

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS.**



**APLICACION DE UNA TECNICA ANALITICA VOLUMETRICA EN LA
DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CLORUROS: PARA LA
DETECCION DE MASTITIS EN LECHE DE VACA, EN EL DEPARTAMENTO DE
LA LIBERTAD.**

POR :

JAIME ANTONIO CABRERA CAMPOS.

BORIS ACXILT CASTILLO PANAMEÑO.

ROBERTO ANTONIO CHAVEZ MENDEZ.

SAN SALVADOR, SEPTIEMBRE DE 1995.

7-UES
1304
@117a
1995



01262

Ej 1.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR : DR. JOSE BENJAMIN LOPEZ GUILLEN

SECRETARIO GENERAL: LIC. ENIO LUNA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

DECANO : ING. AGR. HORACIO GIL ZAMBRANA RIVERA

SECRETARIO : ING. AGR. LUIS HOMERO LOPEZ GUARDADO

d) por la Secretaría de la Fac. de C. AA. Oct. 1995.

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

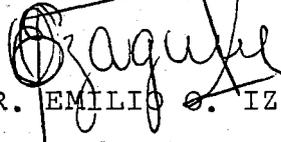


ING. AGR. RAMON ANTONIO GARCIA SALINAS

ASESORES :

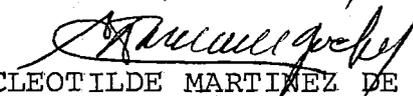


DRA. FRANCISCA CAÑAS DE MORENO



ING. AGR. EMILIO E. IZAGUIRRE MEDINA

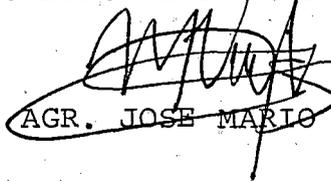
JURADO CALIFICADOR :



LIC. CLEOTILDE MARTINEZ DE GOCHEZ



ING. AGR. DAYSI AVILA DE SOLANO



ING. AGR. JOSE MARIO VIDES SILVA

RESUMEN

El presente estudio se realizó en seis haciendas dedicadas a la producción lechera, localizadas en el Cantón Cangujera, jurisdicción de La Libertad, Departamento de La Libertad, a $12^{\circ}27'4''$ latitud norte y $89^{\circ}10'48''$ longitud oeste, con una elevación de 10 msnm. El objetivo fue evaluar una técnica volumétrica indirecta que sirva a los ganaderos, como una nueva técnica basada en la concentración de cloruros presentes en la leche para la detección de mastitis. Tuvo una duración de 75 días; 45 de los cuales correspondieron a la fase pre-experimental donde se determinó las concentraciones de cloruros normales en leche cruda provenientes de vacas sanas, los 30 días restantes se utilizaron en la fase experimental, la que consistió en la evaluación del método a analizar, sometiendo las muestras de leche a varios análisis.

Se utilizaron 70 vacas encastadas (Brown-Swiss-Brahman), para la toma de muestras. Dichas muestras fueron analizadas en los Laboratorios de Química y Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, así como en los Laboratorios de Microbiología de la Dirección General de Sanidad Vegetal y Animal del M.A.G. Las muestras fueron sometidas a análisis bacteriológicos y químicos y a los resultados obtenidos se les aplicó la prueba de correlación para realizar el análisis estadístico, el cual ayudó a cumplir otro objetivo planteado como es la elabora-

ción de una tabla de probabilidades de concentraciones bacterianas causantes de mastitis, así como establecer los porcentajes de concentraciones de cloruros.

Los resultados obtenidos se les efectuó correlación lineal directa, la cual nos permitió determinar tres tipos de leches: Leches sanas con concentraciones de cloruros de 0.0107 - 0.014% y un máximo de 100 colonias bacterianas; leches en proceso de transición con concentraciones de cloruros de 0.117% - 0.138% y un número variado de colonias bacterianas; leches enfermas con concentraciones de cloruros de 1.148% a más y un mínimo de 1800 colonias bacterianas patógenas.

En base a los resultados se concluyó que las leches sanas y enfermas tienen una relación directamente proporcional entre la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas. En cuanto a las leches en proceso de transición no hay una relación directamente proporcional entre la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas.

AGRADECIMIENTOS

- A LA DRA. FRANCISCA CAÑAS DE MORENO:
Le agradecemos de la manera más sincera y especial, por el asesoramiento brindado y la colaboración desinteresada en la realización del presente trabajo, por sus excelentes aportes en los análisis y procesamiento de los resultados obtenidos.

Gracias por haber confiado en nosotros en la realización de la presente investigación, por permitirnos utilizar los Laboratorios de la Unidad de Química en el transcurso del desarrollo de la investigación.
- AL ING. AGR. EMILIO O. IZAGUIRRE MEDINA :
Por su asesoría y apoyo en la implementación del presente estudio.
- AL DR. FRANCISCO FAGIOLI :
Por su valiosa colaboración.
- A LAS PERSONAS E INSTITUCIONES, que de una u otra forma colaboraron desinteresadamente en la realización del presente trabajo; especialmente a la Lic. CECILIA, encargada del Laboratorio de Microbiología de la Dirección General de Sanidad Animal del M.A.G., a la Unidad de Química y Protección Vegetal de nuestra Facultad, especialmente a Lupita, Oscar, Ing. Lara, Griselda Concepción.
- A LA ASOCIACION DE PRODUCTORES DE LECHE DE EL SALVADOR (PROLECHE), especialmente a Carlos Barahona y don David, por habernos facilitado las haciendas para nuestro estudio.
- AL ING. AGR. FRANCISCO PANAMEÑO, por la orientación acertada en nuestra investigación.

- A LOS MIEMBROS DEL JURADO EVALUADOR :

- Lic. Cleotilde Martínez de Góchez
- Ing. Agr. Daysi Avila de Solano
- Ing. José Mario Vides Silva

Por su colaboración y acertadas observaciones.

- A LA SEÑORA MARINA DEL CARMEN RODRIGUEZ :

Por su ayuda en el mecanografiado del documento.

DEDICATORIA

- A DIOS TODOPODEROSO :
Por iluminar mi mente y guiado durante mis años de estudio y haber atendido mis ruegos para el cumplimiento de mis metas.

- A MI ABUELA MARIA (Q.E.P.D.)
Quien ofreció su sacrificio y amor para ayudarme en to dos los momentos.

- A MI ABUELO ANTONIO :
Quien con su ejemplo de fortaleza me ayuda a superarme.

- A MI MADRE : CLELIA
Que con su amor y sacrificio ayudó a que me realizara - en mi formación profesional.

- A MIS SEGUNDOS PADRES : ANTONIO Y ROSARIO
Por su cariño, apoyo y colaboración.

- A MIS HERMANOS : IVAN, OTTO y LUCY
Por su ejemplo y enseñanzas para lograr mi superación.

- A MIS AMIGOS :
ATLACATL, HUGO, CLAUDIA, SAENZ, LOURDES, BEATRIZ, ANA MA RIA, MARIN, RICARDO, REYNALDO, PERDOMO, OSCAR, ZOMETA, SALVADOR y LUDWING, por habernos dado su amistad y compañerismo; además de que en alguna forma contribuyeron durante mis estudios. Mis más sinceros agradecimientos.

JAI ME ANTONIO CABRERA CAMPOS

DEDICATORIA

- A DIOS TODOPODEROSO :
Por haberme ayudado en mis estudios e iluminar mi mente y por escuchar mis ruegos.

- A MI MADRE CHAVE :
Quien ofreció su sacrificio y amor para ayudarme en los momentos difíciles de mi carrera.

- A MI FUTURA ESPOSA EVELYN :
Por haberme apoyado y comprendido con su amor en los momentos más difíciles de estudiante universitario.

- A MIS HERMANOS :
GLENDA Y ERIC, que con su unión de hermanos y ejemplos, me ayudaron a salir adelante.

- A MIS AMIGOS ESPECIALES :
BEATRIZ, OSCAR, DOUGLAS, LUDWING, CHAMBA, ROBERTO CHAVEZ, YANIRA CRUZ ELIAS, SOFIA CUELLAR, ISAURA y JAIME ANTONIO. Esperando que Dios nos mantenga unidos siempre.

- A MIS COLEGAS Y AMIGOS :
Reynaldo, Perdomo, Ana María, Marín, Ricardo y Lizano.

- MUY EN ESPECIAL A :
Griselda Concepción y María Mercedes, por haberme brindado su ayuda y amistad sincera.

BORIS ACXILT CASTILLO PANAMEÑO

DEDICATORIA

- A DIOS TODOPODEROSO :
Por haberme iluminado y guiado durante mis años de estudio y por estar conmigo en mi vida profesional.

- A MIS PADRES :
OFILIO AQUILES CHAVEZ APARICIO
LILIA MARGOTH MENDEZ GARAY
Por sus esfuerzos, ayuda y apoyo en mi formación y vida profesional.

- A MIS HERMANOS :
JOSE MARVIN CHAVEZ MENDEZ
ROGER OFILIO CHAVEZ MENDEZ
Por sus muestras de apoyo en todo momento.

- A MIS ABUELOS :
JOSE EFRAIN MENDEZ
ROSA ELENA PINEDA
Con amor y cariño

- A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS :
BEATRIZ, ANA MARIA, MARIN, RICARDO, REYNALDO, PERDOMO,
OSCAR, ZOMETA, SALVADOR y LUDWING
Por habernos dado su amistad y compañerismo.

- A MIS FAMILIARES Y AMIGOS :
Que de alguna forma han contribuido conmigo durante mis estudios, mis más sinceros agradecimientos.

ROBERTO ANTONIO CHAVEZ MENDEZ

I N D I C E

| | Página |
|---|--------|
| RESUMEN | iv |
| AGRADECIMIENTOS | vi |
| DEDICATORIA | viii |
| INDICE DE CUADROS | xv |
| INDICE DE FIGURAS | xvii |
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 2. REVISION BIBLIOGRAFICA | 3 |
| 2.1. La leche | 3 |
| 2.1.1. Composición de la leche y sus varia- ciones | 3 |
| 2.1.2. Factores en la composición de la le- che | 4 |
| 2.1.3. Factores que afectan el contenido mi- neral en la leche | 5 |
| 2.2. Mastitis o mamitis en ganado bovino | 6 |
| 2.2.1. Staphylococcus o micrococos | 8 |
| 2.2.1.1. Morfología y fisiología .. | 8 |
| 2.2.2. Estreptococcus | 10 |
| 2.2.2.1. Morfología y fisiología .. | 10 |
| 2.2.3. <u>Escherichia coli</u> | 11 |
| 2.3. Manifestaciones de la mastitis | 13 |
| 2.4. Tipos de mastitis | 14 |
| 2.5. Factores que predisponen la mastitis | 15 |
| 2.6. Pruebas para identificar mastitis | 16 |
| 2.6.1. Prueba California | 16 |

| | Página |
|--|--------|
| 2.6.2. Prueba bacteriológica | 17 |
| 2.6.3. Prueba química | 18 |
| 3. MATERIALES Y METODOS | 21 |
| 3.1. Localización | 21 |
| 3.1.1. Características climáticas | 21 |
| 3.1.2. Temperatura | 21 |
| 3.1.3. Humedad relativa | 21 |
| 3.1.4. Precipitación | 21 |
| 3.1.5. Viento | 21 |
| 3.1.6. Topografía | 22 |
| 3.1.7. Recursos hídricos | 22 |
| 3.1.8. Suelo | 22 |
| 3.1.9. Vías de acceso | 22 |
| 3.1.10 Material experimental | 22 |
| 3.2. Duración de la fase de campo | 22 |
| 3.2.1. Fase pre-experimental | 23 |
| 3.2.2. Fase experimental | 23 |
| 3.3. Método para toma de muestras | 24 |
| ✓ 3.4. Método volumétrico de precipitación | 25 |
| 3.4.1. Principio del método de Volhard | 25 |
| 3.4.2. Recursos de laboratorio | 26 |
| 3.4.3. Procedimiento del método de Volhard. | 26 |
| 3.4.4. Cálculos | 27 |
| 3.5. Medios selectivos | 27 |
| 3.5.1. Agar sangre | 28 |
| 3.5.2. Agar # 110 | 29 |

| | Página |
|--|--------|
| 3.5.3. Agar McConkey | 29 |
| 3.5.4. Agar Edward | 30 |
| 3.6. Pruebas bioquímicas | 30 |
| 3.6.1. IMVIC | 31 |
| 3.6.2. Indol | 31 |
| 3.6.3. Rojo de Metilo | 31 |
| 3.6.4. Voges - Proskauer | 31 |
| 3.6.5. Citrato de Simmons | 32 |
| 3.6.6. Catalaza | 32 |
| 3.7. Recuento de colonias | 33 |
| 3.7.1. Método de placa Petri vertida | 33 |
| 3.7.2. Preparación de diluciones | 33 |
| 3.7.3. Siembra de placas petri | 33 |
| 3.7.4. Llenado de placas petri | 34 |
| 3.7.5. Recuento | 34 |
| 3.8. Metodología estadística | 34 |
| 3.8.1. Factores de estudio | 34 |
| 3.8.2. Tratamientos y descripción | 35 |
| 3.8.3. Método estadístico | 35 |
| 3.8.3.1. Significación | 36 |
| 3.8.4. Toma de datos | 36 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSION | 37 |
| 4.1. Pruebas de volumetría directa y bacteriológica en leches sanas | 37 |
| 4.2. Pruebas de volumetría directa y bacteriológica en leches en proceso de transición | 41 |

| | |
|---|----|
| 4.3. Prueba de volumetría directa y bacteriológica en leches enfermas | 44 |
| 5. CONCLUSIONES | 48 |
| 6. RECOMENDACIONES | 49 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 51 |
| 8. ANEXOS | 56 |

INDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Correlación en la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas - en leches sanas | 38 |
| 2 | Correlación en la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas - en leches en período de transición | 41 |
| 3 | Correlación en la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas - en leches enfermas. | 46 |
| A-1 | Cálculos de correlación de leches sanas . | 57 |
| A-2 | Cálculos de correlación de leches en <u>tran</u> sición | 59 |
| A-3 | Cálculo de correlación de leches enfermas .. | 61 |
| A-4 | Pruebas de hipótesis correlativa para leches sanas | 63 |
| A-5 | Prueba de hipótesis correlativa para leches en período de transición | 64 |
| A-6 | Prueba de hipótesis correlativa para leches enfermas | 64 |
| A-7 | Coeficiente de variación para leches sanas | 65 |

| Cuadro | | Página |
|--------|---|--------|
| A- 8 | Coeficiente de variación para leches en período de transición | 65 |
| A- 9 | Coeficiente de variación para leches enfermas | 65 |
| A-10 | Concentraciones generales de cloruros por hacienda | 66 |
| A-11 | Preparación de solución estandar de nitrato de plata 0.1 N | 69 |
| A-12 | Preparación de tiocianato de potasio 0.1 N. | 69 |
| A-13 | Preparación del sulfato férrico amónico ... | 70 |
| A-14 | Preparación del ácido nítrico | 70 |
| A-15 | Coloración Gram | 71 |

INDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Correlación en la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas - en leches sanas | 40 |
| 2 | Correlación en la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas en leches en período de transición | 42 |
| 3 | Curva de correlación de concentración de cloruros y número de colonias bacterianas en leches enfermas | 47 |

1. INTRODUCCION

En El Salvador, la mastitis bovina es uno de los principales obstáculos para producir leche, en forma higiénica. Estudios que se han efectuado revelan bajas en la producción láctea que oscilan de 5 a un 84% en las explotaciones, debido a esta enfermedad.

Para la detección de mastitis, los productores emplean las tradicionales pruebas indirectas; y no han considerado hasta la fecha otra técnica efectiva para detectar esta enfermedad. Es por ello que esta investigación pretende aplicar una técnica volumétrica indirecta que sirva a los ganaderos : 1) Como una nueva técnica, basada en la concentración de cloruros presentes para la detección de mastitis; 2) que les permita al mismo tiempo comparación con las pruebas conocidas; 3) les ayude a minimizar pérdidas económicas debido a la disminución en la producción láctea; a la eliminación de vacas por pérdida completa de su función lactógena; y por costos de antibióticos.

En el presente trabajo se seleccionaron seis haciendas para ser muestreadas, las cuales están ubicadas en el Cantón Canagrejera, jurisdicción de La Libertad, Departamento de La Libertad. Las muestras fueron analizadas en los Laboratorios de Química y Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, así como en los Laboratorios de Microbiología de la Dirección General de Sani-

dad Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería. Las muestras fueron sometidas a análisis bacteriológicos y químico (volumétrico); a los resultados obtenidos se les aplicó la prueba de correlación para realizar su análisis estadístico el cual ayudó a cumplir otro objetivo planteado como es la elaboración de una tabla de probabilidades de concentraciones bacterianas causantes de mastitis, así como establecer los porcentajes de concentraciones de cloruros en leche de vaca en las explotaciones lecheras de la zona con incidencia de mastitis, dado que en el país hasta la fecha no se han realizado investigaciones que utilizan pruebas bacteriológicas y químicas para la comprobación de la enfermedad.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1. La leche

Leche es la secreción láctea, entera y fresca, obtenida mediante el ordeño de una o más vacas sanas, cuyo contenido de sólidos es de 8.5% y grasa de 3.0%, excluyendo la leche obtenida durante los 15 días anteriores al parto y 5 días después del mismo (2).

La leche fresca o recién ordeñada, se comporta como un compuesto anfotérico, esto quiere decir que actúa a la vez como ácido y como base y la concentración de iones varía de pH 6.5 a pH 6.7, estos valores pueden ser más alcalinos en leche mastíticas y más ácidas en presencia de contaminación con microorganismos (2, 28).

La leche de diferentes secciones de la ubre da distintos resultados en las pruebas; razón por la cual si se desea obtener un dato preciso de la leche de una vaca en una ordeña, se determina en cada sección de la ubre que deberá ordeñarse hasta que se agote.

La variación se debe probablemente al hecho de que las distintas secciones son glándulas independientes y funcionan en forma distinta (21).

2.1.1. Composición de la leche y sus variaciones

La composición típica de la leche de vaca puede ilustrarse como sigue :

| <u>CONSTITUYENTES</u> | <u>PORCENTAJE</u> |
|-----------------------|-------------------|
| Agua | 87 |
| Grasa | 2.5-8% |
| Caseína | 2.8 |
| Albúmina | 0.5 |
| Lactosa | 5.0 |
| Minerales | 0.7 |

Los componentes de la leche se dividen en dos grupos : El agua y los sólidos. Los constituyentes distintos al agua se llaman sólidos totales. Los sólidos totales, excepto la grasa reciben el nombre de sólidos no grasos (2, 10, 14). La composición de la leche es variable, se conoce que el agua varía de 82 a 90%; grasa, de 2.5 a 8%, caseína de 2.3 a 4%; - lactosa de 3.5 a 6% y los minerales de 0.5 a 0.9% (15, 21).

La leche fresca tiene un sabor dulce y olor característico, está demostrado que el sabor agradable de la leche se debe al alto contenido de lactosa y bajo contenido de cloro, en caso inverso la leche adquiere un sabor salado (28).

2.1.2. Factores que influyen en la composición de la leche

Entre estos factores, se conocen: Raza del ganado, herencia, salud, edad de los animales, tipo de alimentación recibida, período de lactancia, gestación, frecuencia de ordeño, intervalo entre ordeños, condiciones climatológicas, in-

dividualidad de la vaca, etc. (1, 28). Se pueden comentar algunos aspectos en relación a algunos de tales factores :

Edad : Se considera que una vaca está en su plenitud, - del tercero al sexto período de lactancia, inclusive, todos los datos disponibles indican que el porcentaje de grasa cam bia muy poco durante sus primeros seis períodos de lactancia después de ese tiempo hay una disminución gradual.

Alimentación : La mayor parte de los ganaderos atribuyen generalmente cualquier cambio en las pruebas de la leche a la alimentación. Cuando se dan cambios súbitos o radicales en ella pueden afectar el porcentaje de grasa en la leche; pero cuando se vuelve a la alimentación regular, el contenido de - grasa pronto tiende a regresar a su nivel normal en la vaca o ható afectado.

Período de lactancia : Cuando la vaca pare, la primera leche que secreta se llama calostro, esta difiere de la leche normal en que es más espesa y amarilla, químicamente, contiene más caseína, albúmina, globulina, cloruros y otros minera les, además menos lactosa que la leche normal. Los cambios de calostro a leche normal se efectúan entre el período de 2 a 10 días y la leche se considera apta para el consumo humano (2, 21, 22).

2.1.3. Factores que afectan el contenido de minerales en la leche

El contenido mineral de la leche es menor variable de -

todos sus constituyentes. Los minerales de la leche están compuestos de sales ácidas y alcalinas de cloro, potasio, calcio, sodio, etc. Estos se encuentran parcialmente en solución y suspensión. El contenido mineral es siempre de carácter alcalino (21, 28).

Son varios los factores que afectan el contenido de minerales en la leche, lo mismo que a la proporción de las diferentes sales presentes.

Las infecciones de la ubre, tales como mastitis, aumentan el contenido de sales minerales y de cloruros en la leche.

El contenido mineral, que es elevado en la leche del calostro, disminuye a un nivel que permanece constante en la mayor parte del período de lactancia y aumenta hasta el final de dicho período.

Los experimentos han dado resultados contradictorios en relación al efecto de los alimentos en el contenido de minerales. Los cambios en la alimentación tienen poco efecto; o ninguno sobre el contenido de minerales (21).

2.2. Mastitis o mamitis en ganado bovino

El término mastitis o mamitis se refiere a la inflamación de las glándulas mamarias sea cual sea su causa (31).

La mastitis es una enfermedad que produce cuantiosas pérdidas económicas debido a : disminución en la producción láctea; eliminación de vacas por pérdida completa de su función lactó

gena, costos de drogas; terapia; y pérdida en la composición de la leche (32).

La mastitis bovina ocupa un importante lugar entre las causas más frecuentes de eliminación de vacas; se estima que un 50% son portadoras de gérmenes patógenos en un promedio de dos cuartos por animal; investigaciones realizadas indican que el 10% de las pérdidas de leche anuales se deben a Streptococcus agalactiae y Staphylococcus aureus (bacterias causantes de mastitis). Significa que : una de cada diez vacas está siendo alimentada y ordeñada por nada. Las bajas en la producción láctea oscilan de 5 a 84% (5, 29).

Existe la tendencia, por parte de los productores de no estimar en forma correcta los daños causados por las enfermedades de la ubre y en muchos casos tienden a incluirlas en los gastos corrientes del manejo de ganado lechero (31). El proceso más devastador que puede afectar a las glándulas mamarias en su función es el de la inflamación. Cuando las glándulas llegan a inflamarse, la secreción de la leche disminuye y hasta puede cesar. La leche secretada está mezclada con exudado inflamatorio de manera que contiene un número mucho mayor de leucocitos que lo normal (la presencia de un número excesivo de leucocitos puede ser descubierta por las pruebas para mastitis de Whiteside y California (4). El aumento de leucocitos corresponde a los neutrófilos; las células epiteliales descamadas se vuelven más abundantes, aparecen los macrófagos

y se forman los fibroblastos, aumentan los cloruros en la leche, se producen hemorragias, lo cual da origen a eritrocitos en la secreción, la temperatura de la ubre y lo adecuado de la leche como medio para el crecimiento de microorganismos proporciona condiciones ideales para el crecimiento de bacterias productoras de mastitis (6, 30).

Existen muchos agentes infecciosos productores de mastitis; pero las causas más frecuentes en bovinos son ocasionadas por las siguientes bacterias :

2.2.1. Staphylococcus o micrococos

Estos microorganismos predominan en la piel normal y nariz. Crecen bien en medios ordinarios y son más resistentes a la desecación que la mayor parte de las bacterias no esporuladas; en consecuencia sobreviven en el medio ambiente, distribuyéndose ampliamente por el mismo (21).

2.2.1.1. Morfología y fisiología

Son cocos Gram positivos agrupados, irregulares, inmóviles y no esporulados, no poseen cápsula; predominan en el examen microscópico los agrupamientos irregulares de células, pero pueden observarse también, células únicas, pares, tetradas, y convertirse en Gram negativos (22).

Los Sthaphylococcus no producen gas, sólo pequeñas cantidades de ácido cuando fermentan los azúcares. Originan cambios insignificantes cuando crecen en alimentos tales como -

la carne y natillas. La presencia de millones de bacterias no modifican el olor ni el sabor. Son más resistentes a la desinfección química que la mayor parte de las bacterias no esporuladas.

Los *Sthaphylococcus* crecen en concentraciones de cloruros elevados y segregan varios tipos de toxinas, entre las cuales se mencionan hemólisis de tipo beta y leucocidinas destructoras de glóbulos blancos (21).

Este germen puede penetrar la ubre y provocar procesos infecciosos profundos de los tejidos productores de la glándula mamaria (37).

Sthaphylococcus aureus, produce una serie de enzimas y toxinas que ayudan a establecer el proceso infeccioso. El reservorio de la infección para el hato lechero es la ubre infectada y en segundo lugar la piel de los pezones. El germen depende de flujos de leche para continuar su penetración en la ubre ya que no posee un sistema locomotivo. La mayoría de los casos de enfermedades sub-clínicas causadas por estos gérmenes se desarrollan en forma lenta y sin manifestaciones externas marcadas; pero internamente provocan la destrucción de los tejidos productores de leche y del sistema conductor lácteo, en los alrededores del foco de infección. El volumen de la ubre queda igual; pues los tejidos dañados (en forma irreversible), son reemplazados por tejidos conectivos o fibrosos, que no tienen

ninguna función en la producción de leche.

La ordeña mecánica tiene importancia en la diseminación de la infección a partir de la fuente de infección, es decir, una ubre infectada. Las partes de goma de la máquina, así como las manos del ordeñador que toman contacto con la ubre infectada y que transportan durante la consiguiente ordeña gotas de leche que contienen Sthaphylococcus aureus, son la fuente de contagio de vacas sanas.

La característica de la enfermedad producida por Sthaphylococcus nos determina una forma especial de tratamiento. La formación de focos profundos de infección estafilocócica dentro de los tejidos de la ubre no permiten el contacto entre antibióticos y el germen y por lo tanto, sólo se recomienda tratamiento de vaquillas primerizas infectadas, es decir, durante la primera lactancia en el entendido de que la infección es reciente y todavía no ha tenido oportunidad de provocar los profundos focos de infección una vez penetrados los tejidos de la glándula mamaria (37).

2.2.2. Estreptococcus

La diversidad de procesos en lo que pueden estar involucrados y la complejidad de sus relaciones; hacen de los Spreptococcus las bacterias patógenas más interesantes de las habitualmente observadas (22).

2.2.2.1. Morfología y fisiología

Los Streptococcus son Gram positivos, no esporulados y crecen en cadenas típicas en los medios de cultivo. Algunas cepas patógenas poseen cápsula, pero no bien manifestadas. - Las células bacterianas rara vez son perfectamente esféricas; unas tienen aspecto de diplococo, y otras son alargadas. Los Streptococcus son microorganismos parásitos del hombre y de los animales, si bien gozan de cierto grado de supervivencia fuera de sus huéspedes (22).

El Streptococcus es considerado como "patógeno verdadero de la ubre"; pues es el único que para desarrollarse y sobrevivir, necesita encontrarse dentro de la ubre. Una vez que sale de la ubre a través de gotas de leche contaminada con esta bacteria, éstas pueden sobrevivir un corto lapso de tiempo en el medio ambiente. Este punto es de fundamental importancia en la epidemiología y control de la enfermedad, pues el Streptococcus agalactiae es susceptible de ser erradicado del hato, lo que no es posible con Sthaphylococcus y con todos los demás gérmenes causantes de mastitis. Del nivel promedio de infección sub-clínica en Israel, Streptococcus agalactiae contribuye en un 1% más o menos, al promedio citado de 25% (37).

Streptococcus agalactiae no se considera patógeno para el hombre; sin embargo, cabe recordar que los animales pueden infectarse con cepas humanas y convertirse en fuentes de infección para el hombre; el ejemplo más notable al respecto lo constituye la infección de la ubre de la vaca por estreptococcus del grupo A (Streptococcus beta hemolíticos), que pueden

desencadenar epidemias extensas de faringitis séptica en las personas que beben leche cruda procedente de estos animales (22). Esta mayor incidencia se considera que es causada por el manejo intensivo, el clima caluroso y húmedo.

2.2.3. Escherichia coli

Este germen pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Cien y nueve especies de Escherichia, han sido estudiados con más amplitud que cualquier otro grupo de gérmenes, que fermentan activamente muchos carbohidratos. Son bacterias móviles cuya motilidad depende de la presencia de flagelos laterales (16).

Aunque muchas especies son saprófitas inofensivas, ampliamente distribuidas en la naturaleza, otras habitan en el aparato digestivo del hombre y otros mamíferos ya sea como parte de la flora natural o como microorganismo causante de enfermedades específicas. Así, Escherichia coli es residente habitual del intestino del hombre y muchos animales de sangre caliente (34).

Escherichia coli es la bacteria más común en Israel causante de la mastitis clínica que representa un 35% de todas las causas bacteriales de esta enfermedad; siendo este promedio más elevado que el que se reporta en otros países (9, 16).

Escherichia coli se encuentra en forma abundante en los alrededores de la vaca; siendo la fuente, como organismo entérico, los excrementos de los animales. Este germen produce -

una toxina llamada endotoxina o toxina interna que es la que promueve los síntomas de la mastitis, y se considera como una toxicosis. La endotoxina es liberada después de la muerte del germen; cuando hay solución de continuidad de la pared bacteriana y el protoplasma (que es en este caso la endotoxina) se difunde en el medio y provoca la inflamación y eventualmente puede llegar en suficiente concentración a la sangre y por su intercambio (como toxemia) a otros órganos vitales del animal y en algunos casos puede provocar su muerte (casos sobre-agudos). Escherichia coli ataca generalmente un solo cuarto y principalmente cuartos posteriores (37).

2.3. Manifestaciones de la mastitis

Los pasos por los que atraviesa la infección originan distintos tipos de mastitis :

a) Mastitis latente : Es la que coincide con el estado de invasión, en el cual no existe ningún síntoma de enfermedad, salvo la presencia de gérmenes en la leche.

b) Mastitis clínica : Presenta manifestaciones externas de signos clínicos evidentes: Inflamación de uno o más cuartos, calor, dolor, rubor, baja producción de leche con cambios organolépticos evidentes en el color, sabor y consistencia. De acuerdo a su severidad se pueden dividir en mastitis leves, medianas y graves.

c) Mastitis sub-clínicas : No se manifiestan signos clínicos externos de la inflamación interna y la leche también -

se ve normal; los tejidos productores de la leche son atacados por bacterias patógenas, las cuales producen una enfermedad crónica, con cambios patológicos irreversibles, que cambian el tejido productor por tejido conjuntivo, con la consiguiente pérdida en la producción y en la calidad de la leche (6, 10, 31).

2.4. Tipos de mastitis

La mastitis es clasificada en la misma forma que las inflamaciones en otros tejidos. De acuerdo al tiempo que tenga el animal de padecerla, es aguda o crónica, aún cuando puedan existir infecciones subagudas por un corto lapso de tiempo. Las glándulas mamarias en general pueden presentar inflamación serosa, supurativa granulomatosa, proliferativa y necrosante, de acuerdo con la inflamación que presentan estas glándulas - se presentan algunos tipos de mastitis como son :

a) Mastitis serosas :

Se detectan por un aumento en la concentración de iones cloro y sodio en la leche, proveniente de vasos sanguíneos dañados por toxinas bacterianas.

b) Mastitis supurativas :

Se caracterizan por la presencia de abundantes leucocitos polimorfonucleares en la leche.

c) Mastitis tuberculosa :

En la mayor parte de las vacas tuberculosas se presenta la tuberculosis crónica de las glándulas mamarias con unión -

de muchos focos tuberculosos hasta afectar la totalidad del cuarto mamario.

d) Mastitis granulomatosa :

Se da en vacas por infecciones con Nocardia asteroides, Cryptococcus neoformans, Candida albicans, Trichosporum sp. y Microbacterias diversas (3, 6, 29).

Las bacterias implicadas como causantes de mastitis son : Streptococcus agalactiae, Streptococcus uberis, Streptococcus zooepidemicus, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus faecalis, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Klebsiella sp, Corynebacterium pyogenes, Corynebacterium bovis, Mycobacterium tuberculosis, Bacillus cereus, - Pasteurella multocida, Pseudomona pyogenes, Sphaerophorus necrophorus, Serratia marcescens, Mycoplasmas, Nocardia, Trichosporum (6, 32).

2.5. Factores que predisponen a la mastitis

Los factores predisponentes son :

a) Higiene deficiente en establos :

Plazas de estabulación muy cortas o angostas, cama húmeda, tosca, escasa y enmohecida, corrientes de aire, variaciones de temperatura diurnas y nocturnas, abrevaderos y corrales fangosos.

b) Formas inconvenientes de las mamas, pezones y conducto de los mismos; como mamas grandes, muy colgantes, flácidas, pendulosas cuyos pezones se rozan. Las infecciones galactógenas -

son más frecuentes cuando las tetillas tienen forma de hendidura o embudo con amplia abertura que cuando son puntiagudas o redondeadas.

c) Extasis láctea y ordeño defectuosos :

En tales circunstancias la secreción dilata los espacios galactóforos y luego actúa como cuerpo extraño, la descomposición de los ácidos grasos desencadena la reacción inflamatoria. El ordeño defectuoso puede darse en el ejecutado a mano, como en el mecánico.

d) Receptividad aumentada :

La aparición de la mastitis puede ser favorecida por la edad, fase de lactación, factores hereditarios, influencias hormonales, factores alimenticios y padecimientos generales (10).

2.6. Pruebas para identificar mastitis

2.6.1. Prueba California

La prueba de California Mastitis (CMT), está basada en el hecho de que leche de un cuarto con mastitis contiene una cantidad de células (leucocitos), mayor que en la leche normal (10). La prueba de California puede ser empleada con leche incipiente u ordeñados de glándulas por separado, pero se aplica también a leches mezcladas, para la selección rápida, en hatos lecheros en los que se aprecian elevados grados de irritación de la ubre (12).

La leche con alto contenido de leucocitos y células somá-

ticas, mezcladas con un producto que contenga una superficie aniónica tal como la del alquil sulfonato (un detergente), - forma un gel como consecuencia de la reacción entre el producto químico y el ácido desoxirribunocléico (DNA) contenido en los leucocitos. El gel puede ser observado en forma directa (12); la rapidez con que se forma y la firmeza que adquiere indica la cantidad de leucocitos en la leche (10).

Para ejecutar la prueba California (CMT) son necesarios la paleta con cuatro compartimientos y el reactivo, que está disponible en almacenes de productos agropecuarios (5). La Prueba California debe hacerse a todas las vacas en producción una vez al mes.

Interpretación del resultado: Leche positiva a mastitis forma un gel denso, observable, que tiende a quedarse en el centro del compartimiento. Leche sospechosa forma una gelatina muy poco densa que tiende a quedarse en el mismo sitio al movimiento circular de la paleta. Si la leche es normal la mezcla permanece líquida.

Los resultados de la Prueba California están correlacionados con los resultados de la prueba de recuento de leucocitos que se hace a la leche en el laboratorio para detectar mastitis (12, 24).

2.6.2. Prueba bacteriológica

Aunque la prueba anterior (CMT) es de valor relativo en el diagnóstico de las mastitis agudas y subagudas, muchos ca

Los crónicos sólo podrán ser confirmados por los métodos de cultivo. El aislamiento e identificación de un microorganismo específico presente en la leche suele ser considerado como prueba de que, el cuarto está infectado, afirmación cierta si la muestra ha sido tomada sin contaminación con agentes de la piel o de la atmósfera. Los cultivos de leche procedentes de una ubre revelaron varias colonias similares en las placas de agar. Para el aislamiento de bacterias de las muestras de leche se recomienda medios nutritivos selectivos - (16).

Todo organismo aerobio, saprófito o patógeno, se multiplicará para formar colonias, de estar presentes en la muestra. Los estreptococcus de la mastitis aparecen como pequeñas colonias con varios grados de hemólisis clasificados en: Beta, - Alfa y Gamma (esta última sin hemólisis). Como los estreptococcus saprófitos tienen casi las mismas características de colonización y son de morfología semejante, podrá ser conveniente completar la diferenciación mediante reacciones de fermentación de los hidratos de carbono.

Las coloraciones de Corinebacterias podrán tener puntos de semejanza con las estreptocócicas, pero se distinguirán - por su morfología y por su tinción con el Gram (12).

2.6.3. Prueba química

La formación de un precipitado puede emplearse como base de una titulación siempre que exista un método apropiado

para determinar en qué momento se ha añadido una cantidad estequiométrica del titulante.

En el caso de las valoraciones por precipitación, el titulante forma un producto insoluble con la muestra a analizar, ejemplos son la titulación directa y de iones cloruro con solución de nitrato de plata y la titulación indirecta de iones cloruro con valoración de tiocianato de potasio, se puede emplear indicadores para detectar el punto final o medirse eléctricamente el potencial de la solución. Existen métodos como el de Mohr y Volhard de amplia aplicación en el campo agropecuario que son precisos y exactos (24).

- Método de Volhard : Este método empleado en la presente investigación para determinar la concentración de cloruros en la leche de vaca como un parámetro más para detectar la presencia de mastitis es un método de valoración indirecta o por retroceso; que permite determinar otros aniones que precipita con la plata (Cl^- , Br^- , I^- , SCN^-). Se efectúa en medio ácido para lo cual se emplea ácido nítrico libre de cloruros y se agrega un exceso de solución de nitrato de plata (AgNO_3) de concentración conocida (19), que precipita el anión y se determina el exceso de Ag^+ por retrotitulación con solución de tiocianato de potasio, también de concentración conocida, empleando como indicador para detectar el punto final una solución de sulfato férrico amoníaco. La cantidad de cloruro (o de otro anión en su caso) en la solución de la muestra, se

calcula restando los miliequivalentes de Tiocianato, usado en la retrovaloración, del número total de miliequivalentes de nitrato de plata agregados inicialmente a la solución muestra (24).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización

La investigación se realizó en seis haciendas dedicadas a la producción lechera, localizadas en el Cantón Cangrejera, Jurisdicción de La Libertad, Departamento de La Libertad, ubicada a 15.4 km al este de dicha localidad; sus coordenadas geográficas son 12°27'4" latitud norte, 89°10'48" - longitud oeste y a una elevación de 10 msnm (22).

3.1.1. Características climáticas del lugar

3.1.2. Temperatura

La temperatura promedio anual es de 26.8 °C, la máxima en los meses de febrero a abril (34.2 °C) y la mínima en los meses de noviembre a febrero (21.4 °C) (31).

3.1.3. Humedad relativa

La humedad relativa promedio mensual es de 74% (31), - la mínima en el mes de febrero 63%; y la máxima en septiembre, 84%.

3.1.4. Precipitación

La precipitación promedio anual es de 1723 mm (22).

3.1.5. Viento

La velocidad promedio del viento es de 1.7 en la escala

de Beaufort, que corresponde de 6 a 11 km/hora (22).

3.1.6. Topografía

La zona se caracteriza por presentar una topografía plana, con pendientes que oscilan entre 1 y 2%.

3.1.7. Recursos hídricos

Cada una de las haciendas cuenta con su propio pozo de agua, el cual abastece las necesidades de las mismas.

3.1.8. Suelo

Los suelos predominantes en la zona son los Franco-arenosos, franco; con menor frecuencia y espesor se encuentran los franco limosos y franco arcilloso-limoso.

3.1.9. Vías de acceso

La principal vía de acceso es un camino de tierra el cual comunica a las cinco haciendas con la Carretera Litoral.

3.1.10. Material experimental

Se utilizaron en la investigación 70 vacas encastadas - Brahman-Brown-Swiss, que se encontraban en el período de lactación 10 días después del parto, entre el tercero al sexto parto.

3.2. Duración de la fase de campo

Esta se realizó en dos fases: la primera fase pre-experi

mental, la cual tuvo una duración de 45 días comprendidos - del 1° de noviembre al 15 de diciembre de 1994; y la segunda, realizada del 5 de enero al 15 de febrero de 1995 con una duración de 30 días.

3.2.1. Fase pre-experimental

Esta fase se desarrolló en el Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador; en donde se determinó las concentraciones de cloruros normales en leche cruda provenientes de vacas criollas sanas. Se utilizó para ello el método analítico de - Volhard, método indirecto recomendado para determinar la presencia de Cl^- en leche. Con los datos obtenidos en esta fase se elaboró una tabla de concentraciones para utilizarla de referencia en la fase experimental. Para realizar esta fase se muestreó 48 vacas seleccionadas de acuerdo a la misma raza eue en este caso fue la raza encastada, período de lactancia 10 días después del parto y un promedio de tres a seis partos, siendo 192 muestras de leche analizadas.

3.2.2. Fase experimental

Para realizar esta fase, se escogió la hacienda con mayor incidencia de mastitis; los análisis se efectuaron en - los Laboratorios de Química y de Investigación de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Univer-sidad de El Salvador y en el Laboratorio de Microbiología de

la Dirección General de Sanidad Animal del Ministerio de -
Agricultura y Ganadería (MAG).

En esta fase se analizó leche cruda de vacas criollas sa
nas y enfermas (a las que se les realizó primero la prueba
California); la primera utilizada como blanco o testigo y la
segunda para comprobar el método. Para detectar las leches
enfermas, se utilizó el método indirecto de volumetría por -
precipitación de Volhard y la prueba bacteriológica (prueba
directa). Esta última prueba se utilizó como testigo de apro
bación para la volumetría indirecta. Las muestras analizadas
se tomaron de 22 vacas criollas, 86 análisis de leche cuya se
lección de vacas fue similar a la fase pre-experimental.

3.3. Método para toma de muestras

La metodología para la toma de muestras de leche de va
ca fue igual en las dos fases de la investigación en donde se
siguió los pasos siguientes :

- Se tomó las muestras antes del ordeño regular.
- Las vacas se seleccionaron y se llevaron al lugar habitual
de ordeño, en donde se sujetó la cola para impedir conta
minar los pezones que fueron desinfectados. Las zonas ale
dañas fueron lavadas con agua y jabón, secadas luego con
papel toalla.
- La ubre y pezones se desinfectaron con algodón empapado -
en alcohol, con movimiento de abajo hacia arriba (del ori
ficio del pezón a la base), se utilizó para ello todos -

los trozos de algodón necesarios, hasta que el algodón conser
vó su color blanco; luego de cada cuarto se eliminaron los -
tres primeros chorros de leche, posteriormente se tomaron las
muestras en tubos y frascos estériles, los cuales se destapa
ron al momento de la toma de muestras de leche, para ello se
evitó el contacto del pezón con la boca del tubo o frasco, -
luego se taparon y rotularon con los datos de la vaca y el -
cuarto correspondiente; así las muestras de leche fueron colo
cadas en hielera para su transporte.

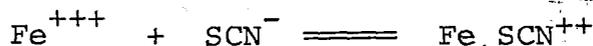
3.4. Método volumétrico de precipitación

3.4.1. Método de Volhard. Método indirecto

Principio.

La valoración de Volhard para la determinación directa
del ión plata o para la determinación indirecta de varios io
nes que forman sales de plata insolubles, es un ejemplo de va
loración volumétrica de precipitación, en la cual se determi
na el punto de equivalencia por la formación de un ión comple
jo coloreado soluble.

Se utiliza el hecho de que el ión férrico en medio ácido
forma un complejo de color rojo sangre intenso, con tiociana
to.



Para efectuar la valoración de Volhard es requisito impor
tante realizarla en medio ácido, con el objeto de evitar la
disociaciones ácidas intermedias que experimenta el ión férri
co, y que enmascararía por completo la primera aparición del

ión Fe SCN⁺⁺ de color rojo sangre (8).

3.4.2. Recursos de laboratorio

a) Materiales

Pipeta volumétrica 10 ml
Erlenmeyer de 250 ml
Probeta graduada de 10 ml
Bureta de 100 ml
Frasco lavador de polietileno
Soporte para bureta completo

b) Reactivos

Solución de nitrato de plata 0.1 N
Solución de tiocianato de potasio 0.1 N
Acido nítrico 6 N.
Indicador sulfato férrico amónico
Nitrobenceno (8).

3.4.3. Procedimiento del método de Volhard

1. Medir 10 ml de muestra de leche con una pipeta volumétrica y colocarla en un Erlenmeyer de 250 ml.
2. Disolver cada muestra en 15 ml de agua destilada.
3. Agregar con probeta 5 ml de ácido nítrico 6 N (Anexo 14), por medio de una bureta.
4. Agregar con cuidado y agitación 20 ml de solución estándar de nitrato de plata (Anexo A-11), hasta que coagule el precipitado.

5. Añadir 3 ml de nitrobenzeno, agitar y añadir 2 ml de indicador sulfato férrico amónico (Anexo A-13).
6. Titular despacio y con agitación constante con la solución estandar de tiocianato de potasio (Anexo A-12), colocado en la bureta; hasta que aparezca un débil color pardo rojizo que persista por un minuto (8)

3.4.4. Cálculos

Los gramos de cloro contenidos en la muestra, se multiplicó la diferencia entre los miliequivalentes totales de nitrato de plata añadido y los mililitros de tiocianado usados en la retrovaloración multiplicado por el peso miliequivalente del cloro y dividido entre el peso de la muestra o ml de muestra usada (8).

Fórmula :

$$\% \text{ de Cl} = \frac{(\text{ml AgNO}_3 \text{ añadido} \times N - \text{ml SCNK} \text{ gastados} \times N) \frac{35.46}{1000}}{\text{ml de muestra de leche}} \times 100$$

3.5. Medios selectivos

Muchos casos de mastitis sub-clínica y clínica sólo pueden ser confirmados por los métodos de cultivo, en donde el aislamiento e identificación de un microorganismo específico presente en la leche es considerado como prueba de que el cuarto de una ubre esté infectado, afirmación cierta si la mues-



tra ha sido tomada con la asepsia correcta; es por eso que se tomó el mayor de los cuidados a la hora de recolectar las muestras de leche de vaca destinadas a los medios de cultivo (3).

Para el aislamiento de bacterias causantes de mastitis presentes en las muestras, se utilizó medios de cultivo selectivos como: Agar sangre, medio # 110, Edwards y McConkey; en donde se identificaron las bacterias más comunes causantes de esta enfermedad: Staphilococcus, Streptococcus y Escherichia coli (3).

3.5.1. Medio agar sangre

Este tipo de medio se preparó en base a dos componentes: Agar nutritivo y sangre.

Para el agar nutritivo se pesó 23 gr de medio en polvo deshidratado diluidos en un litro de agua destilada mezclado y calentado hasta llevarlo a punto de ebullición. Luego se llenó con 18 ml de medio en tubos de ensayo con tapón rosca de 16 x 150 mm, esterilizado a 121 °C a 15 lbs. de presión, durante 15 minutos (4).

Después de esterilizados se dejó enfriar los tubos con el agar, en este momento se agregó 1 ml de sangre; para este caso se utilizó sangre de carnero homogenizada, el cual se hizo con movimientos oscilatorios y suaves, con el fin de obtener una mezcla perfecta; luego se vertió en placas de Petri estériles

dejando reposar hasta solidificarse.

Después de solidificado el medio de cultivo, se llevó a cabo la siembra de 86 muestras de leche puras con una repetición haciendo un total de 172 cultivos.

3.5.2. Medio # 110

El agar # 110 es selectivo para el aislamiento e investigación de estaphilococcus ya que posee manitol y gelatina. Para este tipo de medio se pesó 149 gr de polvo deshidratado de Agar # 110, diluidos en un litro de agua destilada; se calentó con agitación frecuente hasta llegar a punde de ebullición; luego se esterilizó a 121 °C a 15 lbs. de presión por 15 minutos en autoclave (4).

Después de esterilizado se dejó enfriar el medio a 47 °C dejando reposar hasta solidificar; sembrando de igual forma y número de muestras que el Agar Sangre.

3.5.3. Medio McConkey

El Agar McConkey es selectivo para aislamiento e investigación de microorganismos entéricos, como la Escherichia - coli, ya que se encuentra en gran parte en leches martíticas.

Para este tipo de medio se pesaron 52 gr de polvo deshidratado de McConkey diluidos en un litro de agua destilada. Se mezcló bien y se calentó con agitación frecuente hasta llegar a punto de ebullición; luego se esterilizó a 121 °C a 15 lbs. de presión por 15 minutos en el autoclave. Después de esterilizado el medio se dejó enfriar a 45 °C, en cuyo momento se

virtieron 18 ml por placa Petri estéril, las cuales se pusieron a reposar hasta solidificarse (4).

3.5.4. Medio Edward

Este tipo de medio se utilizó para la identificación de *Streptococcus*, el cual fue proporcionado por la Dirección General de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), en donde se preparó de la forma siguiente :

Se pesaron 40 gr de agar base disuelto en un litro de agua destilada estéril; calentando hasta llegar al punto de ebullición, ya disuelto el agar se agregó 1.0 gr de Aesculina, y se esterilizó luego en autoclave durante 15 minutos a 15 lbs. de presión.

Después de esterilizado el medio se colocó en Baño de María con el propósito de bajarle la temperatura a 45 °C, luego se agregó 100 ml de sangre de carnero en donde se homogenizó hasta que se incorporó bien la sangre en todo el medio. Después se procedió a colocar 15 mililitros de medio en cada una de ellas (3).

3.6. Pruebas bioquímicas

Estas pruebas se utilizaron para identificar las especies de microorganismos bacterianos presentes en los cultivos selectivos, utilizando para ello medios y reactivos especiales para identificar las bacterias.

3.6.1. Prueba de IMVIC (Indol, rojo de metilo, Voges Proskauer y citrato de Simmons).

Esta prueba se utilizó para identificar Escherichia coli y diferenciarla de otros bacilos entéricos como Enterobacter aerogenes.

3.6.2. Indol

Preparado a base de caldo nutritivo de Tripticasa soya con triptófano; sembrando en él un inóculo de la bacteria de interés; para ello se utilizó tubos de ensayo con tapón rosca de 13 x 100 mm conteniendo 5 ml de caldo nutritivo estéril, el cual se incubó por 72 horas a 37 °C. Pasado este período de incubación se le agregó 20 gotas de éter etílico; se mezcló y se dejó reposar por 10 min; agregando luego 10 gotas de reactivo de Erlich.

3.6.3. Rojo de metilo

Preparado a base de caldo Rm-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer); en donde se hizo la siembra de un inóculo de la bacteria de interés; para ello se utilizó tubos de ensayo con tapón rosca de 13 x 100 mm con 5 ml de caldo RM-VP estéril e incubando a 37 °C, durante 72 horas; después de este período se le agregó 3 gotas de indicador Rojo de metilo.

3.6.4. Voges-Proskauer

Preparado a base de caldo Rm-VP, en donde se sembró un

inóculo de la bacteria de interés, para ello se utilizaron tubos de ensayo con tapón rosca de 13 x 100 mm estériles con 5 ml de dicho caldo, e incubando a 37 °C, durante 72 horas; después de este período se le agregó 10 gotas de indicador Alfanaftol y 4 gotas de hidróxido de potasio al 40%.

3.6.5. Citrato de Simmons

El medio utilizado Agar nutritivo con azul de bromotimol. Para la siembra se utilizó tubos de ensayo de 13 x 100 mm y 4 ml de dicho agar, la cual se esterilizó a 121 °C a 15 libras de presión durante 15 minutos; sembrando el inóculo, del fondo hacia arriba del bisel e incubando por 24 horas a 37 °C.

3.6.6. Prueba de Catalasa

Esta prueba se realizó para diferenciar especies de Streptococcus y Staphylococcus en donde se utilizó el reactivo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%, preparado a base de una solución de H_2O_2 al 30% a una dilución de 1.10 con agua destilada.

Dicha prueba consistió en tomar de los cultivos que crecieron en Agar # 110, Edward y agar sangre, una cantidad de colonias bacterianas auxiliados con una asa bacteriológica. Transferidas luego a un porta objeto en donde se les agregó 1 gota de dicho reactivo, para hacer la identificación respectiva.

3.7. Recuento de colonias

3.7.1. Método de la placa Petri vertida

Con este método se detectan bacterias coliformes, inócuas y patógenas, el número total de bacterias viables presentes en las muestras de leche de vaca.

3.7.2. Preparación de diluciones

Se preparó 6 tubos con 9 ml de agua destilada estéril para cada muestra; en donde se hizo una serie de diluciones decimales; o sea 1 ml de muestra o dilución por 9 ml de diluyente.

Antes de preparar las diluciones se mezcló las muestras de leche de vaca homogéneamente con movimientos oscilatorios; luego con una pipeta graduada estéril en forma vertical se tomó 1 ml de leche y transfiriendo a un tubo con 9 ml de agua destilada estéril, formando así la primera dilución (1:10). Transcurridos 3 segundos se homogenizó la dilución; de igual manera que la anterior, se tomó así con otra pipeta graduada estéril 1 ml de la dilución 1:10 y se colocó en un tubo con 9 ml de agua destilada estéril formando así la segunda dilución (1:100) de igual manera se preparó las diluciones decimales siguientes hasta llegar a $1:10^6$ (1:100,000) (14).

3.7.3. Siembra de la placa Petri

Este proceso se realizó en una cámara de flujo laminar, auxiliada de dos mecheros tipo Bunsen, en donde se utilizaron seis cajas Petri estériles por muestra, para las diluciones.

Para realizar la siembra, se tomó con una pipeta graduada estéril 1 ml de la primera dilución (1:10), depositando luego -

en una caja petri estéril, la cual se identificó con el número de la muestra y la dilución respectiva.

De la misma forma se sembró las diferentes muestras y diluciones en placas petri estériles auxiliadas a la vez con pipetas graduadas estériles.

En todas las diluciones se hicieron dos siembras para obtener datos más representativos y confiables (3, 14).

3.7.4. Llenado de placas Petri

A cada placa petri con su respectiva dilución se le agregó 18 ml de agar nutritivo estéril fundido; agregando a 45 °C y mezclado con movimientos rotativos en forma de ocho. Se dejó reposar las placas, hasta que el medio se solidificara; luego se incubaron en forma invertida en estufa a 37 °C, durante 24 horas.

3.7.5. Recuento de colonias

Las colonias bacterianas se contaron después del período de incubación; para lo cual se eligió la dilución con crecimiento de colonias bacterianas más adecuada, utilizándose para ello una cámara de recuento de colonias automática (3, 14).

3.8. Metodología estadística

3.8.1. Factores de estudio

Dos pruebas para la detección de mastitis: Prueba de -

concentración de cloruros totales y prueba bacteriológica.

3.8.2. Tratamientos y descripción

| TRATAMIENTO | DESCRIPCION |
|--|---|
| METODO 1. Concentración de cloruros (variable independiente) | Indica el grado de infección de mastitis. Dicha concentración dió el porcentaje de Cl que se midió por el método volumétrico de Volhard (método de precipitación). |
| METODO 2. Bacteriológico (Variable dependiente) | Se utilizó como testigo relativo ya que a través de ella se confirmó la presencia de bacterias mastíticas. |

NOTA : Estadísticamente se tomó como variable independiente la concentración de cloruros, por ser la variable en estudio.

A los resultados obtenidos se les aplicó la prueba de correlación, para realizar su análisis estadístico al cual ayudó a cumplir otro objetivo planteado, elaborar una tabla para poder determinar concentraciones que nos sirva como parámetro entre las concentraciones bacterianas causantes de mastitis y el porcentaje de concentración de cloruros.

3.8.3. Método estadístico

El método aplicado fue correlación lineal; y su expresión matemática es la siguiente :

$$r^2 ; \left[\overline{xy} - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n} \right]^2 \left[\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right) \right]$$

r² = Coeficiente de correlación

x = Variable independiente

y = Variable dependiente

n = Número de observaciones (7).



3.8.3.1. Significación :

Se utilizó el nivel de significación del 1%; para comprobar la significación de correlación se ocupó la prueba de "t" de Student.

- Hipótesis estadística

RI = RT : Hipótesis nula, indica que entre la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas no existen correlación y que esto se debe a la casualidad.

RI \neq RT : Hipótesis verdadera, indica que existe correlación en la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas o sea que el valor obtenido será tan grande o mayor que el valor observado (7).

3.8.4. Toma de datos

Los datos a tomar fueron la concentración de cloruros y el número de bacterias mastíticas; los cuales se colectaron tres veces por semana por un período de un mes. Esto comprendió la fase experimental.

4.1. Resultados y discusión de las pruebas de volumetría indirecta y bacteriológicas, en muestras de leche sana

En los análisis bacteriológicos de estas muestras de leche no se encontró la presencia de bacterias causantes de mastitis, sólo colonias de bacterias inócuas.

Se puede observar el comportamiento de la concentración de cloruros y el número de colonias de bacterias en la Gráfica 1, y Cuadro 1, los cuales tienen una relación directa proporcional; ó sea, a medida aumenta la concentración de cloruros, aumenta el número de colonias de bacterias, lo que indica que los cloruros están involucrados o juegan un papel importante en el desarrollo de las bacterias.

Según los resultados estadísticos de correlación lineal simple se da una relación en las concentraciones de Cl^- y el número de colonias bacterianas del 0.973 el cual tiene alta significancia al 1% en donde se puede asumir que hay una relación bastante acertada; obteniendo además un coeficiente de variación del 1.13%, el cual indica la precisión de la investigación, en donde constituye una ilustración de error relativo y la poca variabilidad en cuanto a la repetibilidad de los análisis.

Cuadro 1.- Correlación en la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas en -
leches sanas.

| | X | | Y | | X | | Y | |
|----|-----------------|--|-----|----|-----------------|--|-----|---|
| n | \overline{Cl} | | NCB | n | \overline{Cl} | | NCB | |
| 1 | 0.010 | | 0 | 30 | 0.073 | | 50 | |
| 2 | 0.012 | | 0 | 31 | 0.075 | | 50 | |
| 3 | 0.013 | | 0 | 32 | 0.076 | | 50 | |
| 4 | 0.017 | | 0 | 33 | 0.078 | | 50 | |
| 5 | 0.018 | | 10 | 34 | 0.079 | | 50 | |
| 6 | 0.028 | | 10 | 35 | 0.080 | | 60 | |
| 7 | 0.032 | | 10 | 36 | 0.081 | | 60 | |
| 8 | 0.34 | | 10 | 37 | 0.082 | | 60 | $x = 4.032$ $\bar{x} = 0.0695$ $x^2 = 0.325122$ $xy = 229.52$ $y = 2660 \quad n = 58$ $\bar{y} = 45.862$ $y^2 = 168600$ |
| 9 | 0.031 | | 10 | 38 | 0.083 | | 60 | |
| 10 | 0.042 | | 10 | 39 | 0.084 | | 60 | |
| 11 | 0.045 | | 20 | 40 | 0.085 | | 60 | |
| 12 | 0.046 | | 20 | 41 | 0.086 | | 60 | |
| 13 | 0.048 | | 20 | 42 | 0.087 | | 70 | |
| 14 | 0.049 | | 20 | 43 | 0.089 | | 70 | |
| 15 | 0.050 | | 20 | 44 | 0.090 | | 70 | |
| 16 | 0.053 | | 20 | 45 | 0.094 | | 70 | |

Continuación Cuadro 1.-

| | | | | | | | | |
|----|-------|--|----|----|-------|--|-----|---|
| 17 | 0.055 | | 30 | 46 | 0.096 | | 80 | X |
| 18 | 0.056 | | 30 | 47 | 0.097 | | 80 | |
| 19 | 0.057 | | 30 | 48 | 0.099 | | 80 | |
| 20 | 0.058 | | 30 | 49 | 0.100 | | 80 | |
| 21 | 0.060 | | 30 | 50 | 0.101 | | 80 | |
| 22 | 0.062 | | 30 | 51 | 0.103 | | 80 | |
| 23 | 0.063 | | 30 | 52 | 0.104 | | 80 | |
| 24 | 0.065 | | 30 | 53 | 0.105 | | 80 | |
| 25 | 0.066 | | 30 | 54 | 0.106 | | 80 | |
| 26 | 0.067 | | 40 | 55 | 0.108 | | 90 | |
| 27 | 0.068 | | 40 | 56 | 0.112 | | 90 | |
| 28 | 0.069 | | 40 | 57 | 0.113 | | 100 | |
| 29 | 0.072 | | 40 | 58 | 0.114 | | 100 | |

COLONIAS DE BACTERIAS.

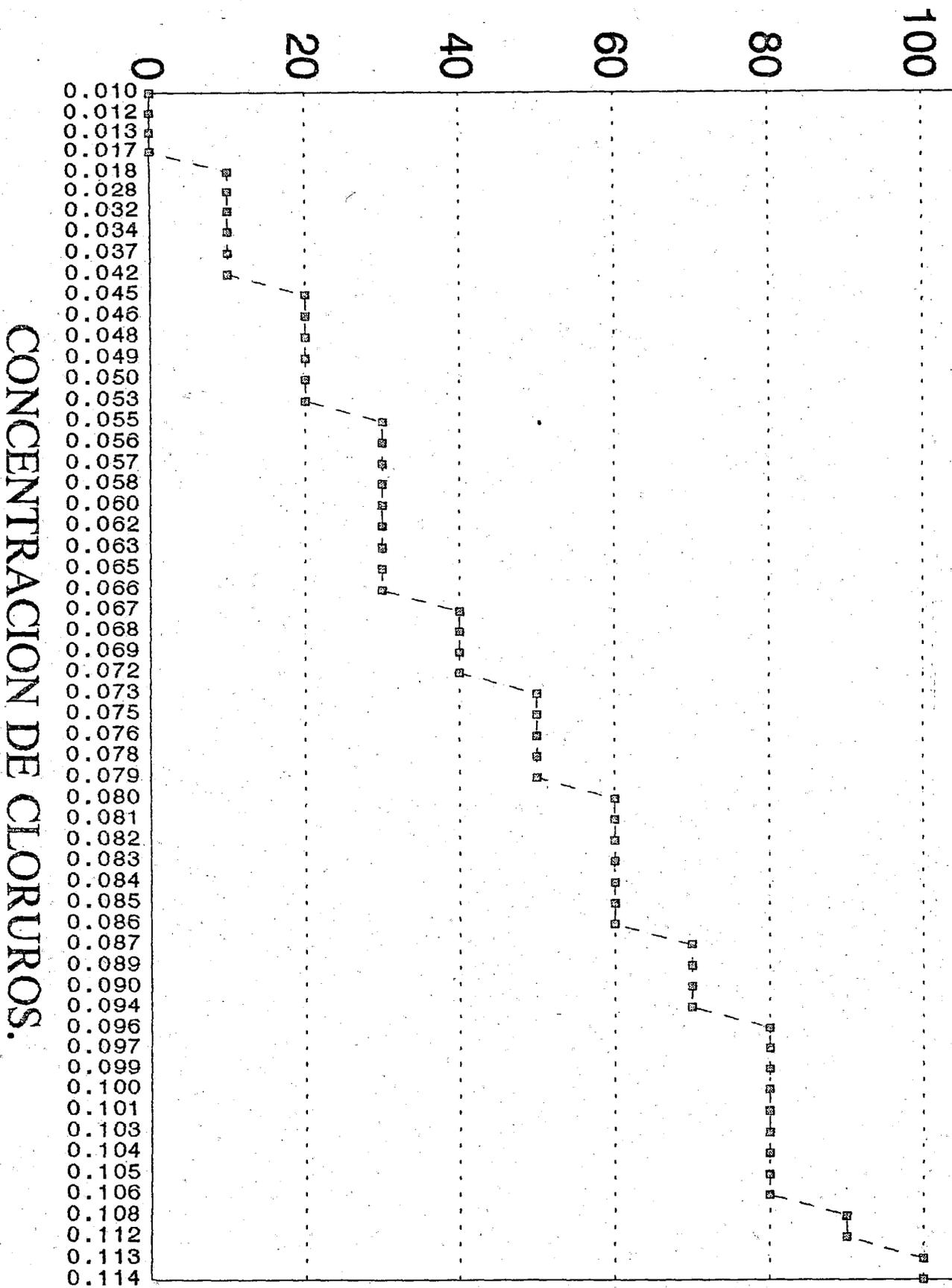


Fig. 1 Correlación entre la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas en leche sana.

4.2. Resultado y discusión de las pruebas de volumetría indirecta y bacteriológicas en muestras de leches en proceso de transición.

Cuadro 2. Correlación en la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas en leches en período de transición.

| No. | Concentración de cloruros | Número de colonias bacterianas |
|-----|---------------------------|--------------------------------|
| | X | Y |
| 1 | 0.117 | 1500 |
| 2 | 0.118 | 120 |
| 3 | 0.120 | 1600 |
| 4 | 0.122 | 1300 |
| 5 | 0.124 | 1400 |
| 6 | 0.127 | 131 |
| 7 | 0.131 | 1400 |
| 8 | 0.138 | 140 |

$$\begin{aligned} \bar{M} x &= 0.997 & \sum x^2 &= 0.124607 \\ \bar{M} y &= 7591 & \sum y^2 &= 10471161 \\ \bar{x} &= 0.125 & \sum xy &= 933.217 \\ \bar{y} &= 948.87 & n &= 8 \end{aligned}$$

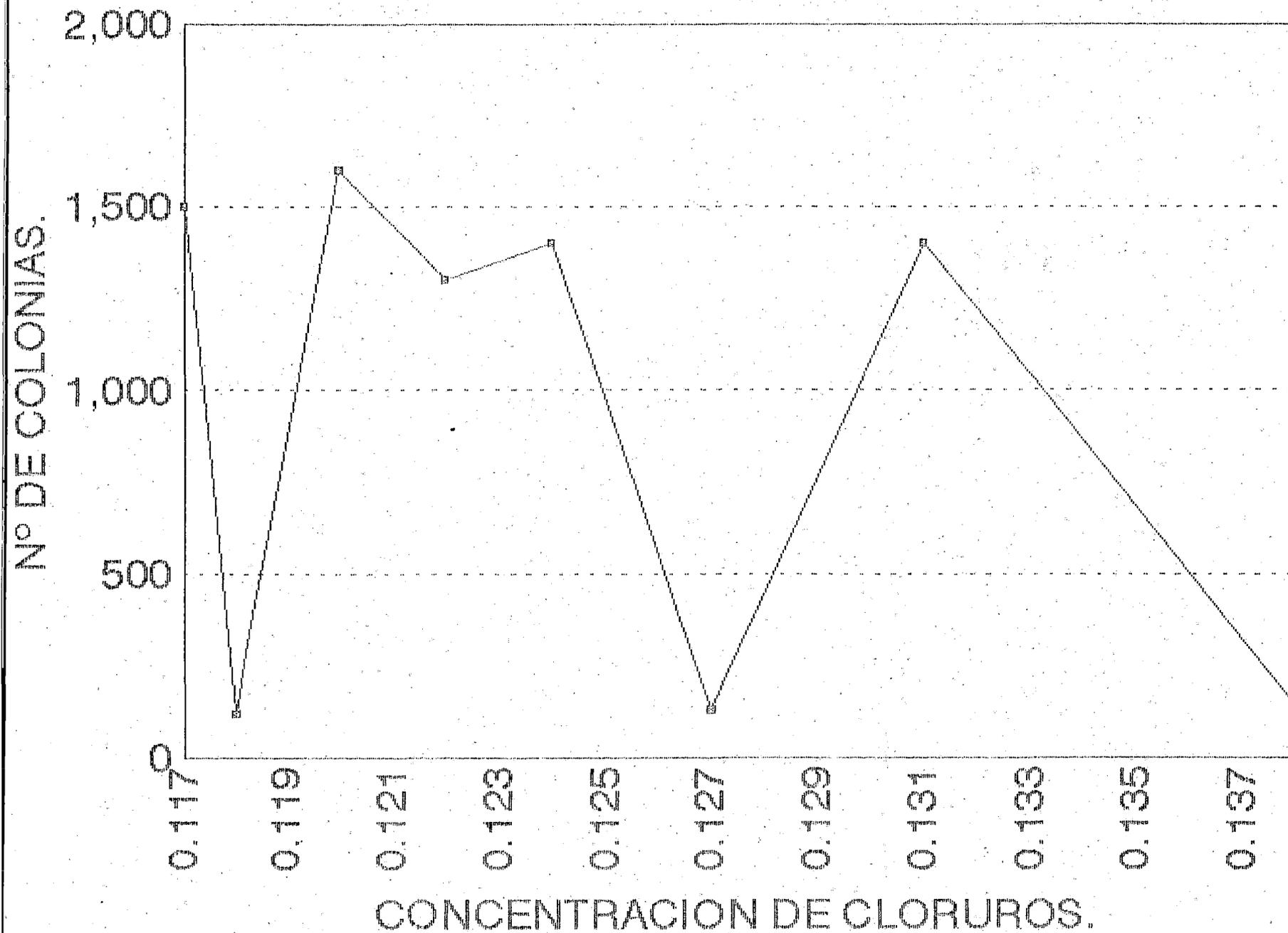


Fig. 2 Correlación en la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas en leches en período de transición.

A través de cultivos bacteriológicos se pudieron determinar los siguientes agentes causales : Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae.

Los datos de las muestras del Cuadro 2, son leches enfermas clasificadas como leches en transición; por no presentar relación en la concentración de cloruros con el número de colonias bacterianas (Fig. 2).

Esta variación de colonias se da entre las concentraciones de cloruro que oscila de 0.115% a 0.147%; esto se podría deber a la etapa de invasión; en la cual los microorganismos pasan del exterior de la ubre a la cisterna de la leche, donde hay una reacción propia de los tejidos a la penetración de estos agentes, como: exudado inflamatorio con un número mucho mayor de leucocitos y cloruros en la leche, que dan las condiciones adecuadas para el desarrollo de estas bacterias productoras de mastitis, sin ninguna manifestación clínica, ni alteración que pueda ser observada (3). En este momento puede haber una recuperación, espontánea y la infección puede pasar desapercibida; pero cuando la infección persiste, los microorganismos continúan multiplicándose; las defensas de la ubre siguen en descenso y se da la invasión del tejido glandular con una reacción inflamatoria.

La susceptibilidad del tejido mamario a la infección varía de vaca a vaca, jugando un papel importante la presencia o ausencia de los bacteriófagos que controlan la invasión bacteriana, en especial la invasión estafilocócica;

esta presencia de microorganismos no patógenos en la ubre, causan un estímulo local del mecanismo de defensa, el cual es suficiente para evitar el establecimiento de una infección cuando nuevos microorganismos se introducen en la glándula mamaria.

De acuerdo al análisis estadístico estos tipos de leche no presentan relación en cuanto a la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas por lo que se asume que el método de correlación lineal no fue capaz de percibir la fase transitoria de la enfermedad. Además se obtuvo un coeficiente de variación de 5.71%, el cual indica el grado de errores cometidos.

Es por ello que esta fase sólo pudo ser analizada en forma técnica.

4.3. Resultados y discusión de las pruebas de Cl^- por volumetría indirecta y bacteriologías en muestras de leche enferma

A través de cultivos bacteriológicos se pudieron determinar los siguientes agentes causales: Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Escherichia coli.

Al analizar los datos (Cuadro 3), obtenidos en los análisis de las leches enfermas, que se visualizan en la Figura (3), se ha observado un comportamiento similar a los de leches sanas; cuya tendencia es una relación directamente proporcional.

Concentración de cloruros : Número de colonias bacterianas. Esta relación se podría explicar, con base a lo dicho por (5, 6, 30), que cuando un microorganismo atraviesa el pezón y llega a la cisterna de la leche, hay una reacción propia de los tejidos a la penetración ocasionando un edema intersticial, lo que provoca un aumento de leucitos que trae como consecuencia que la leche presente -- "cloruros de la sangre", esto ocasiona el apareamiento de eritrocitos, lo que aumenta la temperatura de la ubre y en vista de que la leche es un adecuado medio de cultivo, proporciona condiciones ideales para el desarrollo de bacterias productoras de mastitis.

A través del análisis estadístico de correlación lineal simple se demostró la relación existente entre las dos variables (concentración de Cl^- y número de colonias bacterianas), la cual fue lineal y positiva, obteniéndose un valor de 0.644; el cual indica que es altamente significativo al 1%, asumiendo de esta manera la relación existente entre las variables.

Comprobando su posición a través del coeficiente de variabilidad, el cual fue de 9.11%, lo que constituye una -- ilustración del error relativo y denota poca variabilidad en cuanto a la repetibilidad de los análisis.

Cuadro 3. Correlación en la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas en leches enfermas.

| No. | Concentración de cloruros | Número de colonias bacterianas |
|-----|---------------------------|--------------------------------|
| | X | Y |
| 1 | 0.148 | 1800 |
| 2 | 0.162 | 1900 |
| 3 | 0.167 | 1900 |
| 4 | 0.169 | 2000 |
| 5 | 0.171 | 2000 |
| 6 | 0.172 | 2000 |
| 7 | 0.174 | 2300 |
| 8 | 0.178 | 2800 |
| 9 | 0.179 | 2800 |
| 10 | 0.183 | 3000 |
| 11 | 0.187 | 5000 |
| 12 | 0.190 | 40000 |
| 13 | 0.191 | 70000 |
| 14 | 0.194 | 70000 |
| 15 | 0.198 | 100000 |
| 16 | 0.200 | 500000 |
| 17 | 0.203 | 900000 |
| 18 | 0.205 | 1000000 |
| 19 | 0.207 | 2000000 |
| 20 | 0.209 | 3000000 a más |

$$\sum x = 3.687$$

$$x^2 = 0.685$$

$$\sum Y = 7728200$$

$$y^2 = 1.5082001 \times 10^{13}$$

$$\bar{x} = 0.18435$$

$$\sum xy = 1587849.3$$

$$\bar{y} = 386410$$

$$n = 20$$

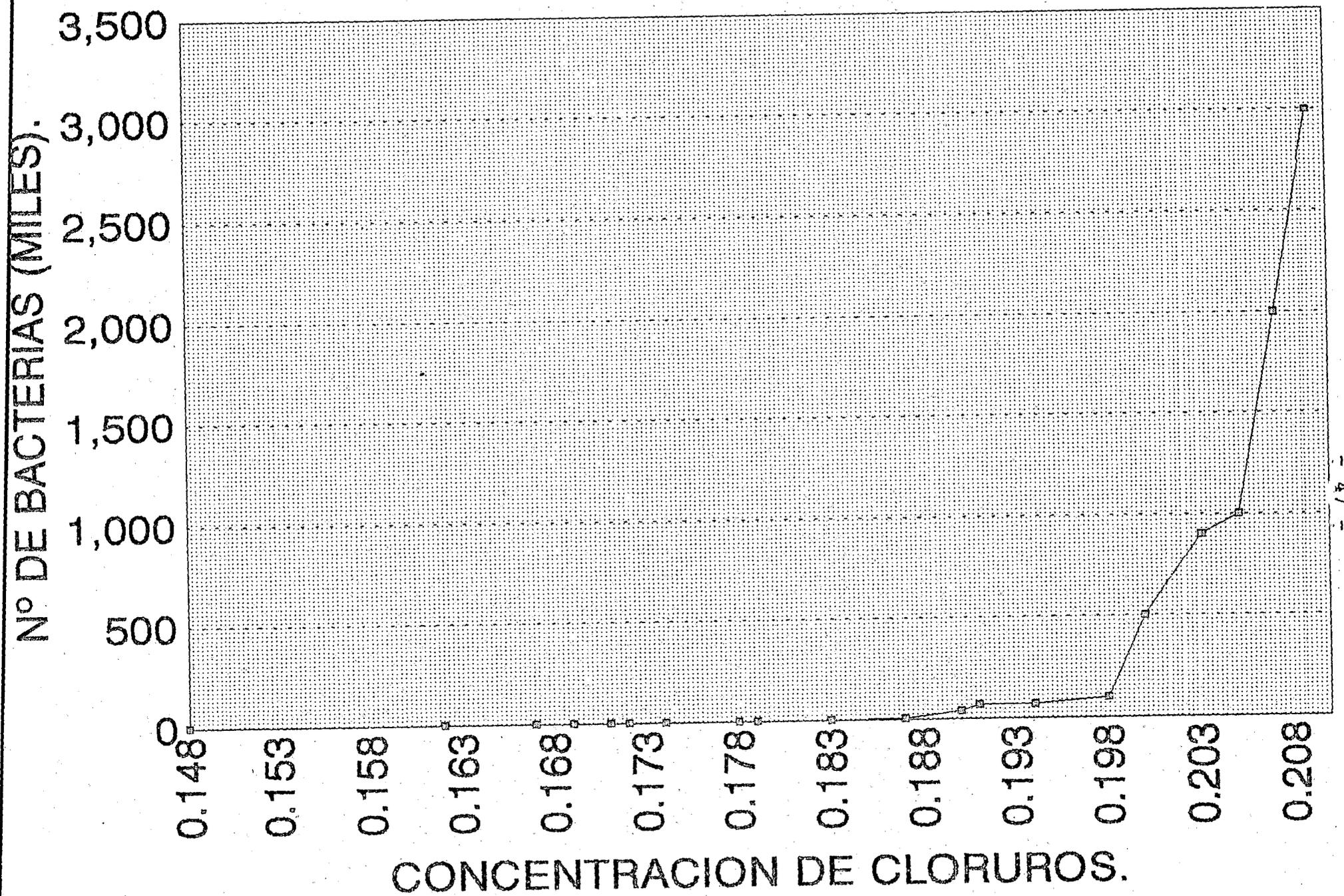


Fig 3. Curva de correlación de concentración de cloruros y número de colonias bacterianas en leches enfermas

5. CONCLUSIONES

- La concentración de cloruros, posee una relación directa en cuanto al aumento del número de bacterias dentro de una colonia.
- Las concentraciones normales de cloruros en leche cruda de vaca en la zona costera del Departamento de La Libertad, oscila de 0.010% a 0.114%, con un máximo de 100 colonias bacterianas inócuas.
- Las concentraciones de cloruros mayores de 0.148% con un mínimo de 1800 colonias bacterianas patógenas (Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus y Escherichia coli), se consideran como leches enfermas de mastitis o mamitis.
- Las concentraciones de cloruros de 0.117% a 0.138% con un número variado de colonias bacterianas (inócuas y patógenas), se consideran como leches con período de transición de sanas a enfermas o mamitis.
- Los resultados de la evaluación estadísticas demuestran la relación directa y proporcional entre las concentraciones de cloruros y el número de colonias bacterianas en donde se obtuvo precisión y la exactitud que avalan la confiabilidad de la metodología presentada.

6. RECOMENDACIONES

- De los resultados obtenidos se determinó la técnica de volumetría por precipitación, método de Volhard, se debe utilizar como otra prueba indirecta para la detección de mastitis.

- Realizar otros estudios en cuanto a la concentración de cloruros en otras zonas ganaderas del país con el método de Volhard para la cuantificación de cloruros; comparado siempre con las pruebas bacteriológicas y bioquímicas.

- Se recomienda a los ganaderos de la zona poner en control a las vacas que muestren leches con concentraciones que estén en período de transición de la enfermedad (0.117 - 0.138), como una medida para eliminar la enfermedad en el hato.

- Realizar la prueba cada quince días, para tener un mejor control de la enfermedad en el ganado lechero y minimizar las pérdidas económicas.

- Investigar y desarrollar otros métodos indirectos para la detección de la mastitis que se basen, en alteraciones fisicas, químicas, bacteriológicas, etc. en la leche.

- Que la investigación se continúe en otras zonas a fin de establecer parámetros sobre concentración de cloruros propios de El Salvador.

- Comparar concentraciones de cloruros en vacas encastadas razas puras.

8. BIBLIOGRAFIA

1. ALAS, CH. 1987. Ciencia de la leche. Principio de técnicas lecheras. México, D.F. Edición Continental. P. 212-219.
2. AMAYA, L.A. 1978. La leche de vaca; sus propiedades físico químico y sus posibles adulteraciones. Agricultura en El Salvador. 17(3): 23-39.
3. BALOWS, A.; HAUSLER, J.; KENNETH, L.; HERRMAN, H.; ISENBERG, D.; SHADOMY, J. 1991. Manual Clinical Microbiology, Washington, S.C., USA. American Society Microbiology. P. 130-143.
4. BECTON, DICKINSON Y COMPANY. 1974. Manual de procedimientos de laboratorio y de productos BBL. México, d.f.; s.n. P. 103, 111-114.
5. BLOOD, D.C.; HENDERSON, J.A. 1986. Medicina veterinaria, Trad. Fernando Colchera. 6 ed. Interamericana. P. 491-502.
6. BOJORQUEZ, J.H. 1977. Determinación de la prevalencia de la brucelosis, tuberculosis. Mastitis sub-clínica e identificación de garrapatas en 7 cantones de la zona nororiental de El Salvador. Tesis Med. Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. P. 16-22.
7. CALZADA BENZA, J. 1970. Método estadístico para la investigación. 3 ed. Lima, Perú, Jurídica. P. 185-383.

8. CAÑAS DE MORENO, F. s.f. Manual de laboratorio de química analítica. San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas. P.
9. CASADO CIMIANO, P.; GARCIA ALVAREZ, J.A. 1986. Mamitis y calidad de la leche. 2 ed. Madrid, España. Publicaciones Agrarias. 20 P.
10. CHINCHILLA, M.D. 1978. Mamitis o mastitis. Agricultura en El Salvador. P. 87-93.
11. CHRISTIAN, G.D. 1990. Química Analítica. 2 ed. México, D.F. Limusa. P. 287-292.
12. COLES EMBERT, H. 1968. Patología y diagnóstico veterinarios. México, D.F. Interamericano. P. 238, 273-283.
13. CRISTIAN GARY, D. 1990. Química analítica. 2 ed. México, D.F. Limusa. P. 357-359.
14. DEL CASTILLO, T.; DE OLMEDO, P. 1983. Manual de laboratorio de Microbiología Agrícola. San Salvador, Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas. P. 71-80.
15. DE RODRIGUEZ, B.M.; MARTIN, G.E. 1980. Análisis de alimento. Caracas, Venezuela. Ed. Trollana. P. 30-35.
16. DIFCO. 1978. Manual de bacteriología: Recopilaciones técnicas; Madrid, España. Mirasa. P. 185-383.
17. FISCHER, R. B.; PETERS, D.G. 1970. Análisis químico - cuantitativo. 3 ed. México, D.F. Interamericana. P. 335-341.

18. FRITZ, J.S.; SCHENK, H. 1986. Química analítica cuantitativa. México, D.F. Limusa. P. 247-251.
19. GARAY D. CRISTIAN. 1990. Química analítica. 2 ed. México, D.F. Editores Noriega. P. 287-292.
20. GRAY YOUNG. G. 1972. Microbiología. 3 ed. México, D.F. Continental. P. 469-487.
21. GENEVIEVE GRAY YOUNG. 1972. Microbiología, 3 ed. México, D.F. Ed. Continental. P. 576.
22. GUZMAN, P.A. 1986. Diccionario geográfico de El Salvador. M.O.P.; Instituto Geográfico Nacional. San Salvador, El Salvador. P. 106.
23. HAMILTON, F.L.; STEPHEN, S.B.; SIMPSON, G. 1976. Cálculos de química analítica. 6 ed. México, D.F., México McGraw-Hill. P. 266, 267.
24. JAMES S. FRITZ; GEORGE, H.SCHENK. 1986. Química analítica cuantitativa. México, Limusa.
25. JORGENSEN, A. 1959. Microbiología de las fermentaciones industriales. 7 ed. Zaragoza, España, Acribia. P. 785-789, 191, 299, 303, 307.
26. JUDKINS, H.F.; KENNER, H.A. 1984. La leche, su producción y procesos industriales. Trad. Alfonso Vesscur. México, D.F. Continental. P. 37-55.
27. KATONA, F.; GARAY, T. 1970. Noción del contenido de cloro en la leche, el método colorimétrico y potenciométrico. Buenos Aires, Argentina. La Pampa. P. 71-105.

28. LITTLE, T.M.; HILLS, F.J. 1976. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Trad. Anatolio de Paula Crespo. México. Trillas. P. 145-163.
29. MATEUS VALLES, G. 1983. Mastitis en bovinos. San José, Costa Rica. CATIE. P. 12.
30. MEDINA HELGADO, O. 1966. Contribución al estudio de la mastitis bovina en el Departamento de Managua. Tesis Ing. Agr. Nicaragua, Universidad Autónoma de Managua, Facultad de Ciencias Agronómicas. P.
31. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA. 1992. Almanaque Salvadoreño. Centro de Recursos Naturales, Servicio de Meteorología e Hidrología. San Salvador, El Salvador. P. 48-59.
32. REVILLA, R.A. 1976. Tecnología de la leche: Procesamientos, manufactura y análisis. México, D.F. Herre-ro Hermanos. P. 11-19.
33. RICHARD, H. MCBEE, WILLIAN, G.W. 1962. Microbiología general. 2ª ed. México, D.F. P.
34. RIVERA AMAYA, J.; MERROCAL, M.C. 1962. Las mastitis en los hatos lecheros de Puerto Rico. Boletín Informativo, Universidad de Puerto Rico. 32 P.
35. RUANO WILSON, S.E. 1978. Medidas profilácticas para el control de ciertas enfermedades que afectan al hato bovino nacional. Agricultura en El Salvador. 17(3): 19.

36. RUNNELLS, R.A.; MONLUX, W.S. 1987. Principios de patología veterinaria: Anatomía Patología. Trad. Guillermo Quezada. México, D.F. Continental. P. 669-675.
37. SARAN, A. 1986. Mastitis bovina: Enfermedades de la ubre y su control en Israel. Trad. Ana Lizer. Madrid, España. Ed. Madrid. P. 55.
38. TRIGO TAVERA, F.J. 1992. Patología sistémica veterinaria. 2 ed. México, D.F. Ed. Intera Mexicana. P. 212-219.
39. VANDEPITE ETAL, J. 1993. Métodos básicos de laboratorio en bacteriología clínica. S.L., s.n. P. 55-63.
40. WALTER, G.W.; McBEL, R.H. 1962. Microbiología general. 2a. ed. México, D.F. Continental. P. 386-391.

8. A N E X O S

A-1.- Cálculo de correlación de leches sanas.

Sumatoria de X ($\sum CL_7$)

$$\sum X = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n$$

$$\sum X = 0.010 + 0.012 + 0.013 + \dots + 0.114$$

$$\sum X = 4.032.$$

Sumatoria de Y (NCB)

$$\sum Y = Y_1 + Y_2 + Y_3 + \dots + Y_n$$

$$\sum Y = 0 + 0 + 0 + 0 + 10 + \dots + 100$$

$$\sum Y = 2660$$

MEDIA DE X

MEDIA DE Y

$$\bar{x} = \frac{\sum X}{n}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum Y}{n}$$

$$\bar{x} = \frac{4.032}{58}$$

$$\bar{y} = \frac{2660}{58}$$

$$\bar{x} = 0.0695$$

$$\bar{y} = 45.862$$

Suma de cuadrado de X

$$SCX = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$SCX = (0.010)^2 + (0.012)^2 + \dots + (0.114)^2 - \frac{(0.010 + 0.012 + \dots + 0.114)^2}{58}$$

$$SCX = 0.325122 - 0.2802$$

$$SCX = 0.448284$$

Suma de cuadrado de Y

$$SCY = \sum y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}$$

$$CY = 0^2 + 0^2 + 0^2 + 0^2 + 10^2 \dots 100^2 - \frac{(0+0+0+0+10+\dots+100)^2}{58}$$

$$SCY = 168600 - \frac{(2660)^2}{58}$$

$$SCY = 46606.897$$

Prueba de correlación para leches sanas.

$$r = \frac{\sum XY - (\sum X \cdot \sum Y)/n}{\sqrt{\sum X^2 - (\sum x)^2/n \cdot \sum Y^2 - (\sum y)^2/n}}$$

$$r = \frac{229.52 - 184.916}{\sqrt{0.0451 \times 46606.9}} \quad r = 0.973$$

$$b = \frac{\sum xy - (\sum x \cdot \sum y)/n}{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}$$

$$\sum xy = (x_1 \times y_1) + (x_2 \times y_2) + \dots + (x_n \times y_n)$$

$$\sum xy = (0.010 \times 0) + (0.012 \times 0) + \dots + (0.114 \times 100)$$

$$\sum xy = 229.52$$

Sustituyendo en b

$$b = \frac{229.52 - (4.032 \times 2660)/58}{0.325122 - (4.032)^2/58}$$

$$b = 994.99241$$

A-2. Cálculo de correlacion de leches en transición

Sumatoria de X

$$\sum X = x_1 + x_2 + \dots + x_n$$

$$\sum X = 0.117 + 0.118 + \dots + 0.138$$

$$\sum X = 0.997$$

Sumatoria de Y

$$\sum Y = Y_1 + Y_2 + \dots + Y_n$$

$$\sum Y = 1500 + 120 + \dots + 140$$

$$\sum Y = 7591$$

PROMEDIO DE X

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\bar{x} = \frac{0.997}{8}$$

$$\bar{x} = 0.126$$

PROMEDIO DE Y

$$\bar{y} = \frac{\sum Y}{n}$$

$$\bar{y} = \frac{7591}{8}$$

$$\bar{y} = 948.87$$

Sumatoria cuadrada de x

$$SCX = \sum x^2 - (\sum x)^2/n$$

$$SCX = (0.117)^2 + (0.118)^2 + (0.120)^2 + \dots + (0.138)^2 - (0.997)^2/8$$

$$SCX = 0.124607$$

Sumatoria cuadrada de y

$$SCY = \sum y^2 - (\sum y)^2/n$$

$$SCY = (1500)^2 + (120)^2 + (1600)^2 + \dots + (140)^2 - (7591)^2/8$$

$$SCY = 10471161$$

PRUEBA DE CORRELACION PARA LECHES EN TRANSICION

$$r = \frac{\sum XY - (\sum x \cdot \sum y) / n}{\sqrt{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2 / n}}$$

$$r = \frac{933.217 - (0.997 \times 7591) / 8}{\sqrt{0.124607 - (0.997)^2 / 8 \times 10471161 - (7591)^2 / 8}}$$

$$r = 0.3772$$

$$b = \frac{\sum xy - (\sum x \cdot \sum y) / n}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$\sum xy = (x_1 \times y_1) + (x_2 \times y_2) + \dots + (x_n \times y_n)$$

$$\sum xy = (0.117 \times 1500) + (0.118 \times 120) + \dots + 0.138 \times 140$$

$$\sum xy = 933.217$$

$$b = \frac{933.217 - (0.997 \times 7591) / 8}{0.124607 - \frac{(0.997)^2}{8}}$$

$$b = -36301.807$$

A-3. Cálculo de correlación de leches enfermas.

Sumatoria de x

$$\sum x = x_1 + x_2 \dots + x_n$$

$$\sum x = 0.148 + 0.162 + 0.167 \dots + 0.209$$

$$\sum x = 3.687$$

Sumatoria de y

$$\sum Y = Y_1 + Y_2 \dots + Y_n$$

$$\sum Y = 1800 + 1900 + 1900 + \dots + 3000000$$

$$\sum Y = 7728200$$

PROMEDIO DE X

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\bar{x} = \frac{3.687}{20}$$

$$\bar{x} = 0.18435$$

PROMEDIO DE Y

$$\bar{y} = \frac{\sum Y}{n}$$

$$\bar{y} = \frac{7728200}{20}$$

$$\bar{y} = 386410$$

Sumatoria cuadrada de x

$$SCX = \sum x^2 - (\sum x)^2/n$$

$$SCX = (0.148)^2 + (0.162)^2 + (0.167)^2 \dots + (0.209)^2 - (1800 + 1900 + 3000000)^2 / 20$$

$$SCX = 5.30155 \times 10^{-3}$$

Sumatoria Cuadrado de y

$$SCY = \sum y^2 - (\sum y)^2 / n$$

$$SCY = (1800)^2 + (1900)^2 + (1900)^2 + \dots + (3000000)^2 - (1800 + 1900 + 1900 + \dots + 3000000)^2 / 20.$$

$$SCY = 1.2095747 \times 10^{13}$$

PRUEBA DE CORRELACION PARA LECHES ENFERMAS

$$r = \frac{\sum xy - (\sum x \cdot \sum y) / n}{\sqrt{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2 / n}}$$

$$r = \frac{1587849.3 - (3.687 \times 7728200) / 20}{\sqrt{0.685 - (3.687)^2 / 20 \cdot 1.5082001^{13} - (7728200)^2 / 20}}$$

$$r = 0.644$$

$$b = \frac{\sum xy - (\sum x \cdot \sum y) / n}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$\sum xy = (x_1 \times y_1) + (x_2 \times y_2) + \dots + (x_n \cdot y_n)$$

$$\sum xy = (0.148 \times 1800) + (0.162 \times 1900) + \dots + (0.209 \times 3000000)$$

$$\sum xy = 16315563$$

$$b = \frac{16315563 - (3.687 \times 7728200) / 20}{5.30155 \times 10^{-3} - \frac{(3.687)^2}{20}}$$

$$b = 30775081$$

A-4. Prueba de hipótesis para leches sanas.

$$H_0 \rho = 0$$

$$H_0 \rho \neq 0$$

$$t = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$$

$$t = 0.973 \sqrt{\frac{58-2}{1-(0.973)^2}}$$

$$t = 31.547$$

$$t \text{ (tabla)} = 0.250 \text{ al } 5\%^*$$

$$3.476 \text{ al } 7\%^{**}$$

Altamente significativo al 1%

Significativo al 5%

A.5. Prueba de hipótesis correlativa para leches en transición.

$$H_0 = 0$$

$$H_0 \neq 0$$

$$t = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$$

$$t = 0.3756 \sqrt{\frac{8-2}{1-(0.3756)^2}}$$

$$t = 0.9927129$$

$$t(\text{tabla}) = 0.707 \text{ al } 5\% *$$

$$5.959 \text{ al } 1\%^{ns}$$

No significativo al 1%

Significativo al 5%

A.6. Prueba de hipótesis correlativa para leches enfermas.

$$H_0 = 0$$

$$H_0 \neq 0$$

$$t = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$$

$$t = \sqrt{\frac{20-2}{1-(0.644)^2}}$$

$$t = 5.545 \quad 5.55$$

$$t(\text{tabla}) = 2.101 \text{ al } 5\%*$$

$$3.922 \text{ al } 1\%**$$

Altamente significativo al 1%

Significativo al 5%.

A.7. Coeficiente de correlación para leche sana

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

$$CV = \frac{0.0007864}{0.0695} \times 100$$

$$S = \sqrt{\frac{0.0448285}{57}}$$

$$CV = 1.13\%$$

$$S = 0.0007864$$

A.8. Coeficiente de variación para leches en período de transición.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

$$CV = \frac{0.0071414}{0.125} \times 100$$

$$S = \sqrt{\frac{0.000357}{7}}$$

$$CV = 5.71\%$$

$$S = 0.0071414$$

A.9. Coeficiente de variación para leches enfermas.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

$$CV = \frac{0.0168093}{0.18435} \times 100$$

$$S = \sqrt{\frac{0.0053685}{19}}$$

$$CV = 9.11\%$$

$$S = 0.0168093$$

A-10. Concentraciones de cloruros por hacienda.

| No. | NOMBRE DE HACIENDA | CONCENT. CLE | | | |
|-----|--------------------|--------------|----|------------|--------|
| | PROVIDENCIA | | 11 | | 0.66 |
| 1 | | 0.018 | 12 | | 0.67 |
| 2 | | 0.032 | 13 | | 0.069 |
| 3 | | 0.046 | 14 | | 0.073 |
| 4 | | 0.050 | 15 | | 0.076 |
| 5 | | 0.057 | 16 | | 0.082 |
| 6 | | 0.060 | 17 | | 0.093 |
| 7 | | 0.068 | 18 | | 0.096 |
| 8 | | 0.075 | 19 | | 0.101 |
| 9 | | 0.082 | 20 | | 0.104 |
| 10 | | 0.084 | 21 | | 0.117 |
| 11 | | 0.087 | 22 | | 0.138 |
| 12 | | 0.094 | 23 | | 0.162 |
| 13 | | 0.096 | 24 | | 0.172 |
| 14 | | 0.101 | 25 | | 0.210 |
| 15 | | 0.104 | | LA ZORRITA | |
| 16 | | 0.105 | 1 | | 0.0062 |
| 17 | | 0.108 | 2 | | 0.010 |
| 18 | | 0.112 | 3 | | 0.017 |
| 19 | | 0.119 | 4 | | 0.034 |
| | LAS FLORES | | 5 | | 0.037 |
| 1 | | 0.017 | 6 | | 0.044 |
| 2 | | 0.028 | 7 | | 0.058 |
| 3 | | 0.032 | 8 | | 0.062 |
| 4 | | 0.042 | 9 | | 0.065 |
| 5 | | 0.045 | 10 | | 0.069 |
| 6 | | 0.046 | 11 | | 0.075 |
| 7 | | 0.048 | 12 | | 0.082 |
| 8 | | 0.050 | 13 | | 0.090 |
| 9 | | 0.053 | 14 | | 0.092 |
| 10 | | 0.055 | 15 | | 0.096 |

| No. | NOMBRE DE LA HACIENDA | CONCENT. CLE. | | | |
|-----|-----------------------|---------------|----|------------------|-------|
| | Cont. ZORRITA | | 20 | | 0.106 |
| 16 | | 0.101 | 21 | | 0.113 |
| 17 | | 0.107 | 22 | | 0.117 |
| 18 | | 0.117 | 23 | | 0.124 |
| 19 | | 0.119 | 24 | | 0.127 |
| 20 | | 0.201 | 25 | | 0.131 |
| 21 | | | | DELICIAS DEL SUR | |
| 22 | | | 1 | | 0.010 |
| 23 | | | 2 | | 0.011 |
| 24 | | | 3 | | 0.013 |
| 25 | | | 4 | | 0.046 |
| | CUATRO ACES | | 5 | | 0.048 |
| 1 | | 0.010 | 6 | | 0.050 |
| 2 | | 0.012 | 7 | | 0.051 |
| 3 | | 0.046 | 8 | | 0.053 |
| 4 | | 0.049 | 9 | | 0.055 |
| 5 | | 0.053 | 10 | | 0.056 |
| 6 | | 0.054 | 11 | | 0.059 |
| 7 | | 0.056 | 12 | | 0.061 |
| 8 | | 0.058 | 13 | | 0.062 |
| 9 | | 0.060 | 14 | | 0.072 |
| 10 | | 0.062 | 15 | | 0.083 |
| 11 | | 0.063 | 16 | | 0.094 |
| 12 | | 0.073 | 17 | | 0.101 |
| 13 | | 0.080 | 18 | | 0.102 |
| 14 | | 0.081 | 19 | | 0.106 |
| 15 | | 0.085 | 20 | | 0.110 |
| 16 | | 0.086 | 21 | | 0.115 |
| 17 | | 0.087 | 22 | | 0.117 |
| 18 | | 0.090 | 23 | | 0.119 |
| 19 | | 0.099 | 24 | | 0.120 |

Anexo 11. Preparación de solución estandar de nitrato de plata 0.1 N.

Procedimiento :

Desecar en estufa a 110 °C durante una o dos horas, en pesafiltro limpio y seco, nitrato de plata de grado reactivo analítico, enfriar y pesar al miligramo 16.989 g, disolver en agua libre de cloruros, aforar a un litro de frasco volumétrico, tapar el frasco volumétrico, mezclar bien la solución por agitación, rotación e inversión del frasco volumétrico varias veces. Las soluciones valoradas de nitrato de plata, deben protegerse contra el polvo; que produce reducción de la plata y de la luz, que provoca una reducción fotoquímica (8).

Anexo 12. Preparación de solución de tiocianato de potasio 0.1 N.

Procedimiento :

Pesar en balanza analítica 9.8 g de tiocianato de potasio calidad reactivo analítico, transferir a un frasco volumétrico de 1000 ml, agregar agua destilada suficiente para disolver el tiocianato de potasio, llenar con agua destilada hasta la marca. Tapar el frasco y mezclar bien la solución repetidas veces.

Estandarización de la solución de tiocianato de potasio:
Medir con pipeta volumétrica 25 ml de la solución 0.1 N de

nitrate de plata y colocarla en un Erlenmeyer limpio de - 250 ml. Agregar 5 ml de ácido nítrico 6N, luego 2 ml de indicador sulfato férrico amónico y 20 ml de agua destilada. Llenar una bureta de 50 ml con solución de tiocianato de potasio y valorar hasta obtener una coloración perceptible y permanente de color pardo rojizo débil que persista por un minuto.

Calcular la normalidad de la solución de tiocianato de potasio. Repetir la titulación por lo menos con dos alícuotas adicionales de la solución de nitrato de plata (8).

Calcular el promedio de los tres valores obtenidos y anotar la normalidad en el en el frasco que contiene la solución (8).

Anexo 13. Preparación del indicador sulfato férrico amónico.

Es una solución saturada de alumbre férrico, $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ en ácido nítrico concentrado.

Pesar 35 gramos de sal, agregar ácido nítrico concentrado hasta que desaparezca el color pardo rojizo, llevar a volumen de 100 ml en agua destilada (8).

Anexo 14. Preparación de la solución de ácido nítrico 6 N

Para la preparación de esta concentración se emplea la fórmula $V_1 \cdot C_1 = V_2 C_2$, en donde :

V_1 = Es el volumen que se desea preparar

C_1 = La concentración 6N a preparar

V_2 = Es el volumen de ácido nítrico concentrado a agregar.

C_2 = Es la concentración que tiene el ácido nítrico concentrado (14 N).

Encontrando el volumen de ácido nítrico concentrado, disolver el agua destilada y aforar al volumen a preparar - (8).

Anexo 15. Coloración bacteriana de Gram

En este método de coloración, las bacterias se dividen - en dos grandes grupos: Las que conservan el cristal violeta llamadas "Gram positivas" y las que se decoloran y se tiñen con el colorante de contraste (safranina), llamadas "Gram negativas".

En este método se utilizaron los colorantes y reactivos violeta solución alcohol-lugol, alcohol-acetona y safranina. Para ello se preparó un frotis de cada una de las diferentes colonias bacterianas que se desarrollaron en los medios de - cultivos selectivos, los cuales se dejaron secas al aire y - fijaron a la llama del mechero; luego se procedió de la si- guiente manera :

- a) El frotis fijado se cubrió con cristal violeta un minuto, se lavó luego con agua de chorro.
- b) Se cubrió con lugol un minuto, se escurrió y se lavó con agua de chorro (14).
- c) Se añadió alcohol acetona hasta que escurrió incoloro de

15 a 20 segundos (este paso es clave para la coloración, luego se lavó con abundante agua.

- d) Se cubrió el frotis con safranina por un minuto, se lavó luego con agua y secado al aire, ya seco se observó al - microscopio con el objetivo de inmersión (14).