

**Elaboración y validación de un método  
indirecto para la estimación de células  
somáticas y bacterias mesófilas aerobias en  
leche cruda**

**Ellen Andrea Méndez Sosa  
Cesar Valdéz Zúniga**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Elaboración y validación de un método  
indirecto para la estimación de células  
somáticas y bacterias mesófilas aerobias en  
leche cruda**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingenieros en Agroindustria Alimentaria en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Ellen Andrea Méndez Sosa  
Cesar Valdéz Zúniga**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2017

## **Elaboración y validación de un método indirecto para la estimación de células somáticas y bacterias mesófilas aerobias en leche cruda**

**Ellen Andrea Méndez Sosa  
Cesar Valdéz Zúniga**

**Resumen.** La producción de leche es una práctica importante para los agricultores de la zona rural de Honduras, quienes por malas condiciones de saneamiento y enfriamiento reciben un menor precio por su leche. La calidad microbiológica en cuanto a células somáticas (CCS) y bacterias mesófilas aerobias (BMA) son factores determinantes en los rendimientos de productos lácteos. El objetivo del estudio fue establecer correlación entre CCS, BMA, potencial de óxido reducción (ORP) y resazurina para elaborar y validar un método indirecto que estime la calidad de la leche cruda. Se realizaron los análisis directos en laboratorio para CCS bajo microscopio y BMA con la técnica de vaciado en placa en agar cuenta estándar y los análisis indirectos de ORP y resazurina. Se realizó un análisis de correlación y de regresión para obtener una ecuación que predijo la cantidad de CCS en función de la prueba de resazurina:  $CCS = 7.40742 - (0.42404 \times \text{resazurina})$ , la predicción para BMA no fue significativa por el bajo coeficiente de correlación con los métodos indirectos. Se predijo la calidad para 20 muestras provenientes de una finca y de un Centro de Recolección y Enfriamiento de la Leche (CREL) y se comparó con los resultados obtenidos por métodos directos con un ajuste de 66.75%, la tabla predictiva estimó la cantidad de CCS para la finca pero no para el CREL debido a la falta de buenas prácticas de ordeño en los productores del CREL.

**Palabras clave:** Calidad microbiológica, correlación, potencial de óxido reducción, prueba de resazurina, regresión.

**Abstract.** Dairy production is an important practice for agriculture in Honduras rural areas. However, milk producers tends to receive a minor price for their raw milk because of their inappropriate sanitary and chilling conditions. The microbiological quality of milk based on somatic cells count (SCC) and mesophilic aerobic bacteria (PCA) are factors that directly influence the yields of dairy products. The objective of this study was to establish a correlation between SCC, PCA, redox potential (ORP) and resazurin for the development and validation of an indirect method that estimates the quality of raw milk. Direct analyses were conducted in the laboratory for SCC through direct microscope count an aerobic plate count technique and plate count agar used for PCA; and indirect methods for redox potential and resazurin. Correlation and regression analysis were made to obtain the equation that helped to predict the amount of SCC based on the resazurin test:  $SCC = 7.40742 - (0.42404 \times \text{resazurin})$ ; the PCA prediction equation was not significant due to the low correlation with the indirect methods. The quality for twenty milk samples from a farm and a private business near Zamorano were predicted and compared to the results table obtained by direct methods. Accordingly, the methods were able to predict the amount of SCC for the farm samples but not for the private business; as a result of poor hygienic practices in the private businesses.

**Key words:** Correlation, microbiology quality, redox potential, regression, rezasurin test.

## CONTENIDO

|  |           |
|--|-----------|
| Portadilla .....                         | i         |
| Página de firmas .....                   | ii        |
| Resumen .....                            | iii       |
| Contenido .....                          | iv        |
| Índice de cuadros, figuras y anexos..... | v         |
| <br>                                     |           |
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>              | <b>1</b>  |
| <b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>      | <b>3</b>  |
| <b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>    | <b>5</b>  |
| <b>4. CONCLUSIONES .....</b>             | <b>13</b> |
| <b>5. RECOMENDACIONES .....</b>          | <b>14</b> |
| <b>6. LITERATURA CITADA.....</b>         | <b>15</b> |
| <b>7. ANEXOS .....</b>                   | <b>18</b> |

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

| Cuadros   | Página |
|---|--------|
| 1. Distribución de muestras de leche cruda según clasificación de calidad de Norma Mexicana (COFOCALEC 2012) para células somáticas (CCS) y bacterias mesófilas aerobias (BMA). ....      | 6      |
| 2. Calificación de calidad según cambio de coloración durante la prueba de resazurina de 60 min a $36 \pm 1$ °C .....   | 7      |
| 3. Clasificación de calidad de leche cruda según cantidad de células somáticas (CCS) de acuerdo a la Norma Mexicana y FDA en función del cambio de color en la prueba de resazurina ..... | 8      |
| 4. Ángulos Hue de los colores obtenidos mediante la prueba de resazurina.....   | 9      |
| 5. Distribución de muestras de leche cruda según cantidad de células somáticas (CCS) predichas por método indirecto clasificadas en base a la Norma Mexicana (COFOCALEC 2012).....        | 9      |
| 6. Distribución de muestras de leche cruda según cantidad de células somáticas en base a calidad establecida por la FDA, obtenidas por métodos directo e indirecto.....                   | 10     |
| 7. Distribución de muestras de leche cruda según calidad de acuerdo a FDA en base a método directo e indirecto y su resultado de bacterias mesófilas aerobias (BMA) .....                 | 11     |

| Figuras   | Página |
|---|--------|
| 1. Indicadores de la calidad de leche según prueba de resazurina (Zemanate y Grass 2005).....   | 4      |
| 2. Ajuste de modelo indirecto con probabilidad menor a 0.0001 para calidad de leche cruda basado en la cantidad de células somáticas por conteo directo de microscopio (CDM) y prueba de resazurina (RES). .... | 7      |
| 3. Relación entre resultados observados y predichos por el método indirecto para células somáticas (CCS) .....  | 10     |
| 4. Relación entre resultados observados y predichos por la ecuación $y = -0.51738x + 7.10292$ (Morales 2005) para bacterias mesófilas aerobias (BMA). ....  | 12     |

| Anexos   | Página |
|--|--------|
| 1. Sistemas de óxido reducción y sustancias que causan disminución en el potencial de óxido reducción en la leche cruda.....   | 18     |
| 2. Mecanismo de acción de la resazurina .....  | 19     |
| 3. Distribución de muestras de leche cruda con los resultados para BMA, CCS, ORP y Resazurina.....   | 19     |
| 4. Análisis de correlación entre BMA, CCS, ORP y resazurina mediante el programa “Statistical Analysis System 9.4®”.....   | 22     |
| 5. Análisis de regresión para células somáticas y resazurina mediante el programa “Statistical Analysis System 9.4®” .....   | 23     |
| 6. Distribución de muestras de leche cruda provenientes de vacas con los resultados para BMA, CCS, ORP y Resazurina.....   | 23     |
| 7. Clasificación de las muestras de leche cruda proveniente de vacas según la calidad establecida por la FDA para los datos observados y los predichos .....             | 26     |
| 8. Clasificación de muestras de validación según calidad establecida por FDA.....  | 28     |
| 9. Comparación de los resultados de bacterias mesófilas aerobias (BMA) obtenidos mediante método directo (observadas) y la prueba de azul de metileno (predichas). ..... | 29     |
| 10. Prueba de Mann-Whitney para muestras de validación .....   | 29     |

## 1. INTRODUCCIÓN

La agricultura es considerada la principal fuente de ingresos en las zonas rurales de Honduras, donde la mayor parte (64%) viven por debajo de la línea de pobreza (Molina 2010). La producción de leche es una práctica muy importante en el sector, para el 2012 el sector agrícola representaba el 12% del PIB nacional y el hato ganadero de Honduras era de 1.7 millones de cabezas que producían entre 500 y 650 millones de litros de leche al año (Borjas 2013). En el 2016 solo el 35% de la producción era destinada a plantas industriales y el 65% se procesaba a nivel artesanal quienes dan un menor precio por la leche (Rodríguez 2016).

En 1998 con ayuda de USAID se reactivó el sector lechero en Honduras a través del establecimiento de Centros de Recolección y Enfriamiento de Leche (CREL). Sin embargo, la calidad de la leche producida es baja debido a las malas condiciones sanitarias y de enfriamiento (Molina 2010). Uno de los mayores problemas en los CREL es que al mezclar leche de menor calidad aportada por alguno de los socios, provoca un descenso en la calidad total de la leche y esto ocasiona problemas de devolución o reducción en el precio de venta (Posas et al. 2013).

Las características higiénicas de una leche cruda hacen referencia a la cantidad de bacterias y de células somáticas que presenta (Drici 2016). Para obtener productos lácteos de buena calidad es imprescindible utilizar leche de buena calidad y uno de los indicadores es la baja carga inicial de microorganismos (Zamorán 2012). Otro factor es la cantidad de células somáticas que posee ya que indican la salud de la glándula mamaria de donde se obtuvo la leche (Hernández and Bedolla 2009). En plantas industriales, se da un mejor precio a las leches con mejor calidad a diferencia de plantas artesanales, quienes no establecen requisitos de calidad (Molina 2010).

El uso de leche cruda con altos recuentos de células somáticas disminuye el rendimiento en la producción y causa cambios de textura y de sabor en quesos y otros productos lácteos. La alta carga de bacterias mesófilas aerobias (BMA) en la leche cruda dificulta su manejo, reduce la eficiencia de producción y aumenta el riesgo de alcanzar el nivel máximo permitido de estos microorganismos (Murphy et al. 2016).

Existen métodos indirectos para medir la carga microbiológica en leche, como la prueba de resazurina que utiliza un colorante indicador del potencial de óxido reducción que mide el número de células viables a través del cambio de coloración causada por la reducción irreversible de resazurina a resorufina, dando lugar a un color rosado fluorescente (Sitta et al. 2017). Esta reducción se da por la disminución en la cantidad de oxígeno que es consumido por las bacterias y se acelera al aumentar la carga microbiológica o al haber una alta carga de células somáticas (Wehr and Frank 2004).

El potencial de óxido reducción es otro método indirecto para evaluar la calidad en la leche ya que mide la oxidación de contaminantes (Jenitta et al. 2014). Una leche fresca presenta un potencial de óxido reducción entre +0.2 a +0.3 voltios (Webb et al. 1974). Sin embargo, la actividad metabólica de las bacterias remueve el oxígeno de la leche y produce reductantes que disminuyen abruptamente el potencial de óxido reducción (Walstra 1999).

Adicionalmente, existen métodos directos para la determinación de estas variables. El método directo de microscopio para células somáticas permite estimar la cantidad de células a través de una lectura bajo microscopio donde también se evalúa su morfología. Esta metodología solamente toma en cuenta células somáticas intactas y con características morfológicas específicas (Wehr and Frank 2004).

El método directo para evaluar BMA aprobado por la FDA (Food and Drug Administration), es igual para alimentos congelados, refrigerados, precocinados o preparados con algunas especificaciones para leche (Maturin and Peeler 2001). Esta técnica es utilizada como un indicador de la población bacteriana en un alimento, no diferencia entre microorganismos y provee información sobre la vida anaquel de un producto (Murray Brown Laboratories 2017).

Se han realizado estudios (Morales 2005; Jenitta et al. 2014; Zemanate and Grass 2005) que han relacionado algunas de estas variables con la calidad higiénica de la leche cruda, sin embargo, no se estableció una correlación entre todas al mismo tiempo que permita estimar la calidad de la leche cruda de una manera indirecta. Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron:

- Establecer una correlación entre cantidad de células somáticas, potencial de óxido reducción y prueba de resazurina en leche cruda.
- Establecer una correlación entre cantidad de bacterias mesófilas aerobias, potencial de óxido reducción y prueba de resazurina en leche cruda.
- Desarrollar un método indirecto que sea sencillo y rápido para estimar la cantidad de células somáticas y bacterias mesófilas aerobias presentes en la leche cruda.
- Validar el modelo indirecto utilizando leche cruda que se procesa en plantas comerciales.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Localización del estudio.**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano (LMAZ) ubicado en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

### **Recolección de las muestras.**

Se recolectaron 100 muestras de leche cruda de 50 ml. Se obtuvieron 80 de la Unidad de Ganado Lechero de Zamorano, 8 del tanque que transporta la leche a la Planta de Lácteos Zamorano y 12 de un proveedor externo de la planta. Se mantuvieron a 4 °C hasta llevar a cabo los análisis, el tiempo transcurrido entre la recolección de las muestras y la ejecución de los análisis fue aproximadamente entre 1 a 2 horas.

### **Análisis de Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA).**

Se utilizó el medio de cultivo agar cuenta estándar (ACE) atemperado a 45 °C. Las muestras de leche se homogenizaron y se diluyeron hasta  $10^{-4}$ . Se inocularon en platos Petri las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  o  $10^{-4}$  y se agregó el ACE según el método de vaciado en placa. Se homogenizó el medio con movimientos lentos y circulares por 10 s y se dejó solidificar a temperatura ambiente, luego se incubaron a  $32 \pm 1$  °C durante 48 h. Se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y se reportó el resultado en log de UFC/ml (Maturin y Peeler 2001).

### **Análisis de resazurina.**

Se preparó la solución de resazurina mezclando 0.011 g de reactivo en 200 ml de agua estéril. De cada muestra de leche, se extrajeron 10 ml y se agregaron a un tubo de ensayo estéril junto con 1 ml de la solución de resazurina. Se invirtió el tubo tres veces para homogenizar la muestra y se colocaron en termobañó a  $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  durante 60 min. Se registró el cambio de coloración de cada muestra mediante fotografías y posteriormente con la aplicación “colorassistant” para teléfonos, se identificó el código de color de cada una. Se clasificó cada muestra de acuerdo a la figura 1 (Wehr and Frank 2004).

### **Conteo de células somáticas (CCS).**

Se realizó el recuento de células somáticas según el método Prescott-Breed y se utilizaron portaobjetos Angstadt-Weber que contienen cinco círculos de 1 cm<sup>2</sup> cada uno. Se homogenizaron las muestras, se extrajeron 0.03 ml de cada una con una micropipeta y se colocó 0.01 ml en los tres círculos centrales del portaobjeto, se extendió la muestra en el área con movimientos circulares y se dejó secar completamente sobre una superficie plana

a 35 °C para acelerar el proceso. Se tiñeron las células al sumergir los portaobjetos en una solución de azul de metileno al 0.05% por 1.5 minutos y se dejaron secar completamente a temperatura ambiente. Se contaron las células somáticas utilizando un microscopio con lente objetivo de 100x, se contó la línea vertical central del círculo y se multiplicó por el factor de conversión de acuerdo a Wehr y Frank (2004).

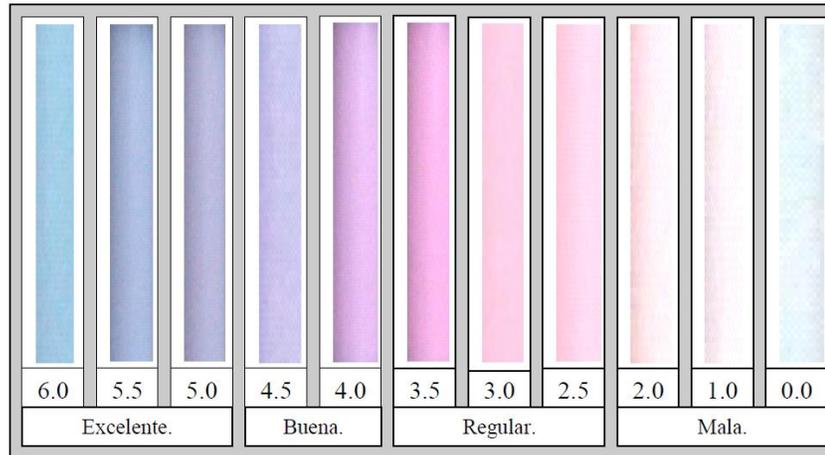


Figura 1. Indicadores de la calidad de leche según prueba de resazurina (Zemanate y Grass 2005).

#### **Análisis de óxido reducción.**

Se utilizó el electrodo ORP 850088 de Sper Scientific y se adaptó a un equipo de potenciómetro, se verificó que las unidades estuvieran en milivoltios (mV). Se homogenizó la muestra de leche y se introdujo el electrodo, se esperó a que el equipo se estabilizara y marcara el potencial de óxido reducción presente en la muestra.

#### **Análisis estadístico y elaboración del método indirecto.**

Se tomó el registro de los resultados de los cuatro análisis de todas las muestras y se analizaron en el programa SAS 9.4<sup>®</sup> (Statistical Analysis System), se estableció la correlación entre las variables y se elaboró una regresión con la que se estimó la cantidad de células somáticas en función de la prueba de resazurina.

#### **Validación de la ecuación.**

Se recolectaron 20 muestras de fincas aledañas a la Escuela Agrícola Panamericana, nueve de una hacienda y once de un CREL, se realizó el recuento directo al microscopio para conocer la cantidad de CCS y se estimó con el método predictivo. Se realizó una prueba de Mann-Whitney para identificar diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante los métodos directos e indirectos.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Análisis de laboratorio.**

Los resultados obtenidos de las muestras de leche analizadas fueron distribuidas en rangos según la Norma Mexicana (COFOCALEC 2012) identificando la clasificación de calidad referente a la cantidad de células somáticas y BMA presentes en cada una (Cuadro 1). La clasificación de calidad de la leche cruda va a depender de la región donde se esté operando, en Estados Unidos existen regulaciones para cada estado donde se establece un límite máximo de CCS y BMA para calificar una leche como grado A (Clark 2017). En México el Consejo para el Fomento de la Calidad de Leche y sus Derivados (COFOCALEC) estableció un Proyecto de Norma Mexicana donde se determinan los rangos para clasificar la leche según clase 1, 2, 3 o 4 (COFOCALEC 2012). También La FDA (Food and Drug Administration) estableció una regulación con parámetros para diferentes tipos de leche (cruda, pasteurizada, evaporada entre otras) que limita la cantidad de BMA y CCS (FDA/CFSAN 2015). En Centroamérica no existe una ley que indique un nivel máximo permitido para leches crudas, únicamente para leches procesadas.

#### **Análisis estadístico.**

Con el programa SAS 9.4<sup>®</sup> se realizó un análisis de correlación para identificar el grado de asociación entre las variables obteniendo un coeficiente de -0.60 y probabilidad menor a 0.0001 para CCS con resazurina, coeficientes menores a 0.3 y probabilidad menor a 0.05 para potencial de óxido reducción con CCS o con BMA y coeficiente menor a 0.1 y probabilidad mayor de 0.05 para BMA con resazurina. Es posible que la baja correlación del potencial de óxido reducción (ORP) con células somáticas y bacterias mesófilas aerobias se debe a la variación del contenido graso de las muestras ya que en la leche existe una enzima llamada xantino oxidasa que se liga a la grasa y causa una disminución significativa en el ORP. Otra causa de la reducción en el potencial de óxido reducción es la presencia de las bacterias causantes de mastitis ya que aumentan la cantidad de catalasa en la leche que es una enzima que disminuye el ORP (Zambrano and Grass 2008).

Se estima que en vacas con mastitis, la susceptibilidad a la infección se debe en 25% a factores ambientales, 20% por genética y 50% según el manejo (Aqueveque 2007). Otros factores que influyen en la presencia de mastitis son la falta de comida, desequilibrio en la dieta, largas caminatas, estrés calórico o enfermedades y esto aumenta el contenido de células somáticas en la leche afectando más a vacas con mastitis subclínica que a vacas sanas (Bouman 2008). Las bacterias anaerobias son una de las principales fuentes de contaminación en las ubres de las vacas con mastitis clínica o subclínica (Corbellini 2016), las células somáticas están relacionadas con la presencia de bacterias aerobias y anaerobias

mientras que la prueba de resazurina indica únicamente la presencia de bacterias aerobias (Zemanate and Grass 2005). Debido a esto se trabajó con muestras recolectadas de vacas sanas, descartando las que provenían de vacas mastíticas, con malas prácticas de ordeño o de lugares con almacenamiento sin control de temperatura.

Cuadro 1. Distribución de muestras de leche cruda según clasificación de calidad de Norma Mexicana (COFOCALEC 2012) para células somáticas (CCS) y bacterias mesófilas aerobias (BMA).

| CCS (células/ml) <sup>‡</sup> | BMA (UFC/ml) <sup>¥</sup> | Clasificación según BMA | Cantidad de muestras |
|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|
| Clase 1<br><400,000           | <100,000                  | Clase 1                 | 46                   |
|                               | 101,000-300,000           | Clase 2                 | 7                    |
|                               | 301,000-599,000           | Clase 3                 | 1                    |
|                               | 600,000-1,200,000         | Clase 4                 | 4                    |
| Clase 2<br>401,000-500,000    | <100,000                  | Clase 1                 | 5                    |
|                               | 101,000-300,000           | Clase 2                 | 2                    |
|                               | 301,000-599,000           | Clase 3                 | 0                    |
|                               | 600,000-1,200,000         | Clase 4                 | 0                    |
| Clase 3<br>501,000-749,000    | <100,000                  | Clase 1                 | 7                    |
|                               | 101,000-300,000           | Clase 2                 | 2                    |
|                               | 301,000-599,000           | Clase 3                 | 0                    |
|                               | 600,000-1,200,000         | Clase 4                 | 2                    |
| Clase 4<br>>750,000           | <100,000                  | Clase 1                 | 17                   |
|                               | 101,000-300,000           | Clase 2                 | 5                    |
|                               | 301,000-599,000           | Clase 3                 | 1                    |
|                               | 600,000-1,200,000         | Clase 4                 | 1                    |

<sup>‡</sup> Recuento de células somáticas según método directo de Prescott-Breed

<sup>¥</sup> Conteo de bacterias mesófilas aerobias por el método de vaciado en placa en agar cuenta estándar

Se estableció nuevamente una correlación entre las variables utilizando las 72 muestras provenientes de vacas sanas y se encontró un coeficiente de correlación entre CCS y resazurina de -0.67 con probabilidad menor a 0.001, entre ORP y CCS o BMA fue menor a 0.3 y entre BMA y resazurina fue menor a 0.1, estos últimos con probabilidad mayor a 0.05. Al no haber aumento significativo entre BMA y ORP o resazurina, se utilizó únicamente las variables de CCS y resazurina para continuar el estudio. Se estableció un análisis de regresión para obtener una ecuación que permitiera predecir la cantidad de CCS de una muestra de leche cruda a partir del cambio de coloración de la prueba de resazurina

(ecuación 1) y el modelo presentó un  $R^2$  de 0.4516 lo que indica que el 45% de las muestras se ajustaron al modelo (Figura 2).

$$CCS = 7.40742 - (0.42404 \times \text{resazurina}) \quad [1]$$

El conteo de células somáticas (CCS) depende de la diferencia entre el intercepto 7.40742 y el producto de 0.42404 por la calificación de color en la prueba de resazurina en una escala de uno a seis (Cuadro 2) utilizando la prueba de 60 min a temperatura de  $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

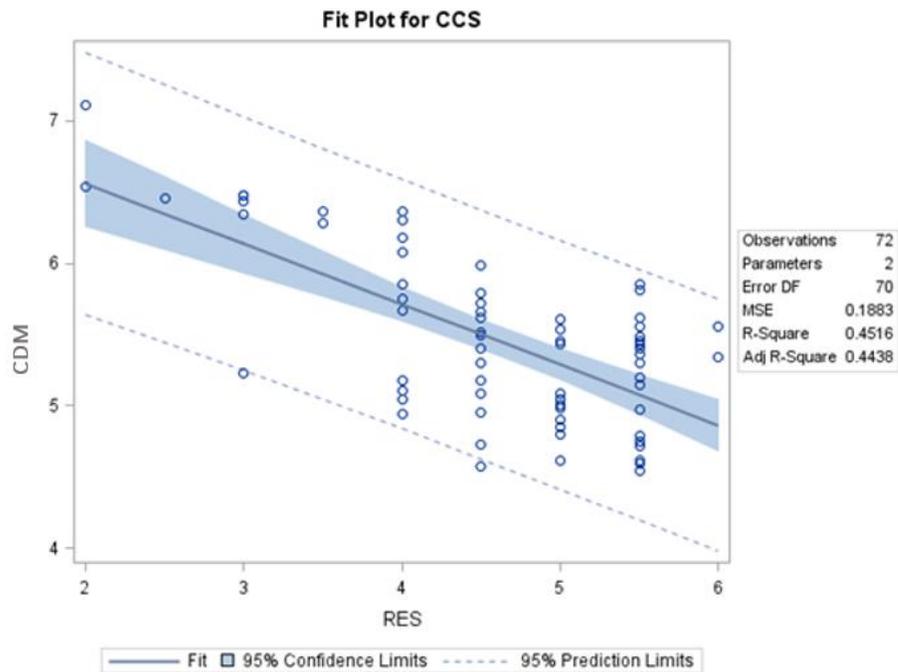


Figura 2. Ajuste de modelo indirecto con probabilidad menor a 0.0001 para calidad de leche cruda basado en la cantidad de células somáticas por conteo directo de microscopio (CDM) y prueba de resazurina (RES).

Cuadro 2. Calificación de calidad según cambio de coloración durante la prueba de resazurina de 60 min a  $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

| Calidad <sup>‡</sup> | Color según prueba de resazurina |
|----------------------|----------------------------------|
| 6                    |                                  |
| 5                    |                                  |
| 4                    |                                  |
| 3                    |                                  |
| 2                    |                                  |
| 1                    |                                  |

<sup>‡</sup> Mayor calidad =6 menor calidad =1

A partir de la ecuación 1 se elaboró una tabla que indicó de manera indirecta una estimación de la cantidad de CCS presente en la leche en función del cambio de coloración en la prueba de resazurina de una hora y se clasifica según su calidad de acuerdo a la Norma Mexicana y a los parámetros de la FDA (Cuadro 3) (COFOCALEC 2012; FDA/CFSAN 2015).

Cuadro 3. Clasificación de calidad de leche cruda según cantidad de células somáticas (CCS) de acuerdo a la Norma Mexicana y FDA en función del cambio de color en la prueba de resazurina.

| Calidad <sup>£</sup> | Color según prueba de resazurina <sup>¥</sup>                                     | CCS <sup>€</sup> (células/ml) | Norma Mexicana <sup>κ</sup> | FDA <sup>^</sup> |
|----------------------|---|-------------------------------|-----------------------------|------------------|
| 6                    |  | 73,000                        | 1                           | A                |
| 5                    |  | 190,000                       | 1                           | A                |
| 4                    |  | 510,000                       | 2                           | A                |
| 3                    |  | 1,400,000                     | 4                           | B                |
| 2                    |  | 3,600,000                     | 4                           | B                |
| 1                    |  | 9,600,000                     | 4                           | B                |

<sup>£</sup> Mayor calidad =6 menor calidad =1

<sup>¥</sup> Prueba de 1 h a temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$

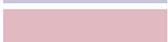
<sup>€</sup> CCS estimadas con la ecuación  $\text{CCS} = 7.40742 - (0.42404 \times \text{resazurina})$

<sup>κ</sup> Proyecto de Norma Mexicana (COFOCALEC 2012)

<sup>^</sup> Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance 2015

Los datos de coloración obtenidos para desarrollar el método indirecto fueron tomados en escala RGB debido a que es la utilizada en la aplicación “colorassistant” para teléfonos. A partir de los códigos de color se obtuvo el ángulo Hue para cada una de las calidades (Cuadro 4). Se utilizó la metodología CIElab ya que es la que se aplica en el desarrollo de nuevos métodos o aplicaciones no existentes, además presenta una escala reconocida internacionalmente (Chuchuca *et al.* 2012). Utilizando el ángulo Hue se comprobó que los colores establecidos según la calidad eran diferentes y permitió una mayor gama de colores dentro de la tabla para comparar la tonalidad de los resultados de la prueba de resazurina.

Cuadro 4. Ángulos Hue de los colores obtenidos mediante la prueba de resazurina.

| <b>Calidad<sup>£</sup></b> | <b>Color</b>  | <b>Hue</b> |
|----------------------------|---|------------|
| 6                          |  | 216        |
| 5                          |  | 218        |
| 4                          |  | 244        |
| 3                          |  | 348        |
| 2                          |  | 344        |
| 1                          |  | 38         |

<sup>£</sup> Mayor calidad = 6 menor calidad = 1

Con la tabla de clasificación de calidad de manera indirecta, se elaboró la distribución de las 72 muestras recolectadas de vacas sanas, de acuerdo a lo establecido en la Norma Mexicana (COFOCALEC 2012). Se excluyeron las 28 muestras con resultados atípicos causados por vacas mastíticas o malas prácticas de ordeño (Cuadro 5).

Cuadro 5. Distribución de muestras de leche cruda según cantidad de células somáticas (CCS) predichas por método indirecto clasificadas en base a la Norma Mexicana (COFOCALEC 2012).

| <b>Clase según calidad <sup>£</sup></b> | <b>CCS (células/ml) <sup>€</sup></b> | <b>Cantidad de muestras</b> |
|---|--------------------------------------|-----------------------------|
| 1                                       | <400,000                             | 51                          |
| 2                                       | 401,000-500,000                      | 0                           |
| 3                                       | 501,000-749,000                      | 11                          |
| 4                                       | >750,000                             | 10                          |

<sup>£</sup> Mayor calidad =1 menor calidad =4

<sup>€</sup> CCS estimadas con la ecuación  $CCS = 7.40742 - (0.42404 \times \text{resazurina})$

Debido a la ausencia de clasificación para calidad de leche cruda en Centroamérica, se utilizó la regulación establecida por la FDA quien califica como grado A todas las leches con recuentos de células somáticas menor a 750,000 células/ml y como grado B a las que presentan un valor arriba de 750,000 células/ml (FDA/CFSAN 2015). Para procesar leche, es importante conocer la cantidad de células somáticas ya que a mayor contenido, disminuye el rendimiento del producto final por pérdidas de proteína durante el desuerado (Silva N et al. 2012). En algunas regiones existen penalizaciones económicas a productores que no cumplen con estándares para leche grado A. En el estado de Tennessee, Estados Unidos a cada libra de leche se restan \$0.10 por cada 100 células somáticas arriba de 500,000 células/ml y a productores de leche con menos de 350,000 células/ml se les bonifica con \$0.25 por cada 100 células menos (Campbell 2012). Al comparar la calidad de las muestras recolectadas establecidas por los métodos directo e indirecto en base a los estándares establecidos por la FDA, se encontró diferencia solo en cuatro de las muestras

(Cuadro 6) y se obtuvo un  $R^2$  de 0.6675 al comparar ambos resultados (Figura 3) por lo que el modelo presentó un poder predictivo con significancia media.

Cuadro 6. Distribución de muestras de leche cruda según cantidad de células somáticas en base a calidad establecida por la FDA, obtenidas por métodos directo e indirecto.

| Calidad según FDA <sup>‡</sup> | Cantidad de muestras observadas | Cantidad de muestras predichas |
|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| A                              | 58                              | 62                             |
| B                              | 14                              | 10                             |

<sup>‡</sup> Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance 2015

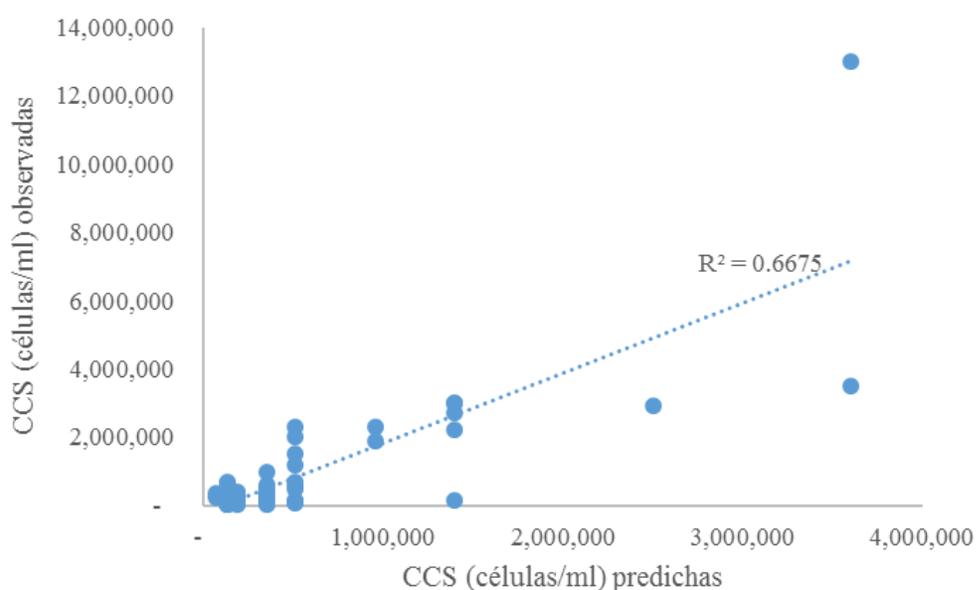


Figura 3. Relación entre resultados observados y predichos por el método indirecto para células somáticas (CCS).

#### Validación del método indirecto.

Se utilizaron 20 muestras recolectadas, a las que se aplicó el análisis directo de CCS bajo microscopio, el método indirecto con la prueba de resazurina y la prueba de azul de metileno para comparar la calidad estimada para cada muestra. Once de las muestras obtenidas provenían de un CREL donde se transportaba la leche bajo el sol, en yogos de plástico o aluminio y la cadena de frío no se cumplía. Las nueve muestras restantes, se obtuvieron de una finca que sí cumplía con buenas prácticas de ordeño manteniendo la cadena de frío para la leche por lo que se trabajaron los grupos de muestras de forma separada.

Las muestras obtenidas de la finca mostraron calidad de grado A en la clasificación establecida por la FDA según los métodos directo e indirecto en todas sus muestras. Las

muestras provenientes del CREL mostraron calidad grado A según el método directo para todas sus muestras y según el método indirecto solo 2 de las muestras fueron grado A. Esta diferencia se dio ya que el método directo bajo microscopio clasificó la leche únicamente según la cantidad de células somáticas, mientras que el método indirecto tomó en cuenta la presencia de BMA. En las muestras del CREL se encontró una alta población de BMA (Cuadro 7) que consumieron el oxígeno durante la prueba de resazurina, acelerando el cambio de coloración y disminuyendo la calidad predicha según este método.

Cuadro 7. Distribución de muestras de leche cruda según calidad de acuerdo a FDA en base a método directo e indirecto y su resultado de bacterias mesófilas aerobias (BMA).

| Productor | Calidad según resazurina <sup>£</sup> | CDM <sup>¥</sup> (células/ml) | Calidad | CCS <sup>€</sup> (células/ml) predicha | Calidad | BMA <sup>^</sup> (UFC/ml) |
|-----------|---------------------------------------|-------------------------------|---------|--|---------|---------------------------|
| Finca     | 5.0                                   | 183,480                       | A       | 190,000                                | A       | 11,000                    |
| Finca     | 5.0                                   | 227,960                       | A       | 190,000                                | A       | 16,000                    |
| Finca     | 4.5                                   | 231,667                       | A       | 350,000                                | A       | 18,000                    |
| Finca     | 4.5                                   | 140,853                       | A       | 350,000                                | A       | 21,000                    |
| Finca     | 4.5                                   | 239,080                       | A       | 350,000                                | A       | 9,000                     |
| Finca     | 5.0                                   | 274,293                       | A       | 190,000                                | A       | 5,200                     |
| Finca     | 4.5                                   | 211,280                       | A       | 350,000                                | A       | 5,600                     |
| Finca     | 5.0                                   | 259,467                       | A       | 190,000                                | A       | 5,700                     |
| Finca     | 5.0                                   | 266,880                       | A       | 190,000                                | A       | 5,100                     |
| CREL      | 3.0                                   | 396,613                       | A       | 1,400,000                              | B       | 1,500,000                 |
| CREL      | 3.0                                   | 372,520                       | A       | 1,400,000                              | B       | 310,000                   |
| CREL      | 3.0                                   | 378,080                       | A       | 1,400,000                              | B       | 320,000                   |
| CREL      | 3.0                                   | 374,373                       | A       | 1,400,000                              | B       | 610,000                   |
| CREL      | 3.0                                   | 316,920                       | A       | 1,400,000                              | B       | 330,000                   |
| CREL      | 4.0                                   | 148,267                       | A       | 510,000                                | A       | 530,000                   |
| CREL      | 3.0                                   | 350,280                       | A       | 1,400,000                              | B       | 800,000                   |
| CREL      | 3.5                                   | 285,413                       | A       | 955,000                                | B       | 110,000                   |
| CREL      | 3.5                                   | 257,613                       | A       | 955,000                                | B       | 340,000                   |
| CREL      | 3.0                                   | 161,240                       | A       | 1,400,000                              | B       | 270,000                   |
| CREL      | 4.0                                   | 426,267                       | A       | 510,000                                | A       | 26,000                    |

<sup>£</sup> Mayor calidad =6 menor calidad =1

<sup>¥</sup> Conteo directo al microscopio

<sup>€</sup> Conteo de células somáticas

<sup>^</sup> Bacterias mesófilas aerobias según método de vaciado en placa

Con los resultados obtenidos mediante la prueba de metileno, se predijo la cantidad de BMA que tendría cada muestra en base a la ecuación propuesta por Morales (2005) donde la

variable dependiente representa la cantidad de BMA en log UFC/ml y la variable dependiente x el tiempo en horas necesario para que se redujera completamente el azul de metileno.

$$y = -0.51738x + 7.10292 \quad [2]$$

Al comparar los resultados predichos mediante la ecuación 2 con los valores reales obtenidos por el método directo, se encontró un  $R^2$  de 10.61% (Figura 4) siendo muy bajo para ser considerado como significativo dentro del estudio. Las posibles causas de variación entre los resultados fueron la presencia de bacterias anaerobias facultativas y células somáticas que pudieron afectar los resultados de la prueba de azul de metileno e interferir en la predicción mediante la ecuación.

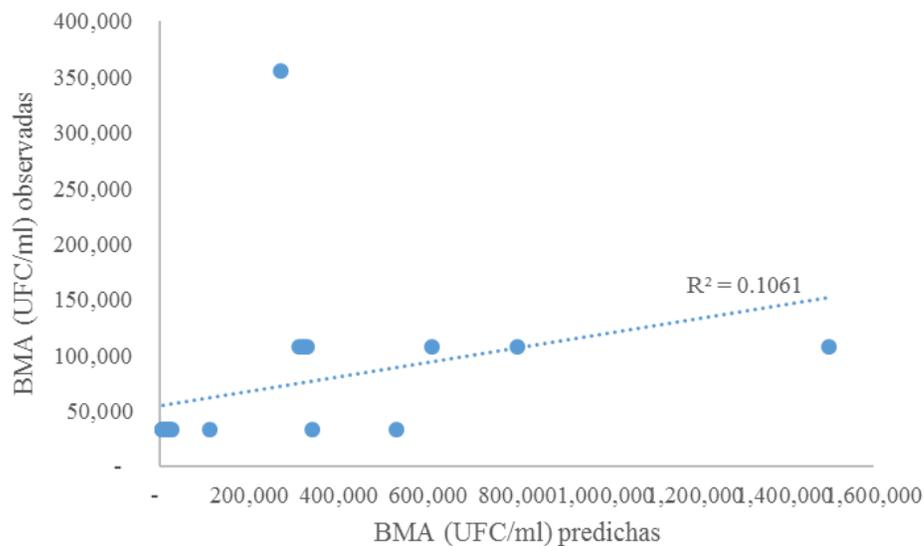


Figura 4. Relación entre resultados observados y predichos por la ecuación  $y = -0.51738x + 7.10292$  (Morales 2005) para bacterias mesófilas aerobias (BMA).

Finalmente, se aplicó la prueba de Mann-Whitney para evaluar la diferencia o similitud entre la cantidad de CCS observadas por el método directo y predichas con el método indirecto para las muestras provenientes de la finca y del CREL de manera separada. Se obtuvo una probabilidad de 0.65 para la finca, indicando que ambos resultados fueron estadísticamente iguales y por lo tanto, el método sí fue capaz de predecir la calidad. Para las muestras provenientes de CREL se obtuvo una probabilidad de 0 indicando que los resultados obtenidos de manera directa e indirecta fueron estadísticamente diferentes y el método no predijo la calidad de la leche según CCS.

## 4. CONCLUSIONES

- Existe una correlación de significancia media entre células somáticas y la prueba de resazurina.
- No se encontró una correlación entre los recuentos de bacterias mesófilas aerobias con el potencial de óxido reducción ni la prueba de resazurina.
- La estimación de células somáticas en función del resultado de la prueba de resazurina presentó un ajuste medio entre los resultados obtenidos por el método directo y el método indirecto.
- El método indirecto desarrollado se aplica únicamente en fincas que cumplan con buenas prácticas de ordeño.

## 5. RECOMENDACIONES

- Utilizar la prueba de resazurina de tres horas para identificar el cambio de coloración de manera más clara.
- Utilizar un espectrofotómetro para evaluar la exactitud de la calidad de leche cruda a través de colorantes como azul de metileno o resazurina.
- Realizar un muestreo de la cantidad de células somáticas presentes en la producción de leche en la región, para establecer un límite máximo para calidad de leche A.
- Tomar más muestras durante diferentes épocas del año para elevar el  $R^2$  de la ecuación de regresión.
- Considerar un modelo de regresión no lineal para evaluar el comportamiento de las variables.

## 6. LITERATURA CITADA

Aqueveque YC. 2007. Evaluación del recuento de células somáticas en leche de los Centros de acopio asdritos al centro de gestión agrícola de Río Bueno, Región de los Rios. Chile: Universidad Austral de Chile. 108 p.

Borjas J, editor. 2013. Estudio sectorial: El mercado de leche y sus derivados en Honduras. Honduras: CDPC. 84 p.

Bouman M, editor. 2008. Células somáticas: cómo interpretar los datos. Uruguay: COLAVECO. 5 p.

Campbell KH. 2012. Using Milk Somatic Cell Count Information. Extension Dairy Specialist; [consultado 2017 Sep 9].

Chuchuca G, Dick A, Peñafiel J. 2012. Implementación y validación de una metodología económica para la medición de color aplicada a alimentos. Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral. 138 p.

Clark M. 2017. Raw Milk State Laws and Regulations - Real Raw Milk Facts. Estados Unidos; [consultado 2017 Sep 6]. <http://www.realrawmilkfacts.com/raw-milk-regulations>.

COFOCALEC. 2012. Proyecto de Norma Mexicana: Sistema producto leche. Leche cruda de vaca. Especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba; [consultado 2017 Sep 2].

Corbellini CN. 2016. La Mastitis Bovina y su Impacto sobre Calidad de Leche. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 12 p.

Drici H. 2016. Microbiological quality of raw and pasteurized milk. Argelia: University Centre of Tamanghasset. 24 p.

FDA/CFSAN. 2015. Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance. Estados Unidos. 447 p. <https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/milk/ucm513508.pdf>.

Hernández JM, Bedolla JLC. 2009. Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. Revista electrónica de veterinaria. 9(9):1-34.

Jenitta BM, Sherly J, Mohan K. 2014. Studies on microbial quantity and dissolved oxygen content of raw chilled milk samples based on methylene blue reduction test and oxidation reduction potential. *International Journal of Engineering and Technical Research*. 2(9):159–164.

Maturin L, Peeler JT. 2001. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 3: Aerobic Plate Count. USA: FDA; [consultado 2017 Ago 4]. en. <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm063346.htm>.

Molina DO, editor. 2010. *Análisis de cadena de valor láctea de Honduras*. Honduras: PYMERURAL, PRONAGRO/SAG. 52 p.

Morales SDLÁ. 2005. *Predicción de conteos microbiológicos en leche cruda con base en la prueba de azul de metileno*. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 51 p.

Murphy SC, Martin NH, Barbano DM, Wiedmann M. 2016. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *J Dairy Sci*. 99(12):10128–10149. eng. doi:10.3168/jds.2016-11172.

Murray Brown Laboratories. 2017. *Aerobic Plate Count*. USA; [actualizado 2017 Ago 4; consultado 2017 Ago 4]. <http://mb-labs.com/resources/aerobic-plate-count/>.

Posas F, Rodríguez I, Osorio L, Vásquez M. 2013. *Control de calidad en Centros de Recolección y Enfriamiento de Leche (CREL)*. Tegucigalpa, Honduras. 24 p. (Innovaciones tecnológicas).

Rodríguez L. 2016. En más de 25 millones de litros al año crecerá la producción de leche. *El Heraldo*.

Silva N, Bastos L, Oliveira D, Oliveira M, Fonseca LM. 2012. Influence of somatic cell count and total bacterial counts of raw milk in cheese yield using small-scale methodology. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 64(5):1367–1372. doi:10.1590/S0102-09352012000500038.

Sitta G, Coussens N, Brimacombe K, Grossman A, Michelle A, Auld D, Austin C, Baell J. 2017. *Assay Guidance Manual*. USA: Bethesda. 1146 p.

Walstra P. 1999. *Dairy technology: Principles of milk properties and processes* / P. Walstra [et al.]. New York: Marcel Dekker (Food science & technology; vol. 90). ISBN: 0-8247-0228-X.

Webb BH, Johnson AH, Alford JA. 1974. *Fundamentals of dairy chemistry*. 2nd ed. Westport Conn: AVI Publication. ISBN: 0-87055-143-4.

Wehr HM, Frank JF. 2004. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. Estados Unidos: American Public Health Association. ISBN: 978-0-87553-002-4.

Zambrano JJ, Grass JF. 2008. Valoración de la calidad higiénica de la leche cruda en la asociación de leche de Sotará-Asproleso, mediante las pruebas indirectas de resazurina y azul de metileno. Facultad de ciencias agropecuarias. 6(2):56–66.

Zamorán D, editor. 2012. Manual de Procesamiento Lácteo: Proyecto de cooperación para el mejoramiento tecnológico de la producción láctea en las micro y pequeñas empresas de los departamentos de Boaco, Chontales y Matagalpa. Nicaragua. 57 p.

Zemanate DA, Grass JF. 2005. Relación de resultados entre pruebas de resazurina y conteo de células somáticas para la determinación de la calidad higiénica y sanitaria de la leche y los efectos de elevados números de células somáticas en la calidad de la leche procesada. Rev. Facultad de ciencias agropecuarias. 3(1):104–109.

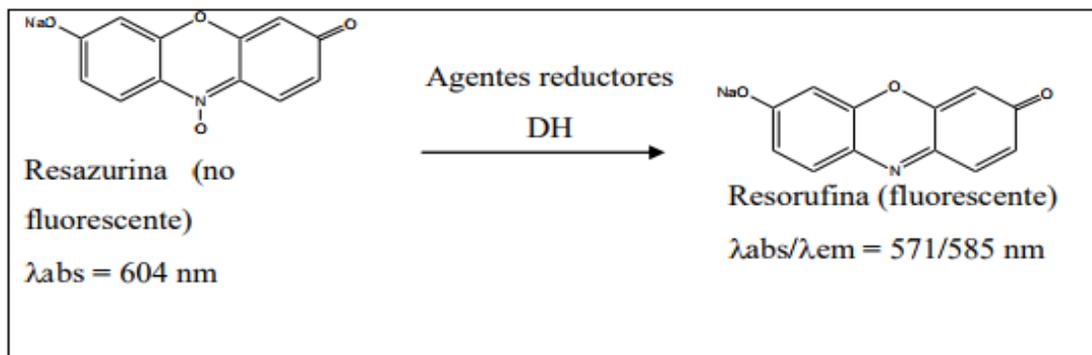
## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Sistemas de óxido reducción y sustancias que causan disminución en el potencial de óxido reducción en la leche cruda.

| Enzima                               | Sustrato                                 | $E_o$ a pH 7  |
|--------------------------------------|--|---------------|
| Dehidrogenasas                       | Alcohol etílico                          | -0,090 – 0,16 |
|                                      | Ácido láctico                            | -0,18         |
|                                      | Ácido málico                             | -0,10         |
|                                      | Glucosa                                  | -0,45         |
|                                      | Ácido glutámico                          | -0,03         |
|                                      | Ácido succínico                          | 0,01          |
|                                      | Hipoxantina, aldehídos                   | -0,37         |
|                                      | Xantino                                  | -0,37         |
| Oxid-sas                             | Citocromo C reducido                     | 0,27          |
|                                      | Ácido ascórbico                          | 0,078-0,05    |
| Peroxidasas<br>(requieren $H_2O_2$ ) | Aminas aromáticas y fenoles en la leche. | -0,27         |
|                                      | Citocromo reducido                       | -0,208        |
|                                      | Glutation                                | -0,233        |

**Anexo 2.** Mecanismo de acción de la resazurina.

La resazurina es una oxazona que permite que la leche adquiera color azul y se reduce con la disminución del oxígeno presente en un medio. Este compuesto se convierte en resorufina que presenta un color rojo-rosa, si la reducción continúa (por efecto de una alta población bacteriana) se forma la dehidroresorufina que es incoloro (Maracaibo 2003).



Fuente: Favela 2012.

**Anexo 3.** Distribución de muestras de leche cruda con los resultados para BMA, CCS, ORP y Resazurina.

| Número de muestra | BMA (UFC/ml) <sup>§</sup> | BMA (Log UFC/ml) <sup>¥</sup> | CDM (CCS/ml) <sup>€</sup> | CDM (Log CCS/ml) <sup>Ƨ</sup> | ORP (mV) <sup>^</sup> | Calidad según resazurina <sup>æ</sup> |
|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 1                 | 2,200                     | 3.34                          | 300,000                   | 5.48                          | 84.5                  | 5.5                                   |
| 2                 | 1,100                     | 3.04                          | 94,000                    | 4.97                          | 69.4                  | 5.5                                   |
| 3                 | 320                       | 2.51                          | 87,000                    | 4.94                          | 53.6                  | 4.0                                   |
| 4                 | 1,900                     | 3.28                          | 110,000                   | 5.04                          | 67.8                  | 5.0                                   |
| 5                 | 4,900                     | 3.69                          | 3,000,000                 | 6.48                          | 51.1                  | 3.0                                   |
| 6                 | 7,600                     | 3.88                          | 1,900,000                 | 6.28                          | 51.8                  | 3.5                                   |
| 7                 | 20,000                    | 4.30                          | 2,000,000                 | 6.30                          | 50.4                  | 4.0                                   |
| 8                 | 5,200                     | 3.72                          | 150,000                   | 5.18                          | 53.7                  | 4.0                                   |
| 9                 | 180,000                   | 5.26                          | 420,000                   | 5.62                          | 55.1                  | 4.5                                   |
| 10                | 16,000                    | 4.20                          | 1,500,000                 | 6.18                          | 31.0                  | 4.0                                   |
| 11                | 6,000                     | 3.78                          | 220,000                   | 5.34                          | 51.9                  | 6.0                                   |
| 12                | 3,900                     | 3.59                          | 39,000                    | 4.59                          | 49.6                  | 5.5                                   |
| 13                | 52,000                    | 4.72                          | 720,000                   | 5.86                          | 40.0                  | 6.0                                   |
| 14                | 1,800                     | 3.26                          | 800,000                   | 5.90                          | 27.2                  | 3.0                                   |
| 15                | 3,000                     | 3.48                          | 3,500,000                 | 6.54                          | 62.7                  | 2.0                                   |

| Número de muestra | BMA (UFC/ml) <sup>£</sup> | BMA (Log UFC/ml) <sup>¥</sup> | CDM (CCS/ml) <sup>€</sup> | CDM (Log CCS/ml) <sup>κ</sup> | ORP (mV) <sup>A</sup> | Calidad según resazurina <sup>æ</sup> |
|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 16                | 6,100                     | 3.79                          | 960,000                   | 5.98                          | 56.1                  | 4.5                                   |
| 17                | 21,000                    | 4.32                          | 2,300,000                 | 6.36                          | 55.6                  | 3.5                                   |
| 18                | 4,400                     | 3.64                          | 470,000                   | 5.67                          | 55.6                  | 4.0                                   |
| 19                | 6,500                     | 3.81                          | 360,000                   | 5.56                          | 63.1                  | 6.0                                   |
| 20                | 1,200                     | 3.08                          | 2,900,000                 | 6.46                          | 51.3                  | 2.5                                   |
| 21                | 10,000                    | 4.00                          | 700,000                   | 5.85                          | 32.3                  | 5.5                                   |
| 22                | 72,000                    | 4.86                          | 3,000,000                 | 6.48                          | 53.8                  | 3.0                                   |
| 23                | 1,600                     | 3.20                          | 230,000                   | 5.36                          | 53.8                  | 5.5                                   |
| 24                | 3,800                     | 3.58                          | 280,000                   | 5.45                          | 49.6                  | 5.5                                   |
| 25                | 2,400                     | 3.38                          | 160,000                   | 5.20                          | 44.5                  | 5.5                                   |
| 26                | 5,900                     | 3.77                          | 270,000                   | 5.43                          | 54.6                  | 5.5                                   |
| 27                | 1,600                     | 3.20                          | 640,000                   | 5.81                          | 78.6                  | 5.5                                   |
| 28                | 2,200                     | 3.34                          | 56,000                    | 4.75                          | 55.0                  | 5.5                                   |
| 29                | 14,000                    | 4.15                          | 250,000                   | 5.40                          | 57.6                  | 4.5                                   |
| 30                | 110,000                   | 5.04                          | 2,200,000                 | 6.34                          | 57.0                  | 3.0                                   |
| 31                | 4,400                     | 3.64                          | 35,000                    | 4.54                          | 54.3                  | 5.5                                   |
| 32                | 2,600                     | 3.41                          | 63,000                    | 4.80                          | 52.6                  | 5.0                                   |
| 33                | 3,000                     | 3.48                          | 41,000                    | 4.61                          | 70.5                  | 5.0                                   |
| 34                | 2,900                     | 3.46                          | 80,000                    | 4.90                          | 79.0                  | 5.0                                   |
| 35                | 240,000                   | 5.38                          | 37,000                    | 4.57                          | 63.5                  | 4.5                                   |
| 36                | 3,200                     | 3.51                          | 360,000                   | 5.56                          | 57.0                  | 5.5                                   |
| 37                | 230,000                   | 5.36                          | 270,000                   | 5.43                          | 60.1                  | 5.5                                   |
| 38                | 24,000                    | 4.38                          | 460,000                   | 5.66                          | 46.9                  | 4.5                                   |
| 39                | 980                       | 2.99                          | 330,000                   | 5.52                          | 62.6                  | 4.0                                   |
| 40                | 530                       | 2.72                          | 200,000                   | 5.30                          | 53.7                  | 5.5                                   |
| 41                | 55,000                    | 4.74                          | 130,000                   | 5.11                          | 61.7                  | 4.0                                   |
| 42                | 670                       | 2.83                          | 140,000                   | 5.15                          | 50.1                  | 5.5                                   |
| 43                | 46,000                    | 4.66                          | 61,000                    | 4.79                          | 56.4                  | 5.5                                   |
| 44                | 170                       | 2.23                          | 110,000                   | 5.04                          | 51.0                  | 5.0                                   |
| 45                | 130                       | 2.11                          | 170,000                   | 5.23                          | 46.5                  | 3.0                                   |
| 46                | 2,100,000                 | 6.32                          | 16,000,000                | 7.20                          | 38.1                  | 2.5                                   |
| 47                | 960                       | 2.98                          | 120,000                   | 5.08                          | 54.4                  | 4.5                                   |
| 48                | 450                       | 2.65                          | 2,700,000                 | 6.43                          | 34.5                  | 3.0                                   |
| 49                | 3,400                     | 3.53                          | 2,300,000                 | 6.36                          | 43.5                  | 4.0                                   |
| 50                | 19,000                    | 4.28                          | 410,000                   | 5.61                          | 45.6                  | 5.0                                   |
| 51                | 1,300                     | 3.11                          | 270,000                   | 5.43                          | 45.8                  | 5.0                                   |
| 52                | 1,100,000                 | 6.04                          | 700,000                   | 5.85                          | 36.5                  | 4.0                                   |

| Número de muestra | BMA (UFC/ml) <sup>£</sup> | BMA (Log UFC/ml) <sup>¥</sup> | CDM (CCS/ml) <sup>€</sup> | CDM (Log CCS/ml) <sup>κ</sup> | ORP (mV) <sup>A</sup> | Calidad según resazurina <sup>æ</sup> |
|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 53                | 1,400                     | 3.15                          | 340,000                   | 5.53                          | 42.3                  | 5.0                                   |
| 54                | 650                       | 2.81                          | 610,000                   | 5.79                          | 95.3                  | 4.5                                   |
| 55                | 52,000                    | 4.72                          | 52,000                    | 4.72                          | 66.9                  | 5.5                                   |
| 56                | 1,700                     | 3.23                          | 120,000                   | 5.08                          | 53.8                  | 5.0                                   |
| 57                | 880                       | 2.94                          | 54,000                    | 4.73                          | 53.6                  | 4.5                                   |
| 58                | 1,700,000                 | 6.23                          | 110,000                   | 5.04                          | 45.6                  | 4.0                                   |
| 59                | 6,300                     | 3.80                          | 41,000                    | 4.61                          | 48.9                  | 5.5                                   |
| 60                | 770                       | 2.89                          | 320,000                   | 5.51                          | 48.8                  | 4.5                                   |
| 61                | 470                       | 2.67                          | 100,000                   | 5.00                          | 56.5                  | 5.0                                   |
| 62                | 3,000                     | 3.48                          | 1,200,000                 | 6.08                          | 49.2                  | 4.0                                   |
| 63                | 150                       | 2.18                          | 13,000,000                | 7.11                          | 38.7                  | 2.0                                   |
| 64                | 23,000                    | 4.36                          | 420,000                   | 5.62                          | 53.8                  | 5.5                                   |
| 65                | 750                       | 2.88                          | 96,000                    | 4.98                          | 52.6                  | 5.0                                   |
| 66                | 1,000                     | 3.00                          | 250,000                   | 5.40                          | 54.6                  | 5.5                                   |
| 67                | 620                       | 2.79                          | 280,000                   | 5.45                          | 64.1                  | 5.0                                   |
| 68                | 80                        | 1.90                          | 56,000                    | 4.75                          | 71.6                  | 5.5                                   |
| 69                | 760                       | 2.88                          | 560,000                   | 5.75                          | 70.2                  | 4.0                                   |
| 70                | 91,000                    | 4.96                          | 440,000                   | 5.64                          | 61.5                  | 5.5                                   |
| 71                | 13,000                    | 4.11                          | 200,000                   | 5.30                          | 60.4                  | 5.0                                   |
| 72                | 29,000                    | 4.46                          | 120,000                   | 5.08                          | 58.5                  | 5.0                                   |
| 73                | 80                        | 1.90                          | 70,000                    | 4.85                          | 52.8                  | 5.0                                   |
| 74                | 58,000                    | 4.76                          | 530,000                   | 5.72                          | 58.1                  | 5.0                                   |
| 75                | 350                       | 2.54                          | 520,000                   | 5.72                          | 55.4                  | 4.5                                   |
| 76                | 12,000                    | 4.08                          | 310,000                   | 5.49                          | 51.1                  | 4.5                                   |
| 77                | 23,000                    | 4.36                          | 11,000,000                | 7.04                          | 41.0                  | 1.0                                   |
| 78                | 4,000                     | 3.60                          | 2,100,000                 | 6.32                          | 30.6                  | 2.0                                   |
| 79                | 290,000                   | 5.46                          | 2,300,000                 | 6.36                          | 56.1                  | 5.5                                   |
| 80                | 110,000                   | 5.04                          | 2,300,000                 | 6.36                          | 50.0                  | 5.5                                   |
| 81                | 190,000                   | 5.28                          | 760,000                   | 5.88                          | 50.9                  | 5.5                                   |
| 82                | 170,000                   | 5.23                          | 490,000                   | 5.69                          | 52.7                  | 4.5                                   |
| 83                | 60,000                    | 4.78                          | 870,000                   | 5.94                          | 49.5                  | 5.0                                   |
| 84                | 3,550,000                 | 6.55                          | 130,000                   | 5.11                          | 44.1                  | 3.0                                   |
| 85                | 180,000                   | 5.26                          | 89,000                    | 4.95                          | 29.5                  | 4.5                                   |
| 86                | 2,400,000                 | 6.38                          | 200,000                   | 5.30                          | 37.9                  | 4.5                                   |
| 87                | 627,000                   | 5.80                          | 100,000                   | 5.00                          | 41.5                  | 5.0                                   |
| 88                | 252,000                   | 5.40                          | 150,000                   | 5.18                          | 42.9                  | 4.5                                   |
| 89                | 440,000                   | 5.64                          | 910,000                   | 5.96                          | 50                    | 4.5                                   |

| Número de muestra | BMA (UFC/ml) <sup>£</sup> | BMA (Log UFC/ml) <sup>¥</sup> | CDM (CCS/ml) <sup>€</sup> | CDM (Log CCS/ml) <sup>Ɔ</sup> | ORP (mV) <sup>A</sup> | Calidad según resazurina <sup>æ</sup> |
|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 90                | 104,000                   | 5.02                          | 180,000                   | 5.26                          | 44.9                  | 4.5                                   |
| 91                | 580,000                   | 5.76                          | 360,000                   | 5.56                          | 45.6                  | 6.0                                   |
| 92                | 87,000                    | 4.94                          | 140,000                   | 5.15                          | 49.8                  | 6.0                                   |
| 93                | 920,000                   | 5.96                          | 560,000                   | 5.75                          | 60.3                  | 3.0                                   |
| 94                | 470                       | 2.67                          | 70,000                    | 4.85                          | 73.7                  | 6.0                                   |
| 95                | 120,000                   | 5.08                          | 590,000                   | 5.77                          | 46.0                  | 4.0                                   |
| 96                | 190,000                   | 5.28                          | 250,000                   | 5.40                          | 51.8                  | 5.5                                   |
| 97                | 120,000                   | 5.08                          | 780,000                   | 5.89                          | 34.4                  | 2.0                                   |
| 98                | 150,000                   | 5.18                          | 320,000                   | 5.51                          | 35.5                  | 3.5                                   |
| 99                | 120,000                   | 5.08                          | 520,000                   | 5.72                          | 32.8                  | 4.0                                   |
| 100               | 94,000                    | 4.97                          | 390,000                   | 5.59                          | 43.6                  | 5.0                                   |

<sup>£</sup> Conteo de bacterias mesófilas aerobias mediante vaciado en placa en agar cuenta estándar

<sup>¥</sup> Logaritmo base 10 del conteo de bacterias mesófilas aerobias

<sup>€</sup> Conteo Directo al Microscopio de células somáticas por método de Prescott-Breed

<sup>Ɔ</sup> Logaritmo base 10 del conteo de células somáticas

<sup>A</sup> Potencial de óxido reducción

<sup>æ</sup> Clasificación de calidad según Zemanate y Grass 2005

**Anexo 4.** Análisis de correlación entre BMA, CCS, ORP y resazurina mediante el programa “Statistical Analysis System 9.4<sup>®</sup>”.

**Pearson Correlation Coefficients, N = 72**

**Prob > |r| under H0: Rho=0**

|            | RES <sup>£</sup> | ORP <sup>¥</sup> | BMA <sup>€</sup> | CCS <sup>A</sup> |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>RES</b> | 1                | 0.2218           | -0.0431          | -0.6720          |
|            |                  | 0.0611           | 0.7192           | <.0001           |
| <b>ORP</b> | 0.2218           | 1                | -0.2558          | -0.1901          |
|            | 0.0611           |                  | 0.0301           | 0.1097           |
| <b>BMA</b> | -0.0431          | -0.2558          | 1                | 0.0128           |
|            | 0.7192           | 0.0301           |                  | 0.9146           |
| <b>CCS</b> | -0.6720          | -0.1901          | 0.0128           | 1                |
|            | <.0001           | 0.1097           | 0.9146           |                  |

<sup>£</sup> Prueba de resazurina de 1 h a  $36 \pm 1$  °C

<sup>¥</sup> Potencial de óxido reducción (mV)

<sup>€</sup> Bacterias mesófilas aerobias

<sup>A</sup> Células somáticas

**Anexo 5.** Análisis de regresión para células somáticas y resazurina mediante el programa “Statistical Analysis System 9.4®”.

**Parameter Estimates**

| Variable               | DF       | Parameter Estimate | Standard Error | t Value | Pr >  t | Variance Inflation |
|------------------------|----------|--------------------|----------------|---------|---------|--------------------|
| <b>Intercept</b>       | <b>1</b> | 7.40742            | 0.26333        | 28.13   | <.0001  | 0                  |
| <b>RES<sup>£</sup></b> | <b>1</b> | -0.424             | 0.05585        | -7.59   | <.0001  | 1                  |

<sup>£</sup> Prueba de resazurina de 1 h a  $36 \pm 1$  °C

**Anexo 6.** Distribución de muestras de leche cruda provenientes de vacas con los resultados para BMA, CCS, ORP y Resazurina.

| Número de muestra | BMA (UFC/ml) <sup>£</sup> | BMA (Log UFC/ml) <sup>¥</sup> | CDM (CCS/ml) <sup>€</sup> | CDM (Log CCS/ml) <sup>κ</sup> | ORP (mV) <sup>A</sup> | Calidad según resazurina <sup>æ</sup> |
|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 1                 | 2,200                     | 3.34                          | 300,000                   | 5.48                          | 84.5                  | 5.5                                   |
| 2                 | 1,100                     | 3.04                          | 94,000                    | 4.97                          | 69.4                  | 5.5                                   |
| 3                 | 320                       | 2.51                          | 87,000                    | 4.94                          | 53.6                  | 4.0                                   |
| 4                 | 1,900                     | 3.28                          | 110,000                   | 5.04                          | 67.8                  | 5.0                                   |
| 5                 | 4,900                     | 3.69                          | 3,000,000                 | 6.48                          | 51.1                  | 3.0                                   |
| 6                 | 7,600                     | 3.88                          | 1,900,000                 | 6.28                          | 51.8                  | 3.5                                   |
| 7                 | 20,000                    | 4.30                          | 2,000,000                 | 6.30                          | 50.4                  | 4.0                                   |
| 8                 | 5,200                     | 3.72                          | 150,000                   | 5.18                          | 53.7                  | 4.0                                   |
| 9                 | 180,000                   | 5.26                          | 420,000                   | 5.62                          | 55.1                  | 4.5                                   |
| 10                | 16,000                    | 4.20                          | 1,500,000                 | 6.18                          | 31                    | 4.0                                   |
| 11                | 6,000                     | 3.78                          | 220,000                   | 5.34                          | 51.9                  | 6.0                                   |
| 12                | 3,900                     | 3.59                          | 39,000                    | 4.59                          | 49.6                  | 5.5                                   |
| 15                | 3,000                     | 3.48                          | 3,500,000                 | 6.54                          | 62.7                  | 2.0                                   |
| 16                | 6,100                     | 3.79                          | 960,000                   | 5.98                          | 56.1                  | 4.5                                   |
| 17                | 21,000                    | 4.32                          | 2,300,000                 | 6.36                          | 55.6                  | 3.5                                   |
| 18                | 4,400                     | 3.64                          | 470,000                   | 5.67                          | 55.6                  | 4.0                                   |
| 19                | 6,500                     | 3.81                          | 360,000                   | 5.56                          | 63.1                  | 6.0                                   |
| 20                | 1,200                     | 3.08                          | 2,900,000                 | 6.46                          | 51.3                  | 2.5                                   |
| 21                | 10,000                    | 4.00                          | 700,000                   | 5.85                          | 32.3                  | 5.5                                   |
| 22                | 72,000                    | 4.86                          | 3,000,000                 | 6.48                          | 53.8                  | 3.0                                   |

| Número de muestra | BMA (UFC/ml) <sup>£</sup> | BMA (Log UFC/ml) <sup>¥</sup> | CDM (CCS/ml) <sup>€</sup> | CDM (Log CCS/ml) <sup>κ</sup> | ORP (mV) <sup>A</sup> | Calidad según resazurina <sup>æ</sup> |
|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 23                | 1,600                     | 3.20                          | 230,000                   | 5.36                          | 53.8                  | 5.5                                   |
| 24                | 3,800                     | 3.58                          | 280,000                   | 5.45                          | 49.6                  | 5.5                                   |
| 25                | 2,400                     | 3.38                          | 160,000                   | 5.20                          | 44.5                  | 5.5                                   |
| 26                | 5,900                     | 3.77                          | 270,000                   | 5.43                          | 54.6                  | 5.5                                   |
| 27                | 1,600                     | 3.20                          | 640,000                   | 5.81                          | 78.6                  | 5.5                                   |
| 28                | 2,200                     | 3.34                          | 56,000                    | 4.75                          | 55                    | 5.5                                   |
| 29                | 14,000                    | 4.15                          | 250,000                   | 5.40                          | 57.6                  | 4.5                                   |
| 30                | 110,000                   | 5.04                          | 2,200,000                 | 6.34                          | 57                    | 3.0                                   |
| 31                | 4,400                     | 3.64                          | 35,000                    | 4.54                          | 54.3                  | 5.5                                   |
| 32                | 2,600                     | 3.41                          | 63,000                    | 4.80                          | 52.6                  | 5.0                                   |
| 33                | 3,000                     | 3.48                          | 41,000                    | 4.61                          | 70.5                  | 5.0                                   |
| 34                | 2,900                     | 3.46                          | 80,000                    | 4.90                          | 79                    | 5.0                                   |
| 35                | 240,000                   | 5.38                          | 37,000                    | 4.57                          | 63.5                  | 4.5                                   |
| 36                | 3,200                     | 3.51                          | 360,000                   | 5.56                          | 57                    | 5.5                                   |
| 37                | 230,000                   | 5.36                          | 270,000                   | 5.43                          | 60.1                  | 5.5                                   |
| 38                | 24,000                    | 4.38                          | 460,000                   | 5.66                          | 46.9                  | 4.5                                   |
| 40                | 530                       | 2.72                          | 200,000                   | 5.30                          | 53.7                  | 5.5                                   |
| 41                | 55,000                    | 4.74                          | 130,000                   | 5.11                          | 61.7                  | 4.0                                   |
| 42                | 670                       | 2.83                          | 140,000                   | 5.15                          | 50.1                  | 5.5                                   |
| 43                | 46,000                    | 4.66                          | 61,000                    | 4.79                          | 56.4                  | 5.5                                   |
| 44                | 170                       | 2.23                          | 110,000                   | 5.04                          | 51                    | 5.0                                   |
| 45                | 130                       | 2.11                          | 170,000                   | 5.23                          | 46.5                  | 3.0                                   |
| 47                | 960                       | 2.98                          | 120,000                   | 5.08                          | 54.4                  | 4.5                                   |
| 48                | 450                       | 2.65                          | 2,700,000                 | 6.43                          | 34.5                  | 3.0                                   |
| 49                | 3,400                     | 3.53                          | 2,300,000                 | 6.36                          | 43.5                  | 4.0                                   |
| 50                | 19,000                    | 4.28                          | 410,000                   | 5.61                          | 45.6                  | 5.0                                   |
| 51                | 1,300                     | 3.11                          | 270,000                   | 5.43                          | 45.8                  | 5.0                                   |
| 52                | 1,100,000                 | 6.04                          | 700,000                   | 5.85                          | 36.5                  | 4.0                                   |
| 53                | 1,400                     | 3.15                          | 340,000                   | 5.53                          | 42.3                  | 5.0                                   |
| 54                | 650                       | 2.81                          | 610,000                   | 5.79                          | 95.3                  | 4.5                                   |
| 55                | 52,000                    | 4.72                          | 52,000                    | 4.72                          | 66.9                  | 5.5                                   |
| 56                | 1,700                     | 3.23                          | 120,000                   | 5.08                          | 53.8                  | 5.0                                   |
| 57                | 880                       | 2.94                          | 54,000                    | 4.73                          | 53.6                  | 4.5                                   |
| 58                | 1,700,000                 | 6.23                          | 110,000                   | 5.04                          | 45.6                  | 4.0                                   |
| 59                | 6,300                     | 3.80                          | 41,000                    | 4.61                          | 48.9                  | 5.5                                   |
| 60                | 770                       | 2.89                          | 320,000                   | 5.51                          | 48.8                  | 4.5                                   |

| Número de muestra | BMA (UFC/ml) <sup>£</sup> | BMA (Log UFC/ml) <sup>¥</sup> | CDM (CCS/ml) <sup>€</sup> | CDM (Log CCS/ml) <sup>Ɔ</sup> | ORP (mV) <sup>A</sup> | Calidad según resazurina <sup>æ</sup> |
|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 61                | 470                       | 2.67                          | 100,000                   | 5.00                          | 56.5                  | 5.0                                   |
| 62                | 3,000                     | 3.48                          | 1,200,000                 | 6.08                          | 49.2                  | 4.0                                   |
| 63                | 150                       | 2.18                          | 13,000,000                | 7.11                          | 38.7                  | 2.0                                   |
| 64                | 23,000                    | 4.36                          | 420,000                   | 5.62                          | 53.8                  | 5.5                                   |
| 65                | 750                       | 2.88                          | 96,000                    | 4.98                          | 52.6                  | 5.0                                   |
| 66                | 1,000                     | 3.00                          | 250,000                   | 5.40                          | 54.6                  | 5.5                                   |
| 67                | 620                       | 2.79                          | 280,000                   | 5.45                          | 64.1                  | 5.0                                   |
| 68                | 80                        | 1.90                          | 56,000                    | 4.75                          | 71.6                  | 5.5                                   |
| 69                | 760                       | 2.88                          | 560,000                   | 5.75                          | 70.2                  | 4.0                                   |
| 73                | 80                        | 1.90                          | 70,000                    | 4.85                          | 52.8                  | 5.0                                   |
| 75                | 350                       | 2.54                          | 520,000                   | 5.72                          | 55.4                  | 4.5                                   |
| 76                | 12,000                    | 4.08                          | 310,000                   | 5.49                          | 51.1                  | 4.5                                   |
| 85                | 180,000                   | 5.26                          | 89,000                    | 4.95                          | 29.5                  | 4.5                                   |
| 86                | 2,400,000                 | 6.38                          | 200,000                   | 5.30                          | 37.9                  | 4.5                                   |
| 87                | 627,000                   | 5.80                          | 100,000                   | 5.00                          | 41.5                  | 5.0                                   |
| 88                | 252,000                   | 5.40                          | 150,000                   | 5.18                          | 42.9                  | 4.5                                   |

<sup>£</sup> Conteo de bacterias mesófilas aerobias mediante vaciado en placa en agar cuenta estándar

<sup>¥</sup> Logaritmo base 10 del conteo de bacterias mesófilas aerobias

<sup>€</sup> Conteo Directo al Microscopio de células somáticas por método de Prescott-Breed

<sup>Ɔ</sup> Logaritmo base 10 del conteo de células somáticas

<sup>A</sup> Potencial de óxido reducción

<sup>æ</sup> Clasificación de calidad según Zemanate y Grass 2005

**Anexo 7.** Clasificación de las muestras de leche cruda proveniente de vacas según la calidad establecida por la FDA para los datos observados y los predichos.

| <b>CCS (UFC/ml)</b> | <b>Calidad según FDA</b> | <b>CCS (UFC/ml) predicha</b> | <b>Calidad según FDA</b> |
|---------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 220,000             | A                        | 73,000                       | A                        |
| 360,000             | A                        | 73,000                       | A                        |
| 35,000              | A                        | 130,000                      | A                        |
| 39,000              | A                        | 130,000                      | A                        |
| 41,000              | A                        | 130,000                      | A                        |
| 52,000              | A                        | 130,000                      | A                        |
| 56,000              | A                        | 130,000                      | A                        |
| 56,000              | A                        | 130,000                      | A                        |
| 61,000              | A                        | 130,000                      | A                        |
| 94,000              | A                        | 130,000                      | A                        |
| 140,000             | A                        | 130,000                      | A                        |
| 160,000             | A                        | 130,000                      | A                        |
| 200,000             | A                        | 130,000                      | A                        |
| 230,000             | A                        | 130,000                      | A                        |
| 250,000             | A                        | 130,000                      | A                        |
| 270,000             | A                        | 130,000                      | A                        |
| 270,000             | A                        | 130,000                      | A                        |
| 280,000             | A                        | 130,000                      | A                        |
| 300,000             | A                        | 130,000                      | A                        |
| 360,000             | A                        | 130,000                      | A                        |
| 420,000             | A                        | 130,000                      | A                        |
| 640,000             | A                        | 130,000                      | A                        |
| 700,000             | A                        | 130,000                      | A                        |
| 41,000              | A                        | 190,000                      | A                        |
| 63,000              | A                        | 190,000                      | A                        |
| 70,000              | A                        | 190,000                      | A                        |
| 80,000              | A                        | 190,000                      | A                        |
| 96,000              | A                        | 190,000                      | A                        |
| 100,000             | A                        | 190,000                      | A                        |
| 100,000             | A                        | 190,000                      | A                        |
| 110,000             | A                        | 190,000                      | A                        |
| 110,000             | A                        | 190,000                      | A                        |
| 120,000             | A                        | 190,000                      | A                        |
| 270,000             | A                        | 190,000                      | A                        |

| CCS (UFC/ml) | Calidad según FDA | CCS (UFC/ml) predicha | Calidad según FDA |
|--------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| 280,000      | A                 | 190,000               | A                 |
| 340,000      | A                 | 190,000               | A                 |
| 410,000      | A                 | 190,000               | A                 |
| 37,000       | A                 | 350,000               | A                 |
| 54,000       | A                 | 350,000               | A                 |
| 89,000       | A                 | 350,000               | A                 |
| 120,000      | A                 | 350,000               | A                 |
| 150,000      | A                 | 350,000               | A                 |
| 200,000      | A                 | 350,000               | A                 |
| 250,000      | A                 | 350,000               | A                 |
| 310,000      | A                 | 350,000               | A                 |
| 320,000      | A                 | 350,000               | A                 |
| 420,000      | A                 | 350,000               | A                 |
| 460,000      | A                 | 350,000               | A                 |
| 520,000      | A                 | 350,000               | A                 |
| 610,000      | A                 | 350,000               | A                 |
| 960,000      | B                 | 350,000               | A                 |
| 87,000       | A                 | 510,000               | A                 |
| 110,000      | A                 | 510,000               | A                 |
| 130,000      | A                 | 510,000               | A                 |
| 150,000      | A                 | 510,000               | A                 |
| 470,000      | A                 | 510,000               | A                 |
| 560,000      | A                 | 510,000               | A                 |
| 700,000      | A                 | 510,000               | A                 |
| 1,200,000    | B                 | 510,000               | A                 |
| 1,500,000    | B                 | 510,000               | A                 |
| 2,000,000    | B                 | 510,000               | A                 |
| 2,300,000    | B                 | 510,000               | A                 |
| 1,900,000    | B                 | 955,000               | B                 |
| 2,300,000    | B                 | 955,000               | B                 |
| 170,000      | A                 | 1,400,000             | B                 |
| 2,200,000    | B                 | 1,400,000             | B                 |
| 2,700,000    | B                 | 1,400,000             | B                 |
| 3,000,000    | B                 | 1,400,000             | B                 |
| 3,000,000    | B                 | 1,400,000             | B                 |

| CCS (UFC/ml) | Calidad según FDA | CCS (UFC/ml) predicha | Calidad según FDA |
|--------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| 2,900,000    | B                 | 2,500,000             | B                 |
| 3,500,000    | B                 | 3,600,000             | B                 |
| 13,000,000   | B                 | 3,600,000             | B                 |

**Anexo 8.** Clasificación de muestras de validación según calidad establecida por FDA.

| Productor | Resazurina | CDM (células/ml) | Calidad según FDA | CCS (células/ml) predicha | Calidad según FDA | BMA (UFC/ml) |
|-----------|------------|------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|--------------|
| Finca     | 5.0        | 183,480          | A                 | 190,000                   | A                 | 11,000       |
| Finca     | 5.0        | 227,960          | A                 | 190,000                   | A                 | 16,000       |
| Finca     | 4.5        | 231,667          | A                 | 350,000                   | A                 | 18,000       |
| Finca     | 4.5        | 140,853          | A                 | 350,000                   | A                 | 21,000       |
| Finca     | 4.5        | 239,080          | A                 | 350,000                   | A                 | 9,000        |
| Finca     | 5.0        | 274,293          | A                 | 190,000                   | A                 | 5,200        |
| Finca     | 4.5        | 211,280          | A                 | 350,000                   | A                 | 5,600        |
| Finca     | 5.0        | 259,467          | A                 | 190,000                   | A                 | 5,700        |
| Finca     | 5.0        | 266,880          | A                 | 190,000                   | A                 | 5,100        |
| CREL      | 3.0        | 396,613          | A                 | 1,400,000                 | B                 | 1,500,000    |
| CREL      | 3.0        | 372,520          | A                 | 1,400,000                 | B                 | 310,000      |
| CREL      | 3.0        | 378,080          | A                 | 1,400,000                 | B                 | 320,000      |
| CREL      | 3.0        | 374,373          | A                 | 1,400,000                 | B                 | 610,000      |
| CREL      | 3.0        | 316,920          | A                 | 1,400,000                 | B                 | 330,000      |
| CREL      | 4.0        | 148,267          | A                 | 510,000                   | A                 | 530,000      |
| CREL      | 3.0        | 350,280          | A                 | 1,400,000                 | B                 | 800,000      |
| CREL      | 3.5        | 285,413          | A                 | 955,000                   | B                 | 110,000      |
| CREL      | 3.5        | 257,613          | A                 | 955,000                   | B                 | 340,000      |
| CREL      | 3.0        | 161,240          | A                 | 1,400,000                 | B                 | 270,000      |
| CREL      | 4.0        | 426,267          | A                 | 510,000                   | A                 | 26,000       |

**Anexo 9.** Comparación de los resultados de bacterias mesófilas aerobias (BMA) obtenidos mediante método directo (observadas) y la prueba de azul de metileno (predichas).

| <b>Productor</b> | <b>BMA observadas<br/>(Log UFC/ml)</b> | <b>BMA predichas<br/>(Log UFC/ml)</b> |
|------------------|--|---------------------------------------|
| Finca            | 4.04                                   | 4.52                                  |
| Finca            | 4.20                                   | 4.52                                  |
| Finca            | 4.26                                   | 4.52                                  |
| Finca            | 4.32                                   | 4.52                                  |
| Finca            | 3.95                                   | 4.52                                  |
| Finca            | 3.72                                   | 4.52                                  |
| Finca            | 3.75                                   | 4.52                                  |
| Finca            | 3.76                                   | 4.52                                  |
| Finca            | 3.71                                   | 4.52                                  |
| CREL             | 6.18                                   | 5.03                                  |
| CREL             | 5.49                                   | 5.03                                  |
| CREL             | 5.51                                   | 5.03                                  |
| CREL             | 5.79                                   | 5.03                                  |
| CREL             | 5.52                                   | 5.03                                  |
| CREL             | 5.72                                   | 4.52                                  |
| CREL             | 5.90                                   | 5.03                                  |
| CREL             | 5.04                                   | 4.52                                  |
| CREL             | 4.41                                   | 4.52                                  |
| CREL             | 5.43                                   | 5.55                                  |
| CREL             | 5.53                                   | 4.52                                  |

**Anexo 10.** Prueba de Mann-Whitney para muestras de validación.

Finca

| Método                   | Valor<br>W | Valor<br>p |
|--------------------------|------------|------------|
| No ajustado para empates | 80         | 0.659      |
| Ajustado para empates    | 80         | 0.654      |

CREL

| Método                   | Valor<br>W | Valor<br>p |
|--------------------------|------------|------------|
| No ajustado para empates | 66         | 0          |
| Ajustado para empates    | 66         | 0          |