the United Nations e International Dairy Federation.
- Gopal, N. (2015). «The prevalence and control of Bacillus and related spore-forming bacteria in the dairy industry». En: *Frontiers in Microbiology* 6, 118. Online: <https://bit.ly/2VMW3Af>.
- Hoddinott, J., D. Headey y M. 2015. Dereje (2015). «Cows, Missing Milk Markets, and Nutrition in Rural Ethiopia». En: *Journal of Development Studies*. Routledge 51.8, 958-975. Online: <https://bit.ly/2TjcWpf>.
- INEC (2014). *Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua ESPAC- 2014*. Inf. téc. Online: <https://bit.ly/2Uwl7uI>: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Quito, Ecuador.
- INEN y ISO (2014). *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnicas de recuento de colonias a 30°C*. Inf. téc. Online: <https://bit.ly/2U4n4PET>: Instituto Ecuatoriano de Normalización e Internatio-

- nal Organization for Standardization. NTE 4833. Quito, Ecuador.
- INEN (2006). *Norma Técnica Ecuatoriana. NTE INEN 1529: 5. Control microbiológico de los alimentos: determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos rep.* Inf. téc. Online: <https://bit.ly/2VKqrzZ>: Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito, Ecuador.
- (2012). *Norma Técnica Ecuatoriana. Leche cruda. Requisitos.* NTE INEN 9:2012. Inf. téc. Online: <https://bit.ly/2TvY7PA>: Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito-Ecuador.
- ISO (2006). *Milk Enumeration of somatic cells Part 2. Guidance on the operation of fluoro - opto- electronic.* Inf. téc. Online: <https://bit.ly/2tT6u9e>: International Organization for Standardization.
- Jatobá, R (2014). «Estabelecimento de uma curva de calibração para o equipo Bactcount para monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado. Tese de Mestre em Zootecnia.» Tesis de maestría. Online: [urlhttps://bit.ly/2Un232c](https://bit.ly/2Un232c): Universidade Federal Rural de Pernambuco. Brasil.
- MAGAP (2008). *Reglamento para normar el pago por calidad de la leche y sanidad animal. Decreto Ejecutivo No 1042.* Inf. téc. Online: <https://bit.ly/2UpvWwu>: Ministerio de Agricultura, Ganadería Acuacultura y Pesca MAGAP. Quito, Ecuador.
- (2013). *Acuerdo ministerial para el pago del litro de leche cruda en finca o centro de acopio.* Inf. téc. Online: <https://bit.ly/2TlnxzZ>: Ministerio de Agricultura, Ganadería Acuacultura y Pesca - MAGAP. Quito, Ecuador.
- Martins, C. (2017). «Efficacy of a high free iodine barrier teat disinfectant for the prevention of naturally occurring new intramammary infections and clinical mastitis in dairy cows». En: *Journal of Dairy Science. American Dairy Science Association* 100, 110. Online: <https://bit.ly/2Hj8AXZ>.
- Matsubara, M. (2011). «Good practices in milking to reduce microbiological contamination of milk in agreste of Pernambuco.» en: *Semina: Ciências Agrárias.* 32, 277-286. Online: <https://bit.ly/2ETZuzh>.
- Micinski, J. (2013). «Characteristics of cows milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction». En: *Polish Annals of Medicine. Varsvia,* 20.1, 69-76. Online: <https://bit.ly/2VKzhZJ>.
- Neppas, E. (2014). *Sistematización y análisis del proceso de gestión de la calidad de la leche del centro de acopio: El progreso de Cariacu del Cantón Cayambe.* Inf. téc. Online: <https://bit.ly/2ISRRgu>: Facultad de Ingeniería Agropecuaria. Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Numthuan, S. (2017). «Method development for the analysis of total bacterial count in raw milk using near-infrared spectroscopy». En: *Journal of Food Safety* 37.3, 1-7. Online: <https://bit.ly/2VGDopo>.
- Pereira, P. C. (2014). «Milk nutritional composition and its role in human health». En: *Nutrition. London: Elsevier* 30.6, 619-627. online: <https://bit.ly/2TlkpUW>.
- Primary Industries, Ministry for (2015). *Experiences of buying, selling and consuming raw milk: survey report, MPI, New Zealand. Information Paper.* Inf. téc. 4. Online: <https://bit.ly/2ERBRre>: Ministry for Primary Industries.
- Requelme, N. y N. Bonifaz (2012). «Caracterización de sistemas de producción lechera de Ecuador.» En: *La Granja* 15, 55-69. Online: <https://bit.ly/2TFJfOJ>.
- Reyes, J. (2017). «Influence of milking method, disinfection and herd management practices on bulk tank milk somatic cell counts in tropical dairy herds in Colombia». En: *The Veterinay Journal. Elsevier Ltd* 220, 34-39. Online: <https://bit.ly/2UjAAOO>.
- Ruiz-Cortés, T. y col. (2012). «Factors that affect colony forming units in bulk milk of north Antioquia-Colombia dairy farms». En: *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica* 15.1, 147-155. Online: <https://bit.ly/2tV32ep>.
- Sampaio, V. (2015). «Influencia de diferentes tipos de micro-organismos na contagem bacteriana total por citometria de fluxo do leite cru refrigerado.» En: *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária* 67.2, 607-612. Online: <https://bit.ly/2TDhfec>.
- Silva, N. (2010). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.* São Paulo: Varela, São Paulo. Online: <https://bit.ly/2C7MfZT>.