

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

**DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CLORUROS
POR POTENCIOMETRÍA DIRECTA, PARA LA DETECCIÓN
DE MASTITIS EN VACAS LECHERAS, EN EL
DEPARTAMENTO DE SAN MIGUEL**

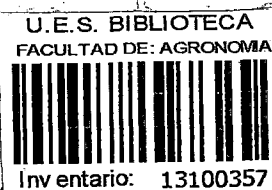
POR:

**JUAN ANÍBAL CANALES HERNÁNDEZ
WILFREDO ERNESTO PARADA TORRES
AMILCAR ENCARNACIÓN VIGIL IRAHETA**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO**

SAN SALVADOR, DICIEMBRE DE 1996

TUES
1304
C 212
1996



348
EJ 1

LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR : DR. JOSÉ BENJAMIN LÓPEZ GUILLEN

SECRETARIO GENERAL : LIC. ENNIO ARTURO LUNA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

DECANO : ING. AGR. RODOLFO MIRANDA GAMEZ

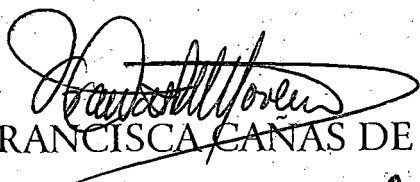
SECRETARIO : ING. AGR. LUIS HOMERO LÓPEZ

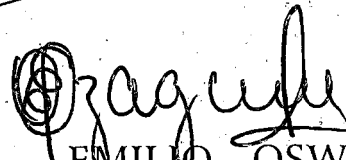
GUARDADO

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA :


ING. AGR. RAMÓN ANTONIO GARCÍA SALINAS

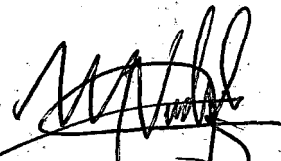
ASESORES :


DRA. FRANCISCA CAÑAS DE MORENO


ING. AGR. EMILIO OSWALDO IZAGUIRRE
MEDINA

JURADO EXAMINADOR :


ING. AGR. CARLOS RENÉ PLATERO MONTOYA


ING. AGR. JOSÉ MARIO VIDES SILVA


ING. AGR. OSCAR MAURICIO CARRILLO TURCIOS

TUES
1304
C212
1996

1348
EJ-1

RESUMEN

La presente investigación se efectuó en seis haciendas dedicadas a la producción lechera, ubicada en la periferia de la ciudad de San Miguel, cuyas coordenadas geográficas son las siguientes:

13 grados 28 minutos latitud norte y 88 grados 11 minutos longitud oeste y a una elevación de 100 m.s.n.m.

El objetivo del estudio fué evaluar el método de potenciometría directa como una alternativa para la detección de mastitis, técnica basada en la concentración de cloruros presentes en leches crudas.

El desarrollo del trabajo tuvo una duración de 69 días; 30 de los cuales correspondieron a la fase pre - experimental donde se determinó las concentraciones de cloruros de leche cruda provenientes de vacas sanas y enfermas; los 39 días restantes se utilizaron en la fase experimental. A la hacienda que presentó mayor incidencia de mastitis se les evaluó todas las vacas en producción y las muestras de leche fueron sometidas a análisis químicos y microbiológicos.

Para la toma de muestras se utilizaron 81 vacas encastadas (Brown - Swiss - Brahman). Dichas muestras fueron analizadas en 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 Ministerio de Agricultura y Ganadería (M.A.G.). A los resultados obtenidos se les aplicó la prueba de correlación y de regresión para realizar el análisis estadístico.

La correlación lineal permitió determinar tres tipos de leche:

a) Leches sanas, en la cual el rango de concentración de cloruros es de 0.077 a 0.114 % y un máximo de 100 colonias bacterianas.

b) Leches en procesos de transición, con concentración de cloruros de 0.117 a 0.138 % y un número variado de colonias.

c) Leches enfermas, con concentración de cloruro de 0.140 a 0.332 % y un mínimo de 1,700 colonias bacterianas patógenas.

Para verificar el grado de dependencia entre la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas, se hizo un análisis de varianza de regresión (ANVA), en el cual se obtuvo en las leches sanas y enfermas una alta significancia al 1%, y en las leches en proceso de transición no se obtuvo significancia.

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

AGRADECIMIENTOS

• A NUESTROS ASESORES :

A la Dra. Francisca Cañas de Moreno , le agradecemos con toda sinceridad y de manera especial , por el asesoramiento brindado y la colaboración desinteresada en la elaboración del presente estudio.

Al Ing. Agr. Emilio Oswaldo Izaguirre Medina :

Por su asesoría y cooperación incondicional en la realización del presente trabajo.

• AL DR. FRANCISCO FAGIOLI :

Por su valiosa colaboración para realizar el estudio .

• A LOS PROPIETARIOS DE LAS GRANJAS LECHERAS :

Por su valiosa colaboración.

• AL PERSONAL DE LOS LABORATORIOS DE LA UNIDAD DE QUÍMICA Y PROTECCIÓN VEGETAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR :

Por su ayuda en la realización de los análisis

• A LOS MIEMBROS DEL JURADO EXAMINADOR :

Ingenieros Agrónomos : Carlos Rene Platero Montoya , José Mario Vides Silva, Oscar Mauricio Carrillo Turcios , por su acertadas observaciones.

• A NUESTRA ALMA MATER :

Por habernos forjado como profesionales .

• A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE UNA , OTRA FORMA COLABORARON EN EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO .

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO :

Por haberme iluminado y permitir durante mis años de estudio, llegar con bendición a culmina mi carrera.

A MI PADRE :

Juan Antonio Canales D. Por su amor , sacrificio y consejos en mi vida .

A MI MADRE :

María Dolores Hernández de Canales. Por su comprensión , sacrificio, consejos y amor , lo cual me fortaleció para continuar en los momentos difíciles de mis años de estudios.

A MIS HERMANOS :

Carlos Ernesto , Lilian Elena , Gloribel de la Paz , Ana Lucy , Iris Dolores . Por su comprensión y apoyo .

A MIS FAMILIARES :

Con afecto y cariño , por fortalecer mi espíritu de formación.

A MIS MAESTROS :

Por su valiosa enseñanza , en mi formación profesional .

A MIS COMPAÑEROS DE TESIS :

Por compartir este trabajo.

Juan Aníbal Canales Hernández

DEDICATORIA

A DIOS TODO PODEROSO:

Por haberme iluminado y permitir culminar con éxito mi carrera

A MI PADRE

Lito Parada S.

Por darme fortaleza, comprensión y apoyo, sin los cuales no hubiera podido llegar a culminar mi meta.

A MI MADRE:

Rosa A. Torres de Parada.

Por su dedicación, comprensión, sacrificios, consejos y amor, lo cual me fortaleció para continuar en los momentos difíciles de mis años de estudio

A MIS HERMANOS:

Herberth, Mario, Paty, Roxana

Por su constante apoyo en mi formación profesional.

A NUESTROS ASESORES:

Dra. Francisca Cañas de Moreno

Ing. Emilio Oswaldo Izaguirre

Por su ayuda y cooperación en la realización de este trabajo

A MIS COMPAÑEROS DE ESTUDIO:

Por su valiosa amistad, y ánimo de superación.

A MIS MAESTROS:

Por su valiosa enseñanza en mi formación profesional.

A TODOS MIS AMIGOS:

Los que de alguna forma contribuyeron en mi formación profesional,
mis más sinceras agradecimientos

A MIS COMPAÑEROS DE TESIS:

Por compartir en todo momento la realización de este trabajo

Wilfredo Ernesto Parada Torres.

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO :

Por haberme iluminado durante mis años de estudio, para llegar con feliz termino a la culminación de mi carrera .

A MI PADRE

Miguel Angel Vigil Coreas

Por su amor, comprensión y apoyo incondicional que sin ello no hubiera podido llegar a culminar esta meta

A MI MADRE

Gladis Iraheta de Vigil

Por su dedicación sacrificios , consejos , confianza depositada en mi , amor lo cual me fortaleció a seguir adelante en el desarrollo de mi carrera

A MIS ABUELOS

Filomena Vigil (de grata recordación) y Luis Callejas

Por su consejos sabios en la conducción de mi vida y en la realización de mi carrera

A MIS HERMANOS

Miguel Angel Vigil Iraheta, Keny Marisol Vigil Iraheta. Por creer siempre en mi y por su apoyo permanente en mi formación profesional .

A MIS FAMILIARES

Por contribuir con su afecto y cariño a la realización de mi profesión .

MIS COMPAÑEROS DE ESTUDIO

Por su amistad sincera demostrada y por el ánimo de superación .

A MIS MAESTROS

Por transmitir sus conocimientos en mi formación profesional

A MIS AMISTADES

Por contribuir con su ánimos a fortalecer mi espíritu de superación.

A MIS COMPANEROS DE TESIS

Por compartir este trabajo

Amílcar Encarnación Vigil Traheta

INDICE

	# pág.
RESUMEN	iV
AGRADECIMIENTOS.....	Vi
DEDICATORIAS.....	Viii
INDICE DE TABLAS.....	XVii
INDICE DE FIGURAS	XViii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 La leche	3
2.1.1. Formación de la leche	3
2.1.2. Composición de la leche	3
2.1.3. Factores que intervienen en la producción y composición de la leche	5
2.1.4. Influencia de factores que varían el contenido de minerales en la leche	6
2.2. Estructura de la ubre.....	7
2.2.1. Glándula mamaria	8
2.3. Mastitis o mamitis en ganado bovino	9
2.3.1. Gérmenes causantes de mastitis	10
2.3.1.1. Estreptococos.....	11
2.3.1.2. Estafilococos.....	11
2.3.1.3. Gérmenes Coliformes	12
2.3.1.4. <u>Corynebacterium pyogenes</u>	12
2.3.1.5. <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	13
2.3.1.6. Levaduras.....	13
2.3.2. Manifestaciones de la Mastitis	13
2.3.2.1. Infección	14
2.3.2.2. Mastitis clínica.....	14
2.3.2.3. Mastitis Aguda	14
2.3.2.4. Mastitis superaguda.....	14

2.3.2.5. Mastitis Subclinica	14
2.3.2.6. Mastitis Crónica.....	15
2.3.3. Tipos de Mastitis.....	17
2.3.3.1. Mastitis Serosa.....	17
2.3.3.2. Mastitis Superativa	17
2.3.3.3. Mastitis Tuberculosa.....	17
2.3.3.4. Mastitis granulomatosa.....	17
2.3.4. Factores que predisponen la Mastitis	17
2.3.4.1. Higiene deficiente en establo	18
2.3.4.2. Formas inconvenientes de la mama.....	18
2.3.4.3. Extasis láctea y ordeño defectuoso.....	18
2.3.4.4. Receptividad aumentada.....	18
2.4. Pruebas para la detección de mastitis.....	18
2.4.1. Prueba California (C. M. T)	18
2.4.1.1. Interpretación de la prueba california	21
2.4.2. Prueba Bacteriológica.....	22
2.5. Determinación de cloruros.....	23
2.6. Consideraciones teóricas	24
2.6.1. Potenciometria Química	24
2.6.1.1. Electrodo indicadores	25
2.6.1.2. Instrumentos para medir el potencial	26
2.6.1.3. Ecuación de Nernst	26
2.6.1.4. Electrodo Ion - Selectivos.....	30
2.6.1.4.1. Teorías de operación del electrodo para los Iones	
Cloruros	32
2.6.2. Concentración y actividad.....	33
2.6.3. Exactitud y precisión	34
3. MATERIALES Y METODOS.....	36
3.1. Localización del Estudio	36

3.1.1. Características Climáticas	36
3.1.1.1. Temperatura.....	36
3.1.1.2. Humedad Relativa	36
3.1.1.3. Precipitación	36
3.1.3.4. Viento	36
3.1.2. Topografía del lugar	37
3.1.3. Recursos Hídricos	37
3.1.4. Edafología del Lugar	37
3.1.5. Vías de Acceso	37
3.1.6. Material Experimental	37
3.2. Duración del Estudio	38
3.2.1. Fase Pre - experimental	38
3.2.2. Fase experimental	38
3.3. Procedimiento para toma de muestra.....	39
3.4. Prueba Electroanalítica	39
3.4.1. Método de potenciometría directa.....	39
3.4.2. Recursos de laboratorio	39
3.4.3. Procedimiento de Método potenciométrico	41
3.4.3.1 . Curva de calibración y Lectura de muestras.....	41
3.4.4. Cálculos	41
3.5. Medios Selectivos.....	42
3.5.1. Medio Agar Sangre	42
3.5.2. Medio #110.....	42
3.5.3. Medio Mc Conkey	43
3.5.4. Medio Edwards.....	43
3.5.5. Siembra de la placa petri	44
3.5.6. Llenado de placas petri	44
3.5.7. Recuento de Colonias	44
3.6. Pruebas Bioquímicas	44

3.6.1 . Prueba de IMVIC	45
3.6.2 . Indol	45
3.6.3 . Rojo de Metilo	45
3.6.4 . Voges - Proskauer	45
3.6.5 . Citrato de Simmoms	45
3.6.6 . Prueba de Catalasa	46
3.7 . Recuento de Colonias	46
3.7.1. Método de la placa de petri vertida	46
3.7.2. Preparación de diluciones	46
3.8 . Metodología estadística	47
3.8.1 . Factores de estudio	47
3.8.2 . Tratamientos y descripción	47
3.8.3 . Análisis de la información	47
3.8.3.1 . Correlación de variables	47
3.8.3.2 . Significancia del coeficiente de correlación	48
3.8.3.3 . Análisis de regresión	48
3.8.4 . Toma de datos	49
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1. Resultados y discusión de las pruebas de potenciometría directa y bacteriológica, en muestras de leches sanas	49
4.2 . Resultados y discusión de las pruebas de potenciometria directa en leches en proceso de transición	53
4.3 . Resultados y discusión de las pruebas de cloruro por potenciometría directa y bacteriológica en muestra de leche enferma	57
5. CONCLUSIONES	62
6 . RECOMENDACIONES	63
7 . BIBLIOGRAFIA	64
8 . ANEXOS	69

INDICE DE TABLA.

	# Pág.
1. Composición de un litro de leche.....	4
2. Interpretación de la prueba California.....	21
3. Correlación en la concentración de cloruros y el numero de colonias de bacterias en leches sanas	51
4. Correlación en la concentración de cloruros y el numero de colonias de bacterias en leches en periodos de transición	55
5. Correlación en la concentración de cloruro y el numero de colonias en leches enfermas	59
A-13. Grado de representatividad de la media aritmética para distinto coeficiente de variabilidad	84
A-14. Concentración de iones - cloruro por hacienda	85
A-15. Análisis de regresión dispuesto en forma de análisis de varianza.....	88
A-16. Analisis de regresión para leche san dispuestos en forma de análisis de varianza.....	89
A-17 ANVA de regresión para leches en transición	90
A-18 ANVA de regresión para leches enfermas	91

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Estructura de la ubre	7
Fig. 2. Factores que producen mastitis	9
Fig. 3. Manifestaciones y diagnósticos de mastitis	16
Fig. 4. Circuito de medición potenciométrico	27
Fig. 5. Esquema de un electrodo ion - selectivo a los iones cloruro	31
Fig. 6. Correlación entre la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas en leches sanas	52
Fig. 7. Correlación en la concentración de cloruro y el número de colonias bacterianas en leches en período de transición	56
Fig. 8. Agentes causales que se presentaron con mayor frecuencia en los cultivos bacteriológicos	57
Fig. 9. Gráficas de correlación de concentración de cloruros y número de colonias bacterianas en leches enfermos	

1. INTRODUCCION.

Dada la importancia que la leche tiene en la alimentación humana, se exige que la calidad de ésta se inicie desde su producción, uno de los factores que ha limitado en gran medida este objetivo ha sido la presencia de mastitis en las explotaciones lecheras .

La mastitis es la enfermedad más común y costosa que padece el ganado lechero en el mundo entero. Existe donde quiera que hayan vacas, ya que sin duda alguna no hay un solo rebaño de ganado lechero en cualquier parte, sin importar su tamaño, que esté absolutamente libre de este mal. (30).

El diagnóstico precoz de la mastitis, da como resultado efectuar el tratamiento oportuno para evitar que la enfermedad progrese y se haga incontrolable. En esta investigación se determinó la concentración de cloruros en leches crudas por potenciometría directa, técnica electroanalítica que permite determinar la presencia de mastitis en su estado de inicio o latencia.

El método potenciométrico , permite superar las dificultades que presentan las técnicas tradicionales de determinación de mastitis, dado el alto grado de especificidad que posee el electrodo selectivo para cloruros, lo que permite efectuar determinaciones muy exactas y precisas en el circuito de medición potenciométrica empleado para este trabajo de investigación.

El presente estudio se realizó en 6 haciendas lecheras del departamento de San Miguel, lugar en el cual no se han efectuado investigaciones de este tipo.

Para el análisis estadístico se efectuó una prueba de correlación para observar la relación que existe entre las variables (concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas) y para verificar el grado de dependencia entre las variables se hizo un análisis de varianza de regresión.

Se espera que el método de Potenciometría Directa sirva como una alternativa para determinar mastitis en el ganado lechero de una forma exacta y eficiente que contribuya de esta forma a mejorar la calidad de la leche.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 La Leche.

La leche se define como la secreción láctea obtenida por el ordeño completo de una o más vacas sanas, que contengan no menos del 3% de grasa y no menos del 8.5% de sólidos no grasos y que esté libre de calostro.

Es un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de un cría, es de color blanco opaco amarillento, sabor dulce, reacción iónica de pH 6.5 a 6.7 y de composición química compleja. (1,2).

2.1.1 Formación de la leche.

La vaca lechera convierte el alimento en leche, las materias alimenticias digeridas son transportados a la ubre o a las glándulas mamarias por medio de la corriente sanguínea. La ubre contiene alvéolos en donde el alimento se convierte en leche, y queda almacenada en ellos y en las cisternas de la ubre hasta que es extraída mediante el proceso de ordeño o por la amamantación de los terneros; la secreción de la leche en la ubre es mucho mayor inmediatamente después del ordeño. A medida que aumenta la presión en los alvéolos, la secreción disminuye o se detiene.

A las vacas de alta producción se les puede hacer que produzcan más si se ordeñan tres o cuatro veces al día, ya que con los frecuentes ordeños se mantiene baja la presión.(18).

2.1.2 Composición de la leche.

La leche es una mezcla compleja de sustancias alimenticias, la composición de éstas en un litro de leche es como sigue: (2)

TABLA #1 COMPOSICIÓN DE UN LITRO DE LECHE

<u>GRASA</u>	<u>HIDRATOS DE CARBONO</u>	<u>PROTEINAS</u>	<u>PIGMENTOS</u>	<u>ENZIMAS</u>
(40.0 gramos)	(49.0 grs)	(35.0 grs)		
Grasa 39.50 grs	∞ Lactosa	Caseina 28.0 grs.	Riboflavina	Amilasa
Fosfolípidos 0.35 grs	∞ Glucosa β galactosa	Lactoálbamina 5.0 grs	∞ Carotenos	Catalasa
Lecitina	β - lactosa	Lactoglobulina	β Carotenos	Esterasas
Cefalina	β - Glucosa	Pseudoglobulina	Xantofilas	Lactasa
Esfingomelina	β - Galactosa	Euglobulina		Peroxidasa
Colesterol 0.15 grs		Proteína soluble en alcohol 2.0 gr.		Fosfatasa
		Flavoproteinas		Proteasas
		Aglutininas		Reductasa
		Proteína de la membrana del glóbulo graso.		(Xantinadehidrogenasa)

VITAMINAS

<u>Liposolubles</u>	<u>Hidrosolubles</u>
Vitamina A 1.670 U.I	Inositol 95.00 mg.
Tocoferoles (E) 832 mg.	Ac. Ascorbico 20.50 mg
Vitamina D 24 U.I.	Ac. Panto - 3.40 mg
Vitamina K ?	tenico
Acidos grasos esenciales	Riboflavina 1.80 mg
Linoléico	Niacina 1.40 mg
Linoléico	Piridosina 0.93 mg
Araquidónico	Tiamina 0.40 mg
	Ac. Fólico 0.14 mg
	Brotina 0.03 mg
	Ac. Para - amino - benzoico ?
	Colina ?
	Factores ?

SALES

<u>Básicas</u>	<u>Acidas</u>
Potasio 1.480 mg.	Ac. Citrico 1.800
Calcio 1.160 mg	mg.
Sodio 410 mg	Fósforo 1.800
Magnesia 110 mg	Cloro 1.020
Zinc 330 mg	Azufre 102
Hierro 0.30 mg	Silice 1.9
Moliboleno 0.04 mg	Yodo 0.2
Cobre 0.15 mg	Fluor 013
Manganeso 0.03 mg	
Litio	
Estroncio	
Aluminio	
Boro	
Titanio	
Vanadio	
Rubidio	

AGUA

(869 grs.)

Trazas

La leche es un alimento completo, proporciona proteínas que reemplazan y reparan los tejidos del cuerpo, contiene minerales fundamentales para la formación de huesos, dientes y el desempeño de otras funciones; constituye una excelente fuente de azúcar natural, vitaminas y grasas. (10,31)

2.1.3 Factores que intervienen en la producción y la composición de la leche.

La cantidad y composición de la leche que produce una vaca presenta variaciones importantes que se deben a los siguientes factores:

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, individualidad de la vaca, etc. (1).

Estas variaciones son debido a algunos de estos 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 cambia 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 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, debido a que la fermentación en el rumen es defectuosa y disminuye la producción de ácido acético y otros ácidos volátiles principales formadores de ácidos grasos; 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.

Lactancia: Cuando la vaca pare, la primera leche que secreta es llamada calostro, esta difiere de la leche normal en que es más espesa y amarilla, químicamente contiene más albúmina, caseína, globulina, cloruros y otros minerales; además menos lactosa que la leche normal.

Los cambios de calostro en la 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).

2.1.4. Influencia de factores que varían el contenido de minerales en la leche.

Los principales constituyentes minerales en la leche son:

calcio, magnesio, potasio, sodio, fósforo, cloro, azufre, hierro, yodo.

El contenido de minerales varía poco según la raza y la alimentación del animal durante la lactación. En general puede decirse que los factores ambientales no influyen de manera significativa en el contenido mineral de la leche. Sin embargo existen otros factores que afecta el contenido de minerales en la leche, lo mismo que 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.

2.2 ESTRUCTURA DE LA UBRE

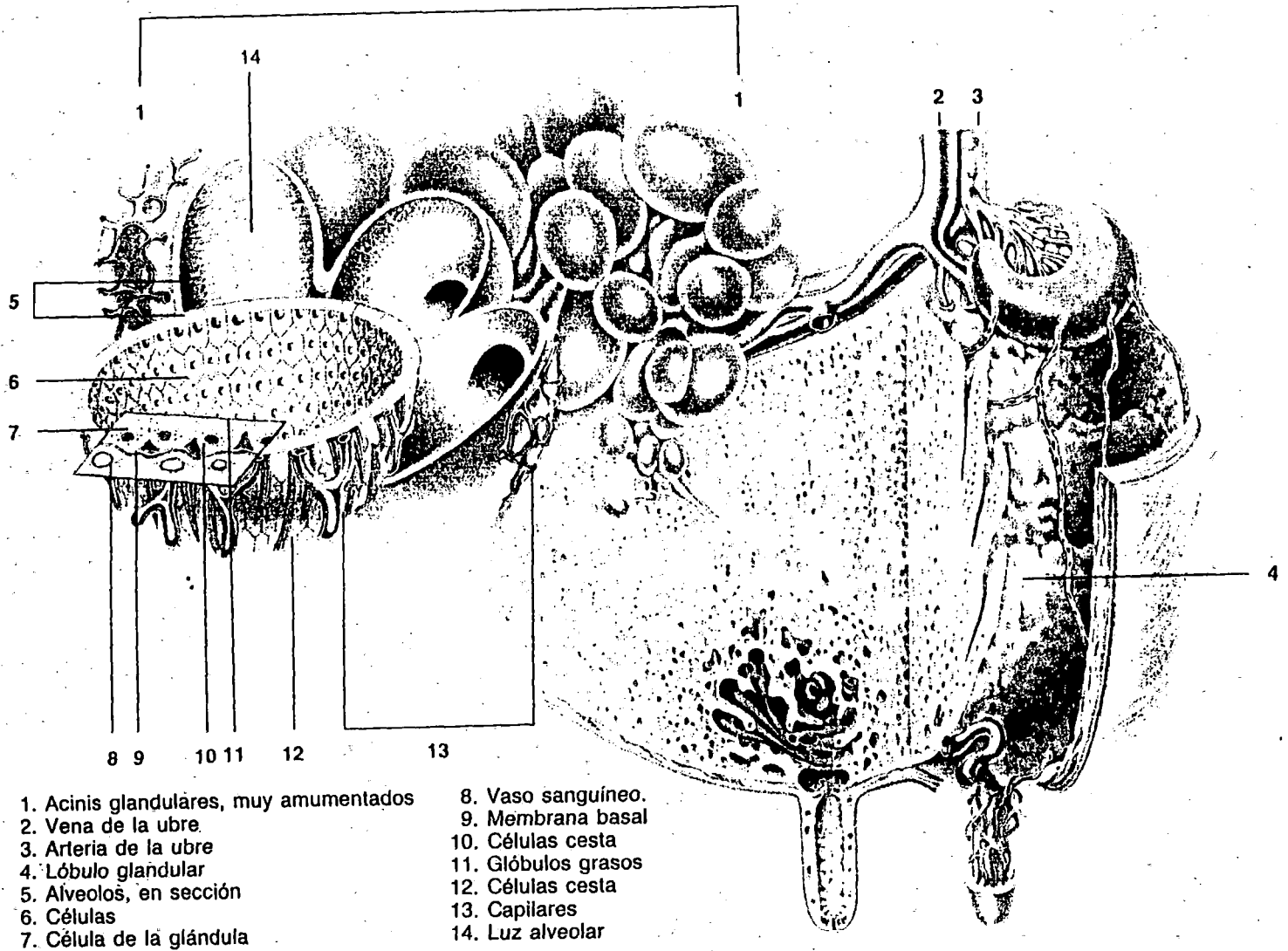


Fig. 1. Estructura de la Ubre:

Fuente : Deneke , 1989

2.2.1 Glándula mamaria.

La glándula mamaria y las células que la constituyen representan un órgano bajo un complejo control endocrinológico que va desde los estados tempranos de desarrollo a la preñez y lactación en un ciclo regresivo.

La leche se mantiene en la ubre, las bacterias se mantienen en el exterior de la ubre; esto debido a la constricción del canal del pezón.

La cisterna de la teta se separa de la cisterna de la glándula, la cual es capaz de contener más de 400 ml. de leche y actúa como un área colectora de los ductos mamarios.

Ramificaciones de la cisterna de la glándula forman un sistema extensamente ramificado, estos conductos ramificados van de 8-50 en números. El alvéolo (la unidad funcional) descarga su secreción en estos ductos. (18)

El alvéolo es la unidad básica productora de leche en la ubre, el cual es pequeño y semejante a un bulbo con un centro hueco; se estima que cada pulgada cuadrada de tejido de la ubre contiene un millón de estos alvéolos.

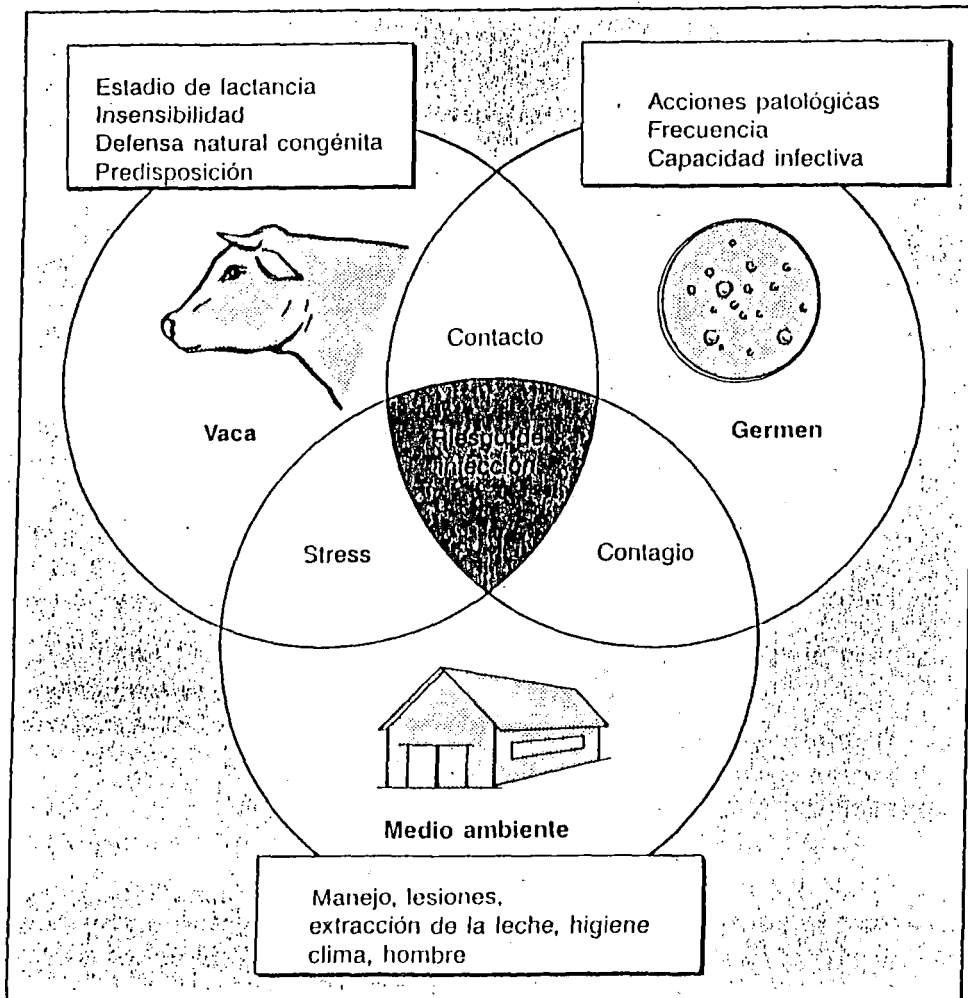
Los alvéolos están formados por una sola capa de células epiteliales, que son responsables de secretar la leche.

La función de los alvéolos es triple:

- 1- Remover nutrientes de la sangre.
- 2- Transformar estos nutrientes en leche.
- 3- Descargar la leche en el lumen.

La secreción de la leche está regulada de manera primordial por mecanismos hormonales. Sin embargo, la excreción de la leche se inicia a través de mecanismos nerviosos. (23)

2.3 Mastitis o mamitis en ganado bovino.



La mastitis es una enfermedad producida por factores diversos: animal, medio ambiente y germen causal influyen en el riesgo de infección. Cuando las influencias del medio ambiente sobrepasan la capacidad de defensa del animal es posible la aparición de una mastitis.

Fig. 2 Factores que producen mastitis

Fuente : Deneke, 1989

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria (inflamación de la ubre). La enfermedad puede aparecer como mastitis subclínica, es decir sin síntomas apreciables, o bien como mastitis clínica con signos evidentes de la enfermedad (tumefacción o endurecimiento del sector mamario correspondiente, alteraciones de la leche, etc.) (16).

La mastitis es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria. El término se deriva de las palabras griegas mastos, que significa "pechos" e itis que quiere decir "inflamación de". La inflamación es la respuesta de los tejidos productores de leche en la ubre a una lesión traumática o a la presencia de microorganismos infecciosos que han ingresado a la ubre. En la gran mayoría de los casos la enfermedad es causada por los microorganismos.

El propósito de la inflamación es doble:

- 1) Eliminar o neutralizar microorganismos invasores.
- 2) Ayudar a reparar los tejidos lesionados, para así regresar la glándula a su normal funcionamiento. (30)

La mastitis tiene un efecto directo tanto sobre la composición de la leche como sobre su cantidad. Aumenta el contenido de cloruros, es frecuente que baje la riqueza en azúcar, se modifican las características de las proteínas y aumenta de manera significativa el contenido de células de los tejidos del cuerpo; como resultado disminuye el pH de la leche. (14)

Las leches mastíticas provocan pérdidas económicas (por la baja productividad) e inclusive causan la seca, cambios en la composición de la leche (ya que aumentan el contenido de cloruros, de proteínas del lactosuero, etc.) y además son leches difíciles de coagular y desuerar. (33)

2.3.1 Gérmenes causantes de mastitis.

Son muy diversos los gérmenes que pueden afectar la mama y provocar mastitis. La causa inmediata de la formación de una mastitis es la infección de la ubre por gérmenes patógenos específicos. Es riesgo de infección se acrecienta con la intensa proliferación del germen y su gran capacidad del contagio.

Los gérmenes más importantes de la inflamación de la ubre son los estreptococos, los estafilococos, los coliformes, corynebacterium pyogenes, las pseudomonas y levaduras.

Gérmenes menos frecuentes son los micoplasmas, clostridios, klebsiellas, aerobacter, bacilo céreo, nocardias, hongos, etc. Estos gérmenes ocasionan grandes dificultades en el tratamiento.

2.3.1.1 Estreptococos.

Son los gérmenes más frecuentes de todos los que causan la mastitis. Entre ellos están los siguientes:

Estreptococo agaláctico.

Estos estreptococos constituyen los gérmenes propios de la ubre, ya que sus posibilidades de multiplicación y supervivencia son escasas fuera de la ubre de la vaca. La glándula mamaria infectada es por tanto el reservorio principal de este germen. La propagación se produce por las manos del ordeñador, los trapos con que se limpian las ubres o la máquina de ordeño.

La infección de los animales sanos con este tipo de estreptococos suele producirse tras la compra de animales enfermos.

Estreptococo disgaláctico.

Este germen tan frecuente no coloniza de manera clara en la ubre. Suele hallarse en la boca, en otros órganos del animal y en las lesiones de la piel (lesiones del pezón). Son la causa de la denominada mastitis por succión.

Estreptococo de la ubre (st. uberis).

Se trata de un germen ocasional que se encuentra en todo el territorio que rodea al animal. La infección con este germen es más benigna que la de otros estreptococos, siendo particularmente frecuente en el período seco.

2.3.1.2. Estafilococos.

Los estafilococos se hallan también en las proximidades del animal y en la piel del mismo; no obstante, se concentran principalmente en la glándula mamaria infectada. Después de los

estreptococos, son los gérmenes más frecuentes de las mastitis. Los transmisores habituales son los utensilios del ordeñador, los trapos y las manos del ordeñador.

Contrario a los estreptococos de la mastitis que se multiplican en la superficie de la mucosa de los canales lactóforos, los estafilococos poseen la capacidad de penetrar en los tejidos profundos y de encapsularse en ellos. Por esta razón, el tratamiento con medicamento, es más complicado en las mastitis causadas por estos gérmenes. (16)

2.3.1.3. Gérmenes coliformes.

Los gérmenes coliformes pueden estar presentes en cualquiera de las partes que rodean al animal. Se hallan tanto en el mismo animal (por ejemplo, intestino) como en sus alrededores. Una recogida poco higiénica de la leche suele ir acompañada de una intensa presencia de colibacilos.

Las mastitis por coli son muy frecuentes después del parto y también durante la lactación. No obstante, suelen aparecer como infecciones aisladas, por lo que deben ser tratadas inmediatamente. (16,32)

2.3.1.4. *Corynebacterium Pyogenes.*

La bacteria piógena es un típico germen purulento con efecto patógeno preferente sobre tejido dañado con anterioridad. Así, no es raro que las heridas infectadas de la teta conduzcan a mastitis piógenas. La fuente más peligrosa de infección para los animales sanos es el animal infectado. Los insectos pueden transmitir también esta infección.

La enfermedad se presenta con mayor frecuencia en los meses de verano, en las zonas de pasto. De manera general, se ven afectadas vacas jóvenes y vacas en fase seca.

2.3.1.5. *Pseudomonas aeruginosa*.

El germen se halla en el suelo y en el agua, se multiplica donde existe suficiente humedad. Las fuentes más frecuentes de infección son el agua contaminada, los utensilios sucios y la falta de higiene en el ordeño.

2.3.1.6. *Levaduras*.

Entre las levaduras, las más frecuentes en las mastitis son del género *Candida*. Casi siempre las infecciones aparecen tras tratamiento con antibióticos. Las fuentes de infección son los trapos que están en contacto con las ubres, la paja, el polvo del establo, la alimentación y los utensilios de ordeño.

El tipo de germen causal en cada caso específico sólo puede constatarse mediante estudio bacteriológico de una muestra de leche.

Esta determinación es muy importante:

- Para el tratamiento, ya que los gérmenes poseen sensibilidad variable frente a los medicamentos, y
- Para la defensa concreta frente a la infección. (16).

2.3.2 *Manifestaciones de la mastitis*.

La mastitis puede manifestarse clínicamente en formas diversas, desde una mastitis muy severa con síntomas de afección sistemática generalizada y que puede conducir a la muerte, hasta una mastitis no detectable por simple inspección y examen físico del animal.

Entre estos extremos se presentan casos intermedios de mastitis, que pueden variar en sintomatología según su severidad, así:

2.3.2.1. Infección.

Una infección ocurre cuando los microorganismos penetran el canal del pezón y se multiplican dentro de la glándula mamaria.

La presencia o ausencia de infección se determina cuando se recolectan muestras asépticas de leche de cada cuarto y efectúan los cultivos en el laboratorio.

Las infecciones pueden ser clínicas o subclínicas, esto depende del grado de inflamación.

2.3.2.2. Mastitis Clínica.

La mastitis clínica se caracteriza por sus anormalidades visibles en la ubre o en la leche. Estas varían en su severidad durante el curso de la enfermedad. Los casos clínicos se pueden definir como sub-agudos (medianamente clínicos) cuando los síntomas incluyen sólo alteraciones menores en la leche y en los cuartos afectados, como granos, escamas o secreciones descoloradas. El cuarto puede estar también un poco hinchado y sensible.

2.3.2.3. Mastitis Aguda.

Los casos de mastitis aguda se caracterizan por su ataque repentino, enrojecimiento, hinchazón, dolor, endurecimiento, leche anormal y reducción en la producción. También pueden estar presentes otros síntomas sistemáticos, tales como fiebre y falta de apetito.

2.3.2.4. Mastitis Super-Aguda.

Los casos de mastitis super-aguda son poco comunes e incluye los síntomas mencionados en la mastitis aguda, pero también incluyen depresión, pulso y respiración agitada, pérdida de coordinación muscular, extremidades frías, falta de reflejo en la pupilas, deshidratación y diarrea.

2.3.2.5. Mastitis Subclínica.

La mastitis subclínica es mucho más sutil y no puede detectarse por observación visual, sin embargo se puede identificar cuando se efectúan pruebas que detecten la presencia de microorganismos infecciosos o de resultados de inflamación, tales como células somáticas.

Algunas personas no alcanzan a apreciar la persistencia e importancia económica de la mastitis subclínica, porque la leche mantiene su apariencia normal.

- ◆ Esta clase de enfermedad es importante por las siguientes razones:
- ◆ Es de 15 a 40 veces más frecuente que la manifestación clínica.
- ◆ Usualmente precede a la clínica.
- ◆ Es de larga duración.
- ◆ Es difícil de detectar.
- ◆ Reduce la producción de leche.
- ◆ Afecta la calidad de la leche.

Esta forma subclínica es también muy importante porque constituye una reserva de microorganismos que transmiten la enfermedad a otros animales en el hato.

2.3.2.6. Mastitis Crónica.

La forma crónica puede comenzar en cualesquiera de las formas clínicas o también como mastitis subclínica y puede ser detectada con signos intermitentes de mastitis clínica. Tiene un desarrollo progresivo de tejido cicatrizante y un cambio en el tamaño y forma de la glándula afectada acompañado de pérdidas o reducción en la producción de leche. El tiempo entre los episodios de mastitis clínica y subclínica puede variar de manera amplia, dependiendo de los microorganismos infecciosos, de la tensión del animal y otros factores. (30).

En la figura 3 se demuestra de forma gráfica la evolución de los síntomas en relación con el tipo clínico de mastitis.

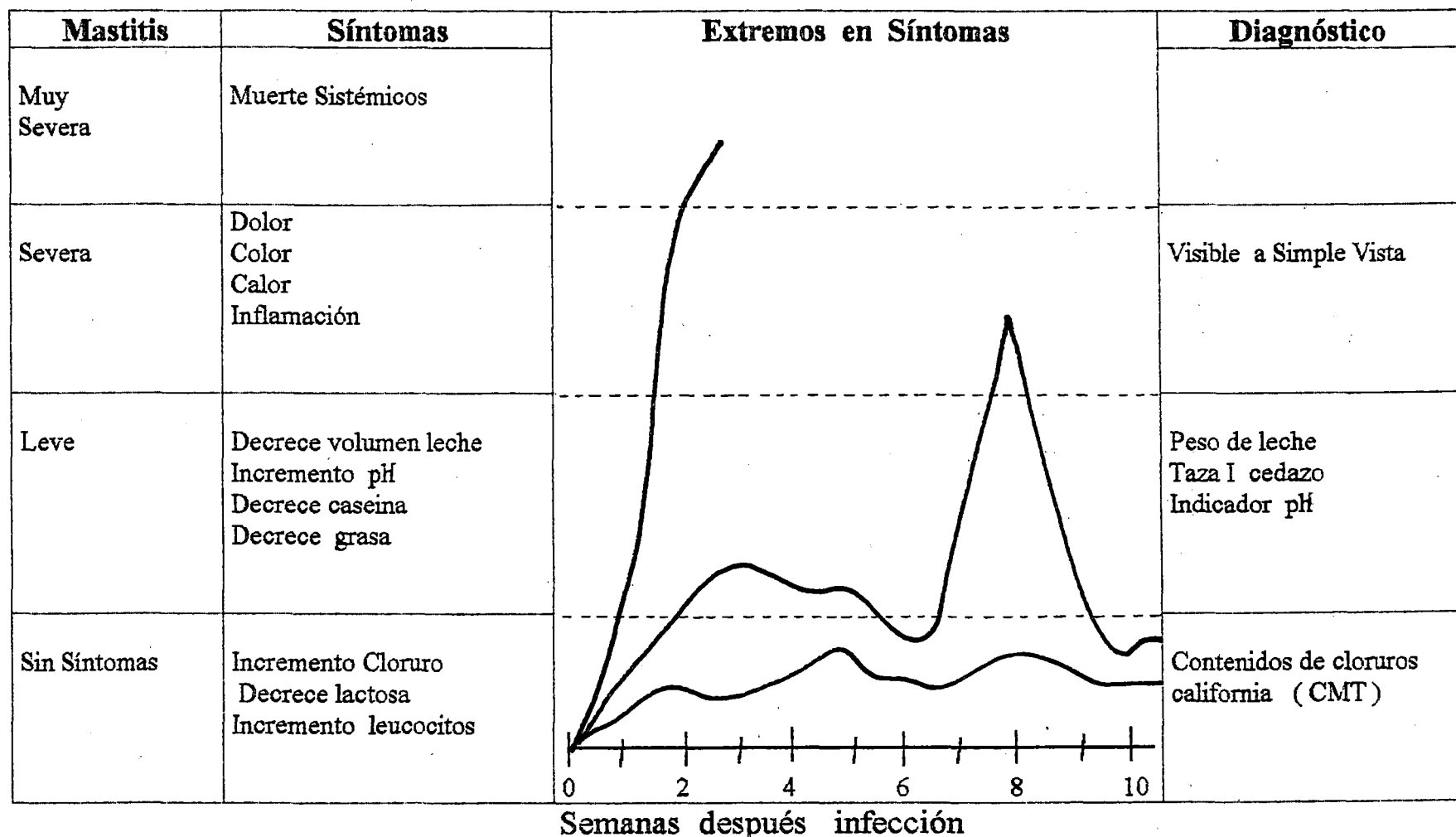


Figura 3 : Manifestaciones y diagnóstico de Mastitis Fuente: Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza , CATIE

2.3.3 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 pueden existir infecciones sub-agudas por un corto lapso de tiempo.

Las glándulas mamarias en general pueden presentar inflamación serosa y supurativa, granulomatosa, proliferativa y necrosante.

De acuerdo con la inflamación en estas glándulas ocurren algunos tipos de mastitis como son:

2.3.3.1. Mastitis serosas.

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

2.3.3.2. Mastitis Supurativas.

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

2.3.3.3. 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.

2.3.3.4. Mastitis Granulomatosa.

Se da en vacas por infecciones con Nocardia asteroides, Cryptococcus neoformans, Cándida albicans, Trichosporum sp. y microbacterias diversas . (3,6,27)

2.3.4 Factores que predisponen la mastitis.

Existe una serie de factores que predisponen, y que no raras veces son ellos mismos causantes.

Entre ellos están:

2.3.4.1. Higiene deficiente en establos: plazas de estabulación muy cortas o angostas, cama húmeda, tosca, escasa, y enmohecida, corrientes de aire, variaciones de temperatura diurna y nocturna, abrevaderos y corrales fangosos.

2.3.4.2. Formas inconvenientes de las mamas; pezones y conducto de los mismos, 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 redondas.

2.3.4.3. Extasis láctea y ordeño defectuoso: 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.

2.3.4.4. Receptividad aumentada: la aparición de la mastitis puede ser favorecida por edad, fase de lactación, factores hereditarios, influencias hormonales, factores alimenticios y padecimientos generales. (11).

La limitación de los alimentos para reducir la producción en vacas con mastitis es mala práctica desde el punto de vista económico. Debe eliminarse la infección y seguir haciendo uso de prácticas normales de alimentación. (14).

En el tratamiento de la mastitis, se logran mejores resultados cuando ésta es detectada en sus inicios. (16).

2.4 Pruebas para la detección de mastitis.

2.4.1. Prueba California (C.M.T.)

La prueba California (C.M.T.) se basa en la determinación indirecta de la concentración de leucocitos presentes en la leche, así como la acidez o alcalinidad de la misma. (6)

La prueba de California puede ser empleada con la leche incipiente u ordeñadas de glándulas por separado; pero se aplica también en leches ya mezcladas para la selección rápida en hatos lecheros en los que se aprecian elevados grados de irritaciones de la ubre. (13)

Para resultados confiables, las pruebas deben realizarse justo antes del ordeño, después de estimular la vaca en la descarga de los primeros chorros de leche.

La prueba CMT no señala las vacas a tratarse, porque sólo un 60% de vacas con un conteo somático de más de 500,000 células somáticas por mililitro, son las que están infectadas por los microorganismos causados por la mastitis.(24, 30).

La leche con alto contenido de leucocitos y células somáticas mezcladas con un producto que contenga una superficie anódica tal como la del alquil sulfonato (un detergente), forma un gel como consecuencia de la reacción entre el producto químico y el ácido desoxirribonucleico (DNA) contenido en los leucocitos. El gel puede ser observado de forma directa, la rapidez con que se forma y la firmeza que adquiere indica la cantidad de leucocitos en la leche. (27).

La prueba california (C.M.T) son necesarios la paleta con cuatro compartimientos y el reactivo, que están disponibles en los almacenes de productos agropecuarios. La prueba colifornia debe hacerse en todas las vacas en producción una vez al mes (13).

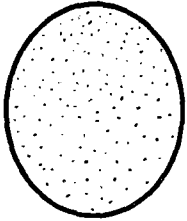



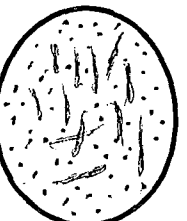
Para la interpretación de los resultados al utilizar la prueba california, se tiene que leche positiva a mastitis forma un gel denso, fácil de observar, que tiende a quedarse en el centro del compartimiento.

La 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, ésta permanece líquida. (Ver tabla N°2). (5,6)

Los resultados en la prueba de california están estrechamente relacionados con los resultados de la prueba de recuento de leucocitos que se le efectúa a la leche en el laboratorio, para detectar mastitis. (27).

TABLA N° 2

2.4.1.1 INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA CALIFORNIA

LECTURA	INTERPRETACIÓN	CÉLULAS SOMÁTICAS /ml	POLIMORFOS NUCLEARES	TIPO DE REACCIÓN
Negativo	La mezcla permanece sin alteración alguna	0 a 200,000	0-25%	
Trazas	Formación de un ligero precipitado al movimiento de atrás para delante de la paleta. Si es continuo los movimientos tienden a desaparecer.	150,000 a 500,000	30-40%	
+	Precipitado firme sin tendencia a formar GEL. A veces es reversible si se continua los movimientos	400,000 a 1500,000	40-60%	
++	Mezcla gruesa con formación de GEL, todo tiende a irse a la periferia y se ve al fondo de la paleta, al parar los movimientos se nivela y cubre el fondo	800,000 a 5,000,000	60-70%	
+++	El GEL hace una superficie convexa. A veces hay una formación central que permanece al cesar los movimientos. Aumento de viscosidad y la mezcla se adhiere al fondo	5,000,000 a más	70-80%	

(5,6)

2.4.2. Prueba Bacteriológica.

Estas pruebas se realizan en el laboratorio y se usan diferentes medios de cultivos, los que más se utilizan para el aislamiento del agente etiológico son: los medios de agar sangre, agar Mack Conkey, agar Chapmanstone, medio 110 etc. (6).

Aunque la prueba anterior (C.M.T) es de valor relativo en el diagnóstico de las mastitis agudas y sub-agudas, muchos casos 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 la leche procedentes de una ubre revelaron varias colonias similares en las placas de agar. Para aislamiento de bacterias de las muestras de leche se recomienda medios nutritivos selectivos (17).

Los organismos aerobio, saprófitos o patógenos, se multiplicarán para formar colonias, cuando están presentes en la muestra. Los estreptococos de la mastitis aparecen como pequeñas colonias con varios grados de hemólisis clasificados en Beta, Alfa y Gamma(ésta última sin hemólisis). Como los estreptococos 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.(13).

Las ventajas que presenta la identificación bacteriana son:

- * Es la forma más conveniente del diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas.
- * Mediante este procedimiento se determina el género y la especie bacteriana causante del problema.

Entre las desventajas que presenta la identificación bacteriana están:

- * Requiere de tiempo, equipo, conocimiento y experiencia.

- * El personal de laboratorio que realiza la identificación debe tener un amplio conocimiento de los métodos y técnicas utilizadas para cada género en particular.
- * Puede resultar peligroso para el personal inexperto en el área de diagnóstico microbiológico. (20)

2.5. Determinación de cloruros.

Es una prueba importante para el diagnóstico precoz de la mastitis. La variación y su aumento, revela con bastante fidelidad toda alteración fisiológica de la actividad funcional de la glándula mamaria.

La leche normal contiene de 0.07 a 0.11 gr. de cloruro por 100 c.c. de leche; cantidades de cloruro de 0.14 gr en adelante constituyen leches anormales. El aumento de ésta proporción depende de la exudación del suero, de la linfa y de la sangre, consecutiva a la inflamación mamaria determinada por el agente etiológico de la mastitis.

El aumento del cloruro es lo que determina el sabor salado de las leches procedentes de vacas mastíticas; por medio del gusto salado de la leche de diversos cuartos mamarios se puede basar cuando se tiene práctica, un diagnóstico bastante certero de la mastitis.

Como consecuencia del trastorno funcional de la glándula mamaria a medida que aumenta el cloro, hay una reducción de la lactosa.

Esta reducción de la cantidad de lactosa proporcional al aumento del cloruro, indujo a establecer el denominado índice de Koester, o sea :

$$\frac{\text{Proporción de cloruro} \times 100}{\text{Proporción lactosa}} = \text{Índice de lactosa a cloruro}$$

El aumento de los cloruros suele ser proporcional al aumento de los leucocitos y, por ende al valor de la catalasa.

Dada la particularidad de las reacciones orgánicas naturales defensivas, el aumento de los leucocitos y fagocitos puede sobrevenir en presencia de los estreptococos antes de que aumente el cloro, que es la secuela de un trastorno toxinfecioso de la función parenquimatosa.

El aumento exclusivo de los leucocitos sin aumento simultáneo del cloruro o del pH, podría revelar una buena reacción defensiva ante la invasión estreptocócica, sin haberse alcanzado la perturbación funcional parenquimatosa.

Tanto el aumento del cloruro como el aumento del pH o la disminución de la lactosa, hasta cierto grado, miden la extensión o la intensidad de la lesión mamaria.

La determinación del cloruro tiene la importante ventaja de que puede realizarse con todo tipo de leches, incluso en la recogida varios días antes y sin tener en cuenta los cuidados precedentes o simultáneos a la toma de las muestras analizadas. A veces es el único método de diagnóstico de laboratorio que permite formar juicio sobre la muestra de leche problema transportada desde mucha distancia y que llegó alterada al laboratorio. En este caso, para basar el diagnóstico no hay necesidad de que la muestra haya sido mezclada con conservadores que contengan cloro, por ejemplo y cloruro de mercurio u otros compuestos clorados. No hay que olvidar que la leche calostrala, la segregada en los últimos períodos de la lactación, cuando empieza a agotarse la producción lechera, contiene algo más de cloruro que la leche normal. (20)

2.6. Consideraciones Teóricas Sobre Potenciometría.

2.6.1. Potenciometría Química.

La corriente eléctrica puede ser transportada a través de fases sólidas metálicas (conducción metálica), o bien de fases líquidas que sean electrolitos puros o soluciones que los contengan (conducción iónica); en este último caso, la corriente puede introducirse o retirarse por medio de electrodos que son conductores metálicos o de carbono en cuya superficie se produce un movimiento de cargas dando lugar a reacciones de oxidación o de reducción.

La electroquímica trata sobre los cambios químicos en los que se involucra la corriente eléctrica; para efectos de análisis químico, se toman en cuenta la corriente, la resistencia, la conductancia, el voltaje y el tiempo; así, la potenciometría implica la determinación de la fuerza electromotriz (fem) en una celda eléctrica, esto es, la diferencia de potencial entre dos electrodos inmersos en un electrolito y su relación con la actividad de un analito iónico.

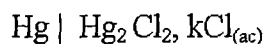
Los métodos potenciométricos comprenden dos tipos de análisis:

El primero consiste en la medición directa del potencial de un electrodo indicador respecto a un electrodo de referencia para obtener la actividad o concentración de un ión en particular.

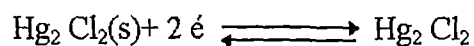
El segundo implica la medición de los cambios en la fem en la celda debidos a la adición de un titulante (titulación potenciométrica) para localizar el punto de equivalencia.

El equipo básico para las medidas potenciométricas comprende un electrodo de referencia, un electrodo indicador y un aparato que permita medir la diferencia de potencial entre ambos electrodos (potenciómetro).

Existen varios tipos de electrodos de referencia, el patrón es el electrodo estándar de hidrógeno respecto al cual se comparan los demás; entre los electrodos de referencia destacan el electrodo de calomel como uno de los más utilizados; se representa como sigue:



en donde la línea vertical significa la interfase donde se produce transferencia de cargas según la siguiente reacción:



El potencial varía con la concentración de cloruro, por ello, existen varios tipos de electrodos de calomel: saturado, normal y décimonormal con respecto a la concentración de la solución de cloruro de potasio, se observa que el potencial máximo se alcanza con el calomel 0.1 N disminuyendo con el aumento de la concentración.

2.6.1.1. Electrodo Indicadores.

El potencial de media celda de un electrodo indicador varía con la actividad de una especie química en particular. Existen distintas clases de éstos electrodos para las diferentes medidas potenciométricas:

- * Electrodo indicadores para sistemas redox
- * Electrodo de primera clase.
- * Electrodo de segunda clase.
- * Electrodo de tercera clase.
- * Electrodo de membrana. Entre estos se encuentra el electrodo selectivo a los iones fluoruro, cloruro que son de gran importancia agronómica.

2.6.1.2. Instrumentos para medir el potencial.

En general, estos aparatos deben poseer una alta resistencia interna para evitar fluctuaciones en el potencial que se mide y reducir con esto los errores en los resultados. El potenciómetro es el instrumento clásico para las determinaciones potenciométricas, algunos modelos permiten una sensibilidad de ± 0.1 mv. Existen en el comercio otros medidores de lectura directa llamados ionómetros con una escala de medición expresada en términos de concentración y cuya construcción es diferente a la de los potenciómetros.

En resumen un circuito de medición potenciométrica consta de los electrodos indicador y de referencia inmersos en una solución problema y conectados a un voltímetro de alta resistencia interna como se muestra en la fig. 4

2.6.1.3 Ecuación de Nernst.

En la sección precedente se hizo alusión al electrodo normal de hidrógeno como patrón arbitrario. Por convenio, el potencial de éste electrodo es de 0.000..... voltios y se representa por E° cuyo superíndice denota condiciones de estado normales o estándar termodinámicas.

Cuando se construye una celda con un electrodo normal de hidrógeno con otra semicelda cuyas condiciones de estado difieren infinitesimalmente de las condiciones estándar, se desarrolla un potencial E producto de la desviación del potencial del electrodo de la semicelda en cuestión con respecto a E° debido a que las condiciones no son las normales.

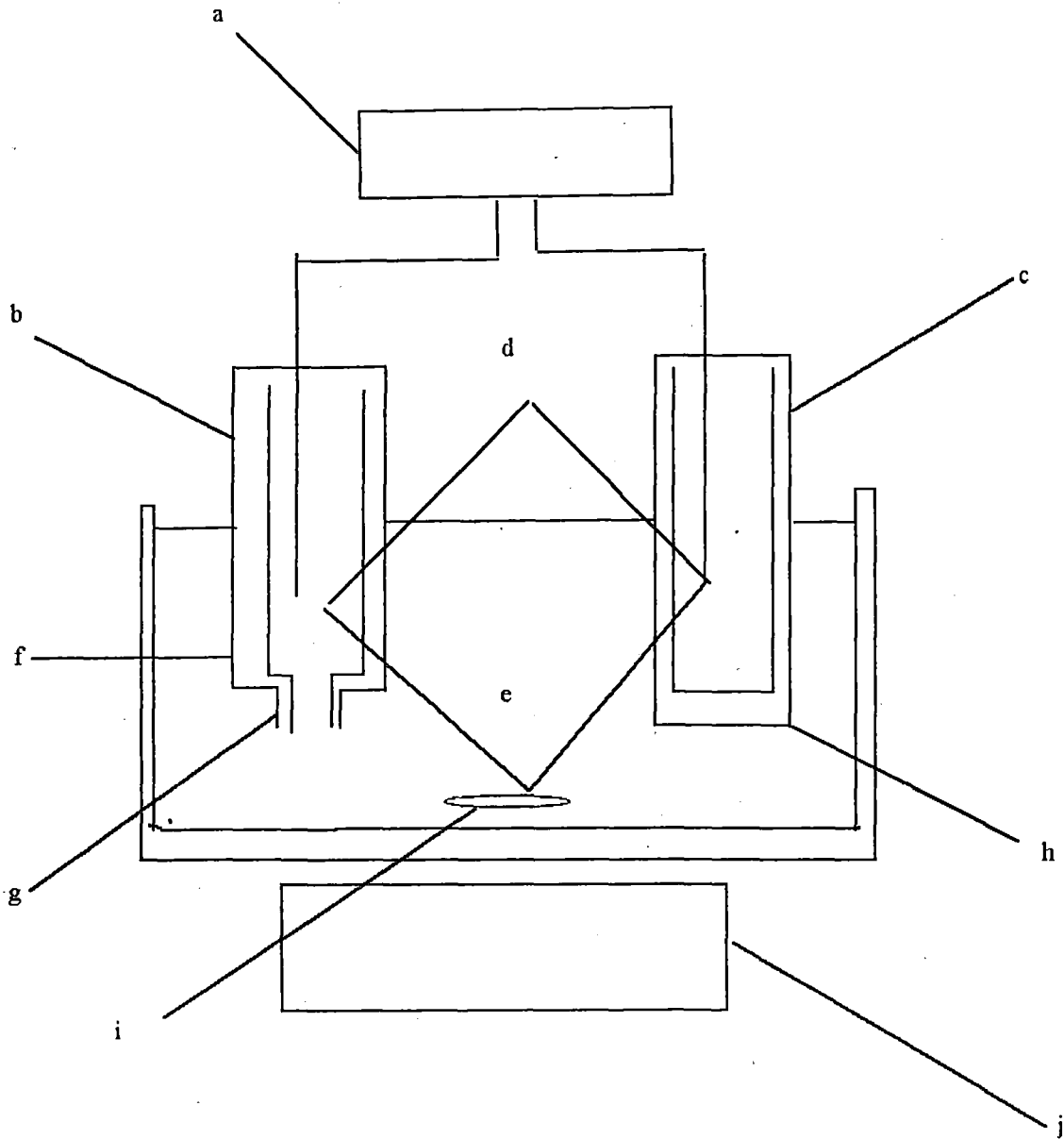


Figura 4 Circuito de medición potenciométrico (19).

- a) Potenciómetro
- b) Electrodo de referencia externo
- c) Electrodo indicador interno
- d) Solución de referencia interna.
- f) Solución problema
- g) Unión Líquida
- h) Membrana sensible.
- I) Barra magnética.
- j) Agitador magnético.

Desde un punto de vista práctico, E es un potencial de electrodo simple que está determinado por la temperatura y las actividades de los electrolitos en las soluciones empleadas. La dependencia de E de estas variables se puede deducir a partir de los principios termodinámicos como se explicara a continuación.

Durante el transcurso de una reacción redox espontanea, ocurre una transferencia de electrones lo que representa una cantidad de electricidad "q" de reactantes a productos, debido a una diferencia en los potenciales de reducción (o de oxidación) de los mismos; como resultado se obtiene un potencial neto de celda E capaz de realizar un trabajo qE.

Si dicho trabajo involucra el paso de un mol de electrones, entonces, por la Ley de Faraday, que es igual a un faradio, F, y si son moles los que participan se tiene que $q = nF$. De todo esto se deduce que: Trabajo eléctrico = nFE. (a)

Toda reacción espontánea implica una disminución de la energía libre durante el proceso, por tanto, el trabajo eléctrico realizado por una celda es igual, bajo ciertas condiciones, a la disminución en el cambio de energía libre, AG entonces:

$$\Delta G = - nFE.$$

(b)

El cambio de energía libre en condiciones estándar (actividades de reactivos y productos iguales a 1) para una reacción de disolución acuosa se representa por ΔG° ; si las condiciones dadas para tal reacción no son estándar, el cambio de energía libre es ΔG , entonces, para la reacción hipotética.



Las magnitudes ΔG° y ΔG están relacionadas mediante :

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{a^c c^d D \dots}{a^a A a^b B \dots} \quad (c)$$

En donde los valores de a del numerador son las actividades de los productos, y los del denominador son las de los reactivos.

Por definición, E° es el valor de E correspondiente a ΔG° , por tanto, sustituyendo en la ecuación (b) se tiene:

$$\Delta G^\circ = - n f E^\circ \quad (d)$$

Por sustitución de las ecuaciones (d) y (b) en (c), resulta:

$$- n f E = - n f E^\circ + RT \ln Q \quad (e)$$

En donde Q representa a la fracción indicada en (c).

Expresando en términos de E se obtiene :

$$E = E^\circ - \frac{RT}{nf} \ln Q \quad (f)$$

Las variables que aparecen en esta expresión tienen los siguientes significados y valores.

E = Potencial del electrodo en condiciones no estándar.

E°= Potencial normal.

R= Constante de los gases, 8.314 julios/ mol K.

T= Temperatura absoluta en grados kelvin, K.

n = Número de electrones transferidos.

f = faradio, 96, 487 julios/voltio mol de electrones.

Q = Cociente de reacción.

ln = Logaritmo natural.

Al sustituir los valores anteriores en la ecuación (f) y utilizar logaritmos base 10, se obtiene, a 25°C :

$$E = E^{\circ} - \frac{0.0592}{n} \log Q \quad (g)$$

Está es una de las formas de ecuación de Nernst que permite calcular los potenciales de electrodos para concentraciones y temperaturas diferentes de los valores standard, pues la expresión que sigue al signo negativo representa la desviación del potencial del electrodo del valor de E°, cuando las condiciones no son las normales.

Para los métodos de análisis potenciométricos, la importancia de la ecuación de Nerst. radica en que de ella deriva la ecuación para la potenciometría directa la cual relaciona el potencial de un electrodo indicador con la actividad de un ion cuya medida interesa.

2.6.1.4. Electrodo Ion - selectivos.

Los electrodos selectivos de iones detectan la actividad ionica de una especie química en particular y se denominan electrodos de estado sólido.

El elemento sensor consiste en un material único, no poroso, de superficie homogénea, de baja microporosidad e insoluble que contiene un compuesto del ión analito; son ejemplos, una membrana policristalina la cual es una mezcla homogénea de sulfuros de cloro, yodo, o bien, un monocristal de fluoruro de lantano o sulfato de plata para electrodos selectivos a los iones Cl^- , I^- , F^- , y Ag^+ respectivamente.

Debido a las escasas propiedades eléctricas de los materiales ión selectivos empleados, se utilizan membranas lo más delgadas posible, lo que depende de la resistencia física del material; así el espesor es de 0.1 mm. para el vidrio y 3 mm. para monocristales y membranas policristalinas.

Los electrodos de estado sólido consisten en una membrana selectiva al analito de interés colocada en un extremo de un tubo de material inerte (p.v.c, teflón etc.) que contiene una solución de electrolitos y un electrodo de referencia interno conectado a un cable conductor, como se muestra en la figura 5.

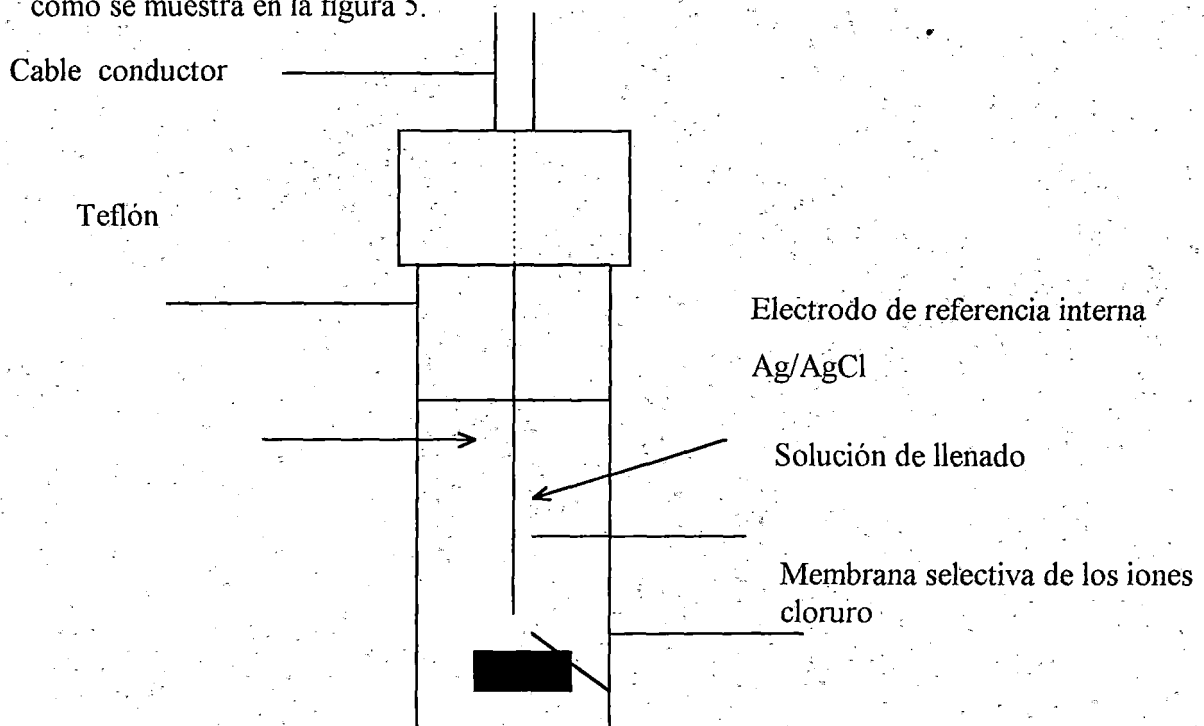


Fig.5 Esquema de un electrodo ión- selectivo a los iones cloruro. (29)

2.6.1.4.1. Teoría de Operación del electrodo de Cl⁻

Está construido de una membrana sólida compactada de Ag Cl/Ag₂S. El electrodo de referencia interior es un alambre de Ag/AgCl y solución saturada de KCl.

El electrodo selectivo a los iones cloruro está construido para medir la concentración de iones cloruro en soluciones acuosas, parcialmente acuosas y soluciones no acuosas, se aplican a muestras de agua, de suelo, fluidos biológicos.

El electrodo necesita de una solución que aumente su fuerza iónica llamada ISA, que está constituida por una solución 1 molar de nitrato de potasio.

DATOS TÉCNICOS:

Es un electrodo selectivo a los iones cloruro del tipo membrana sólida compactada de AgCl/Ag₂S.

El potencial del electrodo en milivoltios, proporcional a la actividad de iones cloruro (a_{Cl^-}) es $< S \times 10^{-6} \text{ milivoltios} / < a > 1 \text{ milivoltios} / < / Cl^-$

El rango operacional de temperatura es de 0-80 °C.

El medio para lectura debe ser : acuoso o parcialmente acuoso

Rango óptimo de pH : 2 a 11.

Iones interferentes : CN⁻, Br⁻, S₂O₃, NH₃, OH⁻

Precisión : En ausencia de iones o sustancias interferentes la precisión está en el orden de $\pm 0.5 \text{ m.v.}$, correspondiente a $\pm 2 \%$ de la medida o concentración de Cl⁻ obtenida.

Tiempo de Respuesta : Depende de la concentración de la solución de la muestra, la cual puede durar de 1 a 3 minutos.

Dimensiones del electrodo : 120 mm. de longitud por 12 mm. de diámetro, cubierta de plástico resistente a la acidez.

Para operar con el electrodo selectivo a los iones cloruro es necesario construir la celda galvánica, por lo que se utiliza como electrodo de referencia un electrodo de Ag/ Ag Cl, cuyo potencial es conocido y constante. (29)

2.6.2. Concentración y Actividad.

La ecuación de Nernst, que fundamenta el principio de operación de los electrodos selectivos, relaciona el potencial de un electrodo indicador con la actividad del ión en estudio, sin embargo, generalmente es de mayor utilidad conocer la composición y para ello, la relación entre actividad y concentración (c) esta definida por :

$$a = fc.$$

En donde f representa “el coeficiente de actividad”, magnitud de la que no siempre se dispone y que debe conocerse para cada ion a fin de poder expresar la actividad en términos de concentración; esta dificultad puede salvarse tomando en consideración las siguientes premisas.

El coeficiente de actividad es una función principal de la fuerza iónica de la solución que a su vez, es proporcional a la concentración y la carga de los iones, independientemente de su tipo, presente en solución. La fuerza iónica se define como sigue:

$$\text{Fuerza iónica} = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 + \dots$$

Donde :

C_i = Concentración de un ión i

Z_i = Carga del ión i

Σ = Sumatoria .

Si la concentración de iones en solución es alta respecto al analito la fuerza iónica también lo es y por tanto, el coeficiente de actividad del ión que interesa permanece constante encontrándose que la actividad es directa y proporcional a la concentración ; en consecuencia, las soluciones problema y los estándares deberán prepararse incorporando suficiente cantidad de electrolitos inertes lo cual se logra al adicionar a ambos una solución tamponadora de fuerza iónica denominada ISA (Ionica Strength Adjustor, Ajustador de la fuerza Iónica) que proporcionan un exceso constante de iones que no interfieren con el electrodo empleado.

Para cada electrodo está considerado un ISA que además debe corregir otros parámetros que pueden interferir con la determinación : por ejemplo, formación de ácidos, y bases débiles,

complejación, formación de precipitados insolubles, etc. En el caso del electrodo selectivo a los iones cloruro pueden interferir cianuros, bromuros, amoníaco, iones oxidrilo; por lo que se usa como ajustador de fuerza iónica una solución de nitrato de potasio 1 molar.

2.6.3. Exactitud y Precisión.

En general, todos los procedimientos de análisis químico están sujetos a errores determinados e indeterminación que influyen en la exactitud y precisión de las medidas analíticas; por ejemplo, pueden darse errores en las pesadas, medidas volumétricas, grado de pureza de reactivos, etc. ; además de las limitaciones inherentes a los distintos métodos analíticos.

En el caso particular de las medidas potenciométricas directas, la técnica involucra la comparación del potencial medido por un electrodo indicador en una solución problema con respecto a una curva de calibración obtenida a partir de soluciones patrón del analito.

Al asumir que los factores que pueden conducir a errores determinados están bajo control, las fuentes de incertidumbre tendrán su origen en las limitaciones propias de la técnica, a parte del ruido instrumental que afectan a las variables de la ecuación deducida para la potenciometría directa :

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nf} \ln a + E_j.$$

Así, la respuesta del electrodo está relacionada con la actividad a magnitud que no es igual a la concentración del analito en una muestra problema, por lo que es necesario en la práctica, *agregar un exceso de electrolito inerte a muestras y estándares para elevar la fuerza iónica con el fin de igualar los coeficientes de actividad y poder obtener resultados en términos de concentración a partir de la curva de calibración.*

La respuesta del electrodo también es afectada por la incertidumbre debido a la suposición de que el potencial de unión líquida, E_j permanece constante después de la calibración cuando en realidad dicho potencial varía ligeramente, puesto que las composiciones electrolíticas de muestras y estándares difieren en forma prácticamente inevitable; tal incertidumbre puede ser de 1 milivoltio o más.

La relación entre los errores promedio en el potencial medido, E y la actividad a del analito puede obtenerse a partir de la ecuación de Nernst.

$$E = E^\circ + \frac{2.3 R T}{n F} \log. a + E_j$$

Al sustituir las constantes por sus valores respectivos a 25°C para expresar el potencial E en milivoltios, se asume también que el coeficiente de actividad es igual a la unidad para efectos de simplicidad matemática y al tomar la derivada del potencial con respecto a la concentración se obtiene:

$$dE = (59.16/2.303) (dc/c)$$

Por definición, el error relativo de la concentración es igual a la relación entre la variación de la concentración Δc , debida a la incertidumbre con respecto a la concentración verdadera c ; de donde el error relativo porcentual ER , se define como:

$$ER = 100 \Delta c / c$$

Por tanto, puede escribirse la relación simplificada:

$$\Delta E = (0.2568/n) (ER)$$

Observándose que el error relativo en la concentración, sólo depende del potencial medido siendo independiente del rango de concentración y del tamaño de la muestra. (29).

3- MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización del Estudio.

El estudio se realizó en seis diferentes haciendas lecheras del Departamento de San Miguel.

Las coordenadas geográficas del lugar son :

13 grados 28 minutos latitud norte y 88 grados 11 minutos longitud oeste y a una elevación de 100 M.S. N.M. (22)

Las explotaciones están localizadas en la periferia de la ciudad de San Miguel, la cual presenta las siguientes características :

3.1.1. Características Climáticas .

3.1.1.1. Temperatura .

La temperatura promedio anual es de 28.6 ° C, la máxima en los meses de febrero a abril 44.8°C y la mínima en los meses de noviembre a febrero 14.4 °C . (28)

3.1.1.2 Humedad Relativa.

La humedad relativa promedio anual es de 70 %, registrándose la máxima de 82 % en septiembre y octubre, la mínima en febrero y marzo la cual es de 58 %. (28)

3.1.1.3. Precipitación

La precipitación promedio anual e de 1489.0 mm. (22)

3.1.1.4. Viento.

La velocidad promedio del viento es de 1.6 en la escala de Beaufort, que corresponde de 6 a 11 cm/hora.

3.1.2. Topografía del Lugar.

Las haciendas bajo estudio presentan una topografía plana , con un pendiente que va del 1 al 2 %.

3.1.3. Recursos Hídricos

Cada explotación posee su propia fuentes de agua que consiste en un pozo con bomba incluida, para satisfacer las necesidades de las mismas. (28).

3.1.4. Edafología del Lugar.

Los suelos predominantes en las haciendas donde se realizó la investigación son: los franco, arcillosos, franco y francos arenosos.

3.1.5. Vías de Acceso

Las vías de acceso hacia cada una de las haciendas son carreteras descubiertas , transitables durante todo el año.

3.1.6. Material Experimental.

Para desarrollar la investigación se utilizaron 81 vaca, que presentaban las siguientes características :

- * Encaste Brouw Swiss - Brahman.
- * En período de lactancia de 10 días después del parto.
- * Entre el segundo y séptimo parto.

3.2 Duración del Estudio.

El estudio se realizó en dos fases: La primera fue pre-experimental , la cual tuvo una duración de 30 días, comprendidas del 2 al 31 de mayo de 1996; y la segunda fase se realizó del 10 de Junio al 19 de Julio de 1996 con una duración de 39 días.

3.2.1. Fase Pre- experimental.

Esta fase se realizó en seis (6) haciendas, en las cuales se efectuó previamente una encuesta para obtener la información necesaria de cada hato lechero (ver anexo 1). Se seleccionó 9 vacas en cada explotación, a las cuales se les efectuó a cada uno de los cuartos, primeramente la prueba californiana (C.M.T.) en el momento de la recolección de las muestras y luego se les determinó la concentración de cloruros por potenciometría directa, en los laboratorios de Química de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.

En total fueron 54 vacas, seleccionadas de acuerdo al encaste, período de lactancia 10 días después del parto y que se encontraran de 2° a 7° parto, siendo 216 muestras de leche analizadas.

3.2.2. Fase Experimental.

Determinada las concentraciones de cloruros en la fase pre-experimental, se seleccionó la hacienda que presentó mayor incidencia de mastitis en la cual se evaluaron todas las vacas en producción, realizándoles 3 métodos de análisis para la detección de dicha infección; dos pruebas indirectas (Potenciometría y el test California) y una prueba directa (recuento bacteriano).

El método californiano (C.M.T.) se utilizó como un indicador para tener una referencia de la presencia de mastitis . La prueba bacteriológica sirvió como testigo de comprobación al método de potenciometría directa.

Los análisis se efectuaron en los laboratorios de los departamentos de Química y de Investigación de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador y en el laboratorio de Microbiología de la Dirección Vegetal y Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG).

Se tomaron muestras de 27 vacas encastadas, lo que representa 106 análisis de leche. La selección de vacas fue similar a la fase pre - experimental.

3.3. Procedimiento para Toma de Muestras.

Los pasos a seguir para la recolección de las muestras de leche fue igual en las fases de la investigación, así:

- * Se recolectaron las muestras antes del ordeño regular.
- * Las vacas se seleccionaron y se llevaron al lugar habitual de ordeño, en donde se les sujetó la cola para impedir contaminar los pezones ya desinfectados. Las zonas aledañas fueron lavadas con agua y jabón, secadas luego con papel toalla.
- * La ubre y pezones se desinfectaron con algodón empapado en alcohol, etílico con movimiento de abajo hacia arriba (del orificio del pezón a la base), se utilizó para ello todos los trozos de algodón necesarios, hasta que el algodón conservó su color blanco.
- * Se eliminaron los tres primeros chorros de leche, para ello se evitó el contacto del pezón con la boca del tubo o frasco, se tuvo la precaución de no hablar durante la recolección de muestras para evitar posibles contaminaciones, luego se taparon y rotularon los frascos con los datos de la vaca y el cuarto correspondiente ; así las muestras de leche fueron colocadas en hielera para su transporte.

3.4. Prueba Electroanalítica.

3.4.1. Método de Potenciometría directa.

Es una prueba electroanalítica, a través de la cual se utiliza la ecuación de Nernst ($E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln a + E_j$), y permite la determinación de la concentración de cloruros.

nF

3.4.2. Recursos de Laboratorio.

a) Equipo

Potenciómetro digital (marca Hanna).

Electrodo selectivo a los iones - cloruros.

Agitador Magnético.

Micropipetas.

b) Materiales.

Hieleras

Beaker de Teflón

Beaker de Vidrio (250 ml.)

Frascos Plásticos (12 ml.)

Pipetas graduadas estériles(1 ml)

Cámara de recuento de colonias

Cajas petri

Mechero bunsen

Cámara de flujo laminar

Autoclave

Tubos de ensayo tapón rosca 16x150 mm y 13 x100 mm.

c) Medios de cultivo

McConkey

Agar sangre

110

Edwards

d) Reactivos

Solución de KCl 1.0 M

Solución KNO₃ 1. 0 M

Solución KCl de 1000 ppm.

Reactivo de Erlich

Eter etílico

Rojo de metilo

peróxido de hidrógeno al 3%

3.4.3. Procedimiento del Método Potenciométrico.

3.4.3.1 Curva de calibración y lectura de muestras.

Se midieron con micropipeta alícuotas de solución de KCl de 1000 ppm, para obtener estándares de 25, 50, 100, 200, 400 ppm de KCl.

A cada estándar se añadió 10 ml de solución 1.0 M de KNO_3 , agua destilada para hacer un volumen de 20 ml.

Se leyeron en el potenciómetro observándose que la lectura en milivoltios permaneciera estable durante 15 segundos; se ploteó la curva en papel milimetrado. (Ver anexo. #2)

Lectura de Muestras.

Realizada la curva de calibración se procedió a las lecturas en las muestras de leche la cual se realizó de la siguiente manera:

- a) Se midió 10 ml de muestra de leche con una micropipeta y se colocó en un beaker de 50 ml.
- b) Se añadió a cada muestra 2.0 ml de KNO_3 1.0 M y 8 ml. de agua, se puso el beaker en agitador magnético durante 30 segundos para homogenizar la solución.
- c) Homogenizada la solución se leyó en el potenciómetro los milivoltios de cada muestra.

3.4.4. Cálculos.

La lectura proporcionada por el potenciómetro es dada en términos de milivoltios (mv), por lo que es necesario transformarlo a porcentaje de cloruro, puesto que de esta manera puede ser interpretado su concentración dentro de los tipos de leches.

Las fórmulas utilizadas son las siguientes:

Regresión Lineal.

$$C \text{ (ppm.)} = \text{Antilog.} [\text{Lectura} - K] \times 2$$

La concentración de cloruros se multiplicó por 2 debido a la dilución empleada para leer en el potenciómetro.

K = Intercepción

S = Pendiente.

$$\% \text{ Cl.} = \frac{\text{p.p.m}}{10^6} \times 100$$

10^6

3.5. Medios Selectivos .

Muchos casos de mastitis sub - clínica sólo pueden ser confirmados por los métodos de cultivo, en donde el aislamiento e identificación de un organismo específico presente en le leche es considerado como prueba de que el cuarto de una ubre esté infectado, afirmación cierta si la muestra ha sido tomada con la asepsia correcta; es por eso que se tomo el mayor de los cuidados a la hora de recolectar las muestras de leche de vaca destinadas a los medios de cultivo .

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 . Estafilococos , Estreptococos, 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 gramos de medio en polvo deshidratado diluidos en un litro de agua destilada mezclando y calentando hasta llevarlo a punto de ebullición; luego se llenó con 18 ml. de medio en tubos de ensayo con tapón rosca de 16x 150 mm. y esterilizado a 121°C a 15 Lbs. de presión durante 15 minutos en el autoclave.

Después de esterilizados se dejó enfriar los tubos con el agar, en este momento se agregó 1 ml. de sangre a cada tubo; para este caso se utilizó sangre humana homogenizada.

Para obtener una mezcla perfecta se realizaron movimientos oscilatorios suaves; luego se virtió en placas de petri estériles dejando reposar hasta solidificarse.

Después de solidificado el medio de cultivo, se llevó a cabo la siembra de 106 muestras de leche cruda . (4).

3.5.2. Medio # 110

El agar # 110 es selectivo para el aislamiento e investigación de staphylococcus, ya que posee manitol y gelatina. Para este tipo de medio, se pesó 149 grs. de polvo deshidratado de agar # 110, diluidos en un litro de agua destilada ; 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 autoclave. (3, 4).

Después de esterilizado se dejó enfriar el medio a 47°C dejando reposar hasta solidificarse y sembró 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, que se encuentra en gran parte en leches mastíticas.

Para este medio se pesaron 50gr. 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 vertieron 18 ml. por placa de petri estéril, las cuales se pusieron a reposar hasta solidificarse. (4)

3.5.4. Medio Edwards

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, calentado hasta llegar a 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 ml. de medio por caja de petri esterilizada. (3,4).

Se tomó con otra pipeta graduada estéril 1 ml. de la dilución 1:10 y se colocó en un tubo con agua destilada estéril formando así la segunda dilución (1:100) de igual manera se preparó las diluciones decimales siguientes hasta llegar a 1:10000. (3,15)

3.5.5. Siembra de la placa petri.

Este proceso se realizó en una cámara de flujo laminar, auxiliada de 2 mecheros tipo bunsen, en donde se utilizaron 4 cajas petri estériles por muestra para las diluciones.

Para realizar la siembra, se tomó con un pipeta graduada estéril 1 ml. de la primera dilución (1:10) y depositó en una caja petri estéril, la cual se identificó con el número de la muestra, nombre de la vaca y la dilución respectiva.

De la misma forma se sembró las diferentes muestras y diluciones en placas petri estériles, usando siempre pipetas graduadas estériles.

En todas las diluciones se hicieron dos siembras para obtener datos más representativos y confiables. (3,15)

3.5.6 Llenado de placas petri.

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

3.5.7 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 adecuadas, se utilizó para ello una cámara de recuento de colonias automática. (13)

3.6 Pruebas Bioquímicas.

Estas pruebas se utilizan para identificar las especies de microorganismos bacterianos presentes en los cultivos selectivos, para ello se utilizo 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 usó para identificar Escherichia coli y diferenciarla de otros bacilos entéricos como Enterobacter aerógenes.

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 utilizaron 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 se le agregó 20 gotas de éter etílico; se mezcló y se dejó reposar por 10 minutos, luego se le agregó 10 gotas de reactivo de Erlich.

3.6.3. Rojo de Metilo.

Preparado a base de caldo Rm. vp (Rojo de metilo-vogues 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 incubado 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 incubado a 37°C durante 72 horas; después de este período se le agregó 10 gotas de indicador Alfaftol y 4 gotas de hidróxido de potasio al 40%.

3.6.5. Citrato de Simmons.

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

3.6.6. Prueba de Catalasa.

Esta prueba se realizó para diferenciar especies de *Streptococos* y *Estafilococos*, en donde se utiliza 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 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 de una asa bacteriológica; transferidas luego a un porta objeto en donde se le agregó 1 gota de dicho reactivo, para hacer la identificación respectiva.

3.7. Recuento de colonias

3.7.1. Método de la placa de petri vertida.

Con este método se detectan bacterias coliformes, inócuas patógenas, y 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 se transfirió a un tubo con 9 ml. de agua destilada estéril, se formó así la primera dilución (1:10). Transcurridos 3 segundos se homogenizó. (3,15)

3.8 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

3.8.1 Factores de estudio

En esta investigación los factores a evaluar para la cuantificación del grado de mastitis fueron: prueba de concentración de cloruros totales y prueba bacteriológica.

3.8.2 Tratamientos y descripción.

<i>TRATAMIENTOS</i>	<i>DESCRIPCION</i>
Método 1. Concentración de cloruros (Variable independiente)	Indica el grado de infección de mastitis . Dicha concentración dio el porcentaje de cloruros que se midió por el método de potenciometría directa (método electroquímico)
Método 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; lo cual ayudó a elaborar una tabla para poder determinar concentraciones que sirvan como parámetro entre las concentraciones bacterianas causantes de mastitis y el porcentaje de concentración de cloruros.

3.8.3. ANALISIS DE LA INFORMACIÓN.

3.8.3.1. Correlación de Variables.

Para evaluar el grado de asociación de las variables bajo estudio: concentración de cloruros, número de colonias bacterianas, se utilizó el análisis de correlación a un nivel de significancia del 5% y su expresión matemática es la siguiente:

$$r^2 = \frac{[\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}]^2}{[\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}] [\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}]}$$

sumatoria de productos XY suma de cuadrados de x suma de cuadrados de Y

Donde:

r = Coeficiente de correlación

x = Variable independiente.

y = Variable dependiente

n = Número de Pares de Valores (8)

3.8.3.2 Significancia del coeficiente de correlación.

Se utilizó el nivel de significación de 5%; para comprobar la significación de correlación se ocupó la prueba "t" de student.

Hipótesis estadística.

$H_0 = r^2 = 0$: Indica que entre la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas no existe correlación y que esto se debe a la casualidad.

$H_0 = r^2 \neq 0$: Indica que existe correlación entre 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.

3.8.3.3. ANALISIS DE REGRESION

Para determinar el grado de dependencia entre las variables se aplicó el análisis de regresión.

A continuación se detalla el proceso para dicho análisis

- S. C. X. = $\sum X^2 - (\sum X)^2/n$
- S. C. Y. = $\sum Y^2 - (\sum Y)^2/n$
- S. P. cruzados XY = $\sum XY - (\sum X)(\sum Y)/n$

$$\blacksquare \text{ Coeficiente de regresión } (b) = \frac{XY - (\sum X) (\sum Y) / n}{\sum X^2 - (\sum X)^2 / n}$$

DONDE:

b= Coeficiente de regresión

X= Variable Independiente

Y= Variable dependiente

n= Número de pares de valores

$\sum XY$ = Sumatoria de productos cruzados

$\sum X$ = Sumatoria de variable independiente

$\sum Y$ = Sumatoria de variable dependiente.

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. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados y discusión de las pruebas de potenciometría directa y bacteriológicas, en muestras de leche sana.

Al analizar las muestras de leche por potenciometría directa se encontraron concentraciones de cloruro que oscilan de 0.077 %- 0.114 %, valores que se encuentran dentro de la clasificación de leches sanas (Ver tabla 3). Estos resultados coinciden con los análisis bacteriológicos de las mismas muestras, en los cuales no se encontró la presencia de bacterias causantes de mastitis, solamente colonias de bacterias inocuas.

El comportamiento de las concentraciones de cloruros y el número de colonias de bacterias se observan en la figura 6 y tabla 3 , los cuales tienen una relación directamente proporcional, lo que indica que a medida que aumenta la concentración de cloruros se incrementa el número de colonias bacterianas.

Según los resultados estadísticos de correlación lineal simple se da una relación en las concentraciones de Cl⁻ y el número de colonias bacterianas del 0.971 el cual tiene alta significancia al 1.0% en donde se puede asumir que hay una relación bastante acertada; donde se obtuvo un coeficiente de variación de 10.1%, lo cual indica que la media obtenida es bastante representativa y verifica la precisión de la investigación, lo cual constituye una ilustración del error relativo y la poca variabilidad en cuanto a la repetibilidad de los análisis. (Ver anexo #13)

Para verificar el grado de dependencia entre la concentración de cloruros y número de bacterias se hizo un análisis de varianza de regresión (ANVA) en el cual se obtuvo un alta significancia al 1.0% lo que refleja que el número de colonias bacterianas dependen del porcentaje de cloruros .

Tabla 3.- Correlación en la concentración de cloruros y el número de colonias de bacterias en leches sanas.

N	X	Y
	[Cl]	NCB
1	0.077	50
2	0.089	60
3	0.097	70
4	0.098	70
5	0.103	80
6	0.105	80
7	0.106	80
8	0.107	90
9	0.108	90
10	0.109	90
11	0.110	90
12	0.113	100
13	0.114	100

$$\Sigma X = 1.336$$

$$\Sigma y = 1050$$

$$X = 0.1027$$

$$Y = 80.769$$

$$X^2 = 0.13859$$

$$\Sigma Y^2 = 87,500$$

$$\Sigma XY = 109.72$$

$$N = 13$$

* NCB = Numero de Colonias Bacterianas

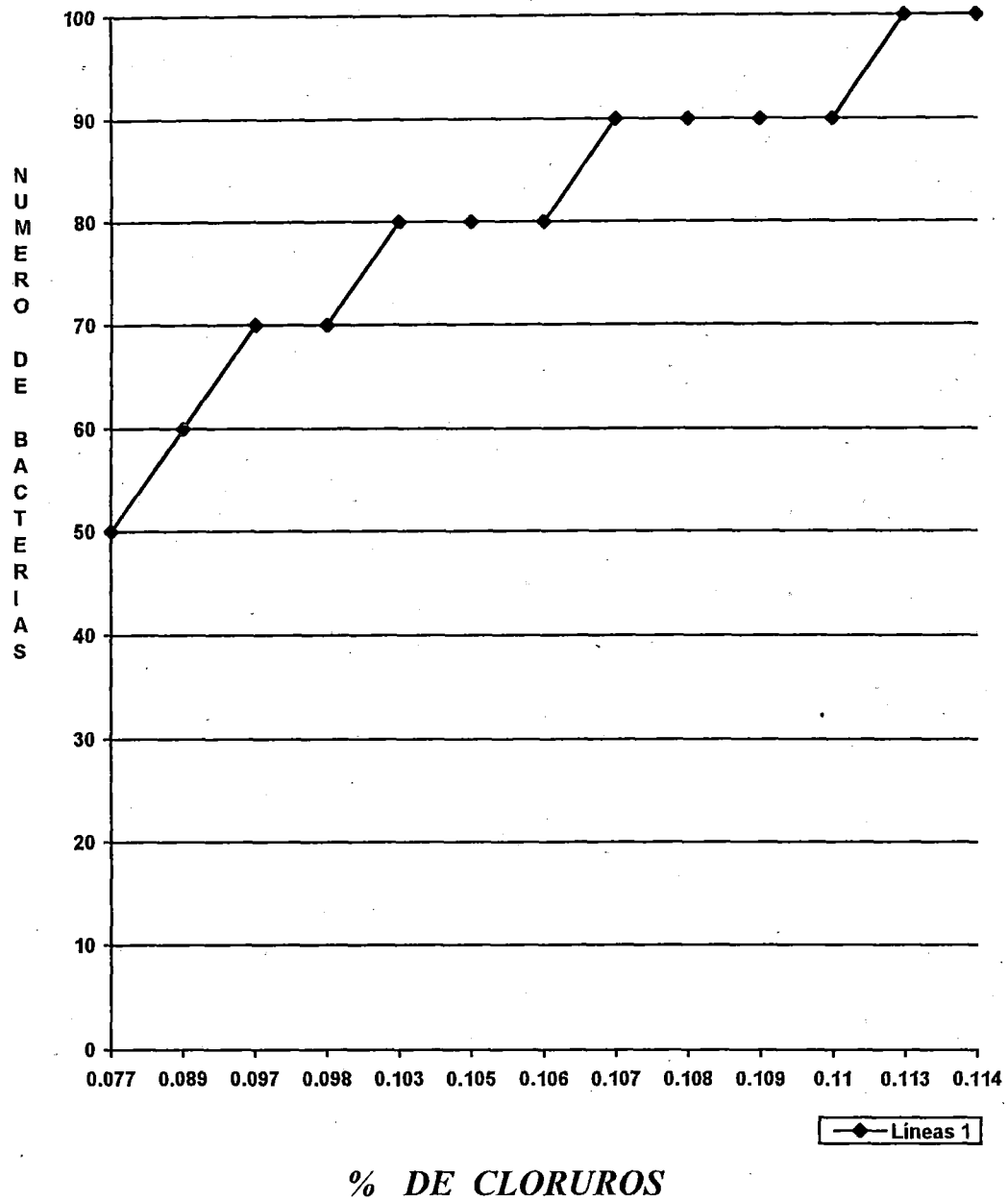


FIGURA 6. CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CLORUROS Y EL NÚMERO DE COLONIAS BACTERIANAS EN LECHE SANAS.

4.2. Resultado y discusión de las pruebas de potenciometría directa en leches en proceso de transición.

Por medio de cultivos bacteriológicos se pudieron determinar los siguientes agentes causales: Estafilococos aureus y Streptococos agalactiae.

Los datos de las muestras de la tabla 4 son leches enfermas y se clasifican como leches en transición ; por lo que no presentan una relación directamente proporcional en la concentración de cloruros con el número de colonias bacterianas

La variación del número de colonias en las que se encontraron concentraciones de cloruro que oscilan de 0.117 % a 0.138 % esto se podría deber a la fase de invasión. En esta 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 causales 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 que producen la mastitis, sin presentar ninguna manifestación clínica ni alteración alguna que pueda ser observada. (3, 26); momento en el cual todavía puede haber una recuperación espontánea y la infección puede pasar inadvertida; pero cuando persiste la infección continúan multiplicándose los microorganismos siguen descendiendo las defensas de la ubre y se presenta la invasión del tejido glandular con una reacción inflamatoria.

El tejido mamario es susceptible a la infección variando de vaca a vaca, jugando un papel importante en la presencia o ausencia de bacteriófagos que se encargan de controlar la invasión bacteriana y principalmente la invasión estafilocócica; estos microorganismos no patógenos en la ubre producen un estímulo local del mecanismo de defensa, el cual es suficiente para prevenir el establecimiento de una infección cuando penetran en la glándula mamaria nuevos microorganismos.

Según el análisis estadístico en estos tipos de leche la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas no presentan relación directa; en donde los resultados de correlación

lineal simple de los cloruros y el número de colonias de bacterias es 0.2990, el cual no tiene significancia al 5% y 1%, por lo que se asume que el método de correlación lineal no fue capaz de percibir la fase en la que se da la transición de la enfermedad. Además se obtuvo un coeficiente de variación de 5.20 % indicando que la media obtenida es altamente representativa verificando que la investigación es precisa e indica el grado de errores cometidos.

(ver anexo #13).

De acuerdo a los análisis para verificar el grado de dependencia entre la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas se hizo un análisis de varianza de regresión (ANVA), en el cual no se obtuvo significancia al 5% y 1% (ver anexo #16)

Es por ello que esta fase de transición de la enfermedad solamente pudo ser analizada técnicamente.

TABLA 4. - Correlación en la concentración de cloruros y el número de colonias de bacterias en leche en períodos de transición.

<i>n</i>	<i>Concentración de cloruros</i>	<i>Número de colonias bacterianas</i>
	X	Y
1	0.117	1400
2	0.118	130
3	0.119	140
4	0.121	130
5	0.123	1300
6	0.126	130
7	0.127	1500
8	0.128	1300
9	0.129	1600
10	0.130	1500
11	0.131	1400
12	0.132	1100
13	0.133	150
14	0.134	1200
15	0.135	1200
16	0.136	1600
17	0.137	1500
18	0.138	190

$$\Sigma X = 2.314 \quad X = 0.195 \quad \Sigma X^2 = 0.298238 \quad \Sigma Y = 17470$$

$$\Sigma XY = 2,266.78 \quad Y = 970.55 \quad \Sigma Y^2 = 23388900$$

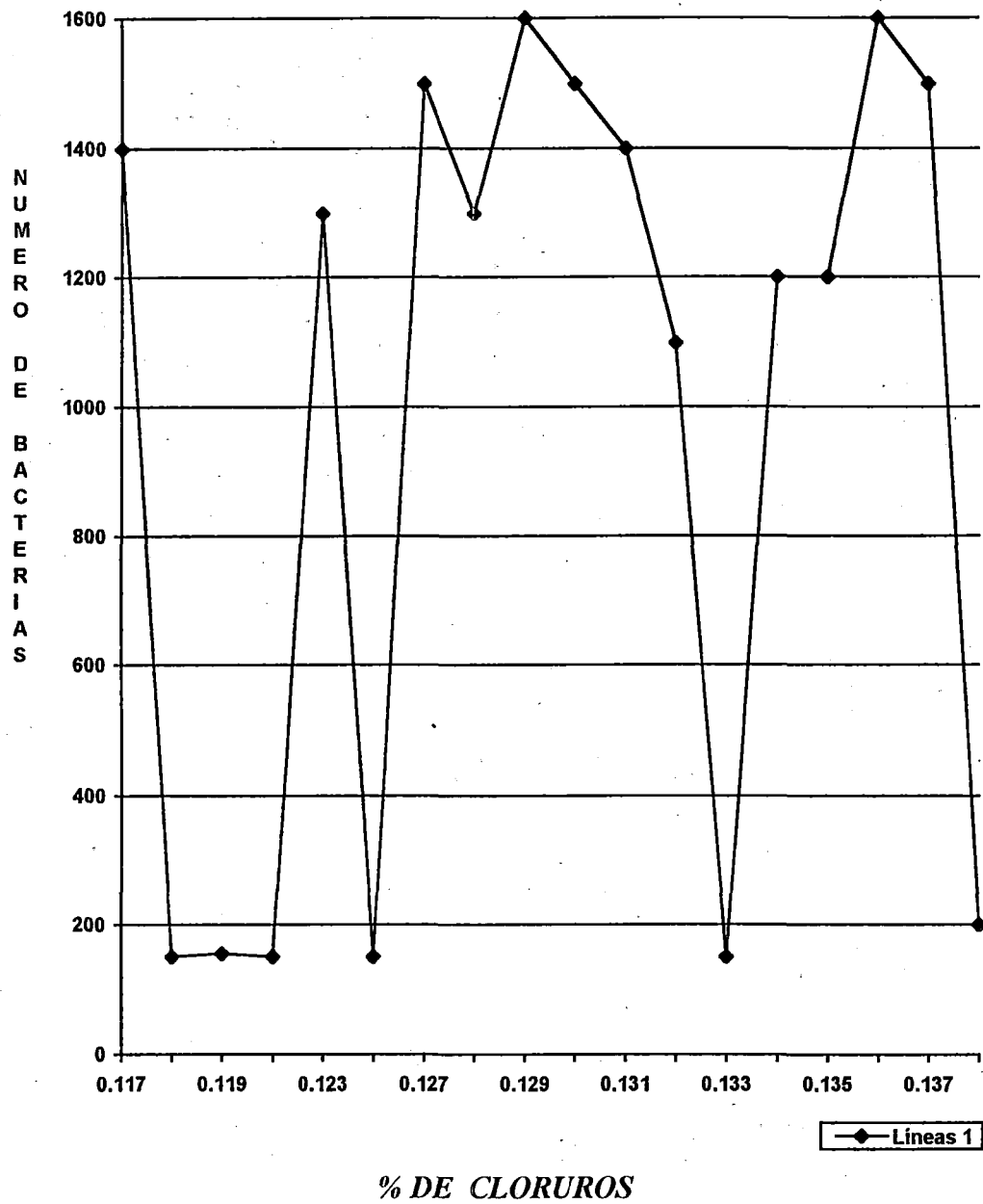
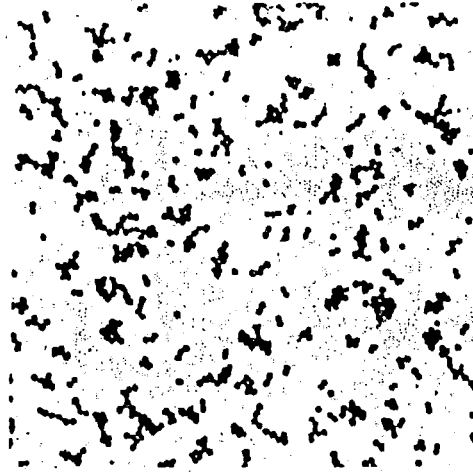


FIG. 7. CORRELACION EN LA CONCENTRACION DE CLORUROS Y EL NUMERO DE COLONIAS BACTERIANAS EN LECHE EN PERIODO DE TRANSICION

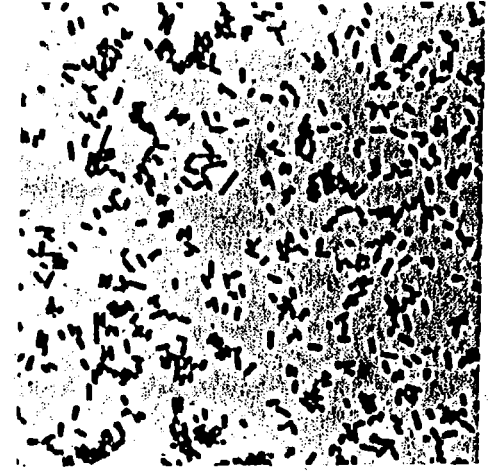
4.3. Resultados y discusión de las pruebas de CT por Potenciometría directa y bacteriológicas en muestras de leche enferma.



Streptococos, típica formación de cadenas



Estafilococos, bacterias redondeadas



Gérmenes coliformes, bastoncitos

Fig. 8 Agentes causales que se presentaron con mayor frecuencia en los cultivos bacteriológicos.

Por medio de cultivos bacteriológicos se pudieron determinar los siguientes agentes causales : Estafilococos aureus, Streptococos agalactiae, Escherichia coli. Dichos agentes se presentaron con mayor frecuencia en las vacas que se encontraban entre el sexto y séptimo parto.

Al analizar las muestras de la (tabla 5) , los datos obtenidos en los análisis de las leches enfermas, donde se encontraron concentraciones de cloruro que oscilan de 0.140 % a 0.332 %, tal como se visualiza en la figura 9 , se observa una relación directamente proporcional entre la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas; observándose un comportamiento similar al de las leches sanas, indicando que a medida aumentan los cloruros se incrementa el número de colonias de bacterias.

La relación concentración de cloruros y número de colonias bacterianas, se podría explicar en base a lo dicho por (5,6), que cuando un microorganismo penetra el pezón y llega a la glándula mamaria, hay una reacción propia de los tejidos a la penetración ocasionando un edema intersticial, lo que provoca un aumento de leucocitos que trae como consecuencia que la leche presente "cloruros de la sangre", lo que ocasiona el apareamiento de los eritrocitos, aumentando la temperatura de la ubre ya que la leche es un excelente medio de cultivo, proporciona condiciones apropiadas para que las bacterias que producen la mastitis puedan desarrollarse.

El análisis estadístico de correlación lineal simple demostró la relación que existe entre las dos variables (concentración de cloruros y el número de colonias de bacterias), cuyo valor fue lineal y positivo, obteniéndose un valor de 0.9235628; indicando que es altamente significativo al 1%, lo que asume la relación que existe entre las dos variables.

Además obteniéndose un coeficiente de variación de 25.80 el cual indica que la media obtenida tiene representatividad, lo que constituye una ilustración del error relativo y demuestra la poca variabilidad existente en cuanto a la repetibilidad de los análisis. (ver anexo #13)

De acuerdo a los análisis para verificar el grado de dependencia entre la concentración de cloruros y el número de colonias bacterianas se hizo a la vez un análisis de regresión (ANVA) en el que se obtuvo una alta significancia al 1%, lo que hace reflejar que el número de colonias bacterianas dependen del porcentaje de los cloruros.

TABLA 5. - Correlación en la concentración de cloruro y el número de colonias bacterianas en leches enfermas.

<i>N</i>	<i>Concentración de cloruro</i>	<i>Número de colonias bacterianas</i>
	X	Y
1	0.140	1700
2	0.141	1700
3	0.144	1700
4	0.147	1700
5	0.148	1700
6	0.153	1800
7	0.154	1800
8	0.155	1800
9	0.158	1800
10	0.159	1800
11	0.160	1800
12	0.161	1800
13	0.164	1800
14	0.167	1800
15	0.168	1800
16	0.175	1900
17	0.193	41000
18	0.196	71000
19	0.199	100,000
20	0.200	500,000
21	0.201	900,000
22	0.207	3,000,000

23	0.215	3,200,000
24	0.221	3,300,000
25	0.224	3,400,000
26	0.225	3,500,000
27	0.230	3,600,000
28	0.233	3,700,000
29	0.235	3,700,000
30	0.236	3,700,000
31	0.237	3,700,000
32	0.243	3,800,000
33	0.245	3,800,000
34	0.251	3,900,000
35	0.255	4,000,000
36	0.268	4,200,000
37	0.276	4,300,000
38	0.283	4,400,000
39	0.307	4,700,000
40	0.317	4,800,000
41	0.327	4,900,000
42	0.332	5,000,000

$$\Sigma XY = 2,266.78$$

$$\Sigma X = 8.85$$

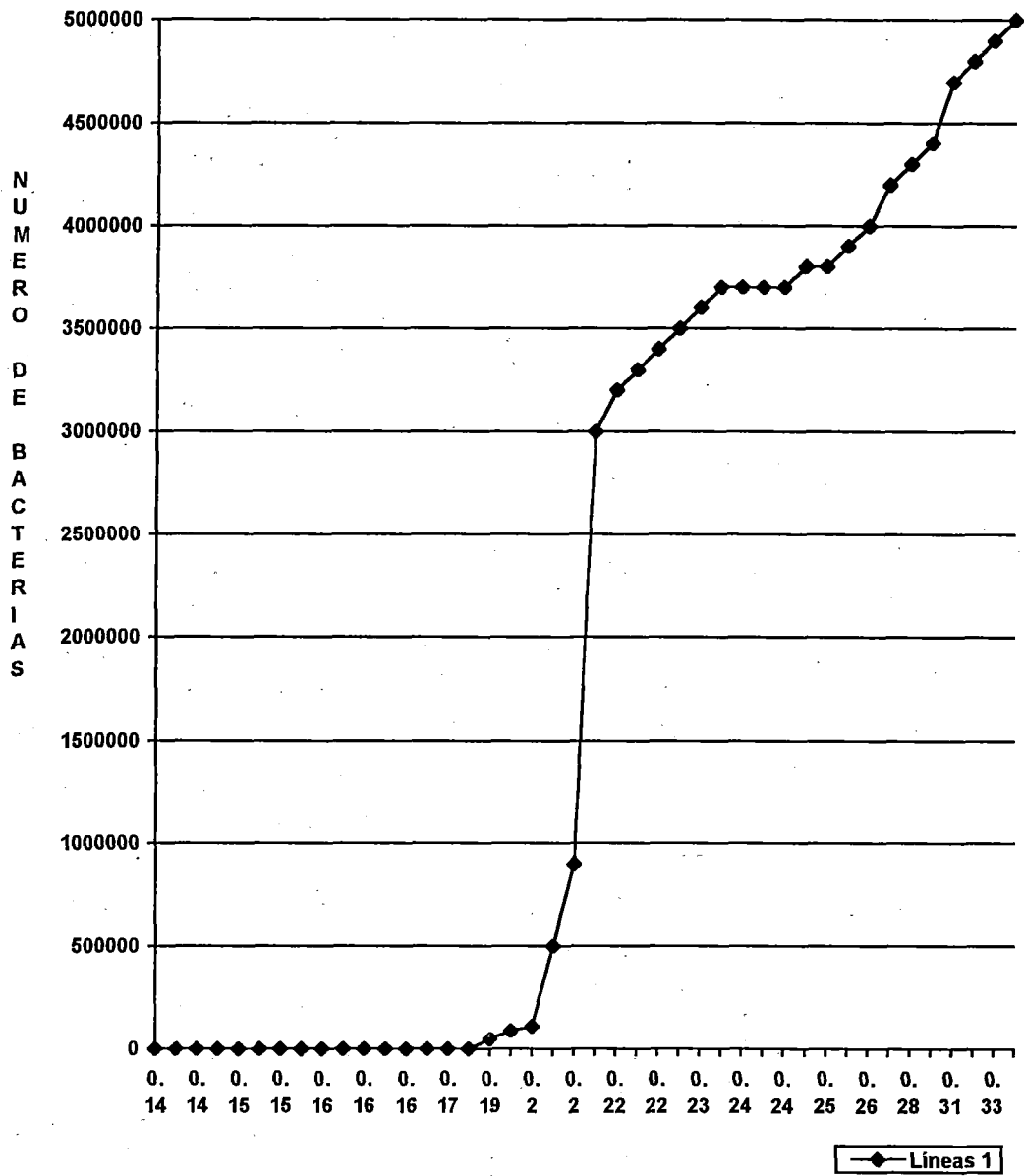
$$\Sigma X^2 = 1.986022$$

$$X = 0.2107$$

$$Y = 2005723.81$$

$$\Sigma Y = 84240400$$

$$\Sigma Y^2 = 3324567725 \times 10^5$$



% DE CLORURO
FIG.9. GRAFICA DE CORRELACION DE CONCENTRACION DE CLORUROS Y NUMERO DE COLONIAS BACTERIANAS EN LECHE ENFERMAS.

5- CONCLUSIONES

- ◇ Los resultados obtenidos determinan que la técnica de potenciometría directa, puede ser utilizada como una alternativa para detectar mastitis de manera eficiente.
- ◇ Las concentraciones de cloruros en las muestras de leche analizadas, poseen una relación directa al aumento del número de colonias bacterianas.
- ◇ El rango de concentraciones normales de cloruros en leche cruda en el departamento de San Miguel, oscila de 0.077% a 0.114%, con un máximo de 100 colonias bacterianas inocuas.
- ◇ Las concentraciones de cloruros mayores de 0.14 % con un mínimo de 1700 colonias de bacterias patógenas (Streptococos agalactiae, Estafilococos aureus y Escherichia coli), son consideradas como leches enfermas de mastitis o mamitis.
- ◇ Las concentraciones de cloruros cuyo rango va de 0,117 % a 0.138% y que tienen una variación en cuanto al número de bacterias (inocuas y patógenas), son consideradas como leches en período de transición de sanas a enfermas de mastitis o mamitis.
- ◇ La evaluación estadística demuestra la relación existente entre la concentración de cloruros y el número de colonias de bacterias la cual es directamente proporcional. Por consiguiente la dependencia que existe entre ambas, donde se obtuvo precisión y exactitud le dan confiabilidad a la metodología aplicada.(potenciometría directa).

6- RECOMENDACIONES

- ◇ Realizar muestreos periódicos para detectar problemas de mastitis, para poder contar con mayor información que permita tomar medidas para el control de dicha enfermedad.
- ◇ Recomendar a los ganaderos de la región, poner en control las vacas que presentan leches con concentraciones que estén en el período de transición de la enfermedad (0.117% a 0.138 %), como una medida para minimizar la enfermedad en la zona.
- ◇ Efectuar el antibiograma (prueba de tolerancia) para utilizar el medicamento específico a cada germen causante de mastitis.
- ◇ Realizar la prueba cada quince días, para tener un mejor control de la enfermedad y disminuir la incidencia de mastitis en los hatos.
- ◇ Desarrollar investigaciones en otras zonas del país utilizando el método potenciométrico, para establecer parámetros sobre las concentraciones de cloruros.

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; fisico 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 Clínica 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. G. 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 nor-oriental de EL Salvador. Tesis Med. Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. P. 16-22.
- 7- BONILLA, G. 1991. Estadística. 4a ed. San Salvador, El Salvador, UCA editores. P. 140.

- 8- CALZADA BENZA, J. 1970. Método estadístico para la investigación. 3a ed. Lima, Perú, Jurídica. P. 185-383.

- 9- CAÑAS DE MORENO, F. SF. Manual de laboratorio de química analítica. San Salvador. El Salvador, Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas. P. 1.

- 10- CARCAMO SEGOVIA, J.F. 1978. Evaluación de la calidad de las leches pasteurizadas en El Salvador. Tesis para optar al título de Ing. Agrónomo. San Salvador, Universidad de El Salvador. P. 4.

- 11- CHINCHILLA, M.D. 1978. Mastitis o mamitis. Agricultura en El Salvador. P. 87-93.

- 12- CHRISTIAN, G.D. 1990. Química Analítica. 2a ed. México, D.F. Limusa. P. 287 - 292, 357 - 359.

- 13- COLES EMBERT, H. 1968. Patología y diagnóstico veterinario. México, D.F. Interamericano. P. 238, 273-283

- 14- DAVIS. R.F 1985. La vaca lechera, su cuidado y exploración. 3a de. México D.F. De. Limusa. P. 8.

- 15- 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.
- 16- DENEKE, J.; RABOLA, K; KLEINS CHROEN, E. 1989. La mastitis. 2a ed. Grunland. P. 7-10.
- 17- DIFCO. 1978. Manual de bacteriología: Recopilaciones técnicas; Madrid, España. Marisa. P. 185-383.
- 18- DIGGINS BUNDY. 1973. Vacas, leche y sus derivados. Trad. por Alfonso Vasscurwalls. 3a ed. México D.F. editorial Continental. P. 73.
- 19- FAGIOLI, F. 1984. Circuito de medición potenciométrico. ed. al Revista Italiana Di Stomatología. S. P.
- 20- GARCIA TINAJERO, R.; CORDOBA PONCE, R. 1988. Manual ilustrado de técnicos de laboratorio utilizadas en bacteriología y Micología veterinaria.
- 21- GRAY YOUNG, G. 1972. Microbiología. 3a ed. México, D.F. Continental. P. 469- 487
- 22- GUZMAN, P.A. 1986. Diccionario geográfico de El Salvador. M.O.P.; Instituto Geográfico Nacional. San Salvador, El Salvador. P. 106.

- 23- HODGSON, R.E.; REED, O.E. 1966. La industria lechera en América. 4a ed. SL. PAX. P. 228.
- 24- JAMES, S. FRITZ; GEORGE, H.S. 1986. Química analítica cuantitativa. México. Limusa. P. 211.
- 25- 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.
- 26- MEDINA DELGADO, O. 1996. 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. 13-21
- 27- MATEUS VALLES, G. 1983. Mastitis en bovinos, San José, Costa Rica. CATIE P. 12
- 28- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA. 1992. Almanaque Salvadoreño. Centro de Recursos Naturales, Servicio de Meteorología e Hidrología, San Salvador, El Salvador. P. 48-59.
- 29- PAYES HERNANDEZ, J.E. 1994. Determinación de fluoruros en pastas dentífricas aplicando la potenciometría directa. San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. P. 15-39.
- 30- PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S.C. 1984. Mastitis: El Contra ataque. ed. Luisiana State University Agricultural Center. P.1-17.

31- REVILLA, R.A. 1976. Tecnología de la leche: Procesamiento, manufactura y análisis. México, D.F. Herrero Hermanos. P. 11-19.

32- RIVERA AMAYA, Y.; MERROCAL, M.C. 1962. Las mastitis en los hatos lecheros de Puerto Rico. Boletín Informativo, Universidad de Puerto Rico. P. 32.

33- SANTOS MORENO, A. 1987. Leche y sus derivados. 1a ed. México. D.F. Trillas.
P. 93.

ANEXOS

ANEXO I. ENCUESTA

1. Nombre de la explotación _____

2. Ubicación de la explotación _____

3. Tamaño (Mz) _____

4. Nombre del propietario _____

5. Número de animales _____

6. Número de vacas en producción _____

7. Encastes existentes _____

8. Sistema de explotación utilizado _____

9. Tipo ordeño utilizado _____

ANEXO 2. CURVA DE CALIBRACIÓN.

Se realizó la curva de calibración con los siguientes estándares :

25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm. Preparados de la siguiente manera :

Material y equipo utilizado: beakers de 50.0 ml., micropipetas y el potenciómetro.

Reactivos utilizados : H₂O destilada, KNO₃ 1 M, solución estandar (KCl 1 M).

$$\begin{array}{l} 1) 25 \text{ ppm} = \\ \text{Log } c = \\ E = \end{array} \left[\begin{array}{l} 17.5 \text{ ml H}_2\text{O} + 2 \text{ ml KNO}_3 \text{ 1 M} + 0.5 \text{ ml de solución estandar} \\ (\text{KCl 1M}) \end{array} \right]$$

$$\begin{array}{l} 2) 50 \text{ ppm} = \\ \text{Log } c = \\ E = \end{array} \left[\begin{array}{l} 17 \text{ ml H}_2\text{O} + 2 \text{ ml. KNO}_3 \text{ 1 M} + 1 \text{ ml de solución estandar (KCl 1 M)} \end{array} \right]$$

$$\begin{array}{l} 3) 100 \text{ ppm} = \\ \text{Log } c = \\ E = \end{array} \left[\begin{array}{l} 16 \text{ ml H}_2\text{O} + 2 \text{ ml KNO}_3 \text{ 1 M} + 2 \text{ ml de solución estandar (KCl 1 M)} \end{array} \right]$$

$$\begin{array}{l} 4) 200 \text{ ppm} = \\ \text{Log } c = \\ E = \end{array} \left[\begin{array}{l} 14 \text{ ml H}_2\text{O} + 2 \text{ ml KNO}_3 \text{ 1 M} + 4 \text{ ml de solución estandar (KCl 1 M)} \end{array} \right]$$

$$\begin{array}{l} 5) 400 \text{ ppm} = \\ \text{Log } = \\ E = \end{array} \left[\begin{array}{l} 10 \text{ ml H}_2\text{O} + 2 \text{ ml KNO}_3 \text{ 1 M} + 8 \text{ ml de solución estandar (KCl 1 M)} \end{array} \right]$$

Preparadas las soluciones, se analizan en el potenciómetro para obtener las lecturas, luego se graficó la curva de calibración en papel milimetrado ploteando el potencial de la celda (Mv) contra el logaritmo de la concentración de cada estándar para determinar la lineabilidad de la curva. Se encontró la correlación (r) entre la lectura y el logaritmo de la concentración, además se determinó el intercepto (a) y la pendiente (b) indispensables para la aplicación de la fórmula y encontrar las concentraciones de iones cloruro.

Para la lectura de las muestras de leche se preparó la siguiente solución : 10 ml de H₂O + 2 ml de cloruro de potasio (KCl de 1000 ppm). Se realizaron los cálculos para encontrar los valores de iones cloruros aplicando la ecuación de Nernst.

La concentración de iones cloruro se multiplicó por 2 debido a la dilución 1 a 1 empleada para leer en el potenciómetro.

ANEXO 3. Preparación de 1.0 litro de Nitrato de Potasio (KNO₃) 1 M.

Se pesaron 101.11 gramos de nitrato de potasio (KNO₃) en un beaker de 600 ml, se agregó agua destilada más o menos 300 ml para disolverlo. Después se traslado en un frasco volumétrico de 1000 ml. Se aforó siempre con agua destilada hasta completar 1.0 litro.

ANEXO 4. Cálculo de correlación de leches sanas.

Sumatoria de x (concentración de cloruros).

$$\sum x = x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n.$$

$$\Sigma x = 0.077 + 0.089 + 0.097 + \dots + 0.114$$

$$\Sigma x = 1.336.$$

Sumatoria de Y (número de colonias bacterianas).

$$\Sigma Y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + T_n.$$

$$\Sigma Y = 50 + 60 + 70 + \dots + 100$$

$$\Sigma Y = 1050$$

Media de x

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

$$\bar{x} = \frac{1.336}{13}$$

$$\bar{x} = 0.1027$$

Media de Y

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

$$\bar{Y} = \frac{1050}{13}$$

$$\bar{Y} = 80.769.$$

Sumatoria de cuadrado de x

$$s.c. x = \frac{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}{n}$$

$$s.c.x = \frac{(0.077)^2 + (0.089)^2 + (0.097)^2 + \dots + (0.114)^2 - (0.077+0.089+\dots+0.114)^2}{13}$$

$$scx = 0.13859 - 0.13729$$

$$scx = 0.0013$$

Suma de cuadrado de y

$$s.c.y = \frac{\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2}{n}$$

$$s_{cy} = (50)^2 + (60)^2 + (70)^2 + \dots + (100)^2 - \frac{(50+60+70+\dots+100)^2}{13}$$

13

$$s_{cy} = 87500 - 84807.69$$

$$s_{cy} = 2692.31$$

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

$$\Sigma xy = (0.077 \times 50) + (0.089 \times 60) + (0.097 \times 70) + \dots + (0.114 \times 100)$$

$$\Sigma xy = 109.72$$

Prueba de correlación para leches sanas.

$$\Sigma xy - (\Sigma x \cdot \Sigma y) / n$$

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

$$109.72 - 107.9076923$$

$$r = \frac{109.72 - 107.9076923}{\sqrt{(0.0012424) (2692.307692)}}$$

$$r = 0.971$$

Prueba de regresión para leches sanas.

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

$$\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 / n$$

$$b = \frac{109.72 - (1.336 \times 1050) / 13}{0.138592 - 0.13729}$$

$$b = 1402.1807$$

ANEXO 5. Cálculo de correlación de leches en transición

sumatorio de x (concentración de cloruros)

$$\Sigma x = x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n$$

$$\Sigma x = 0.117 + 0.118 + 0.119 + 0.121 + \dots + 0.138$$

$$\Sigma x = 2.314$$

Sumatoria de y (número de colonias bacterianas)

$$\Sigma y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_n$$

$$\Sigma y = 1400 + 130 + 140 + \dots + 1500$$

$$\Sigma y = 17470$$

Medida de x

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

$$\bar{x} = \frac{2.314}{18}$$

$$\bar{x} = 0.1285$$

Medida de y

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

$$\bar{y} = \frac{17470}{18}$$

$$\bar{y} = 970.555$$

Sumatoria de cuadrado de x.

$$scx = \frac{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}{n}$$

$$Scx = (0.117)^2 + (0.118)^2 + (0.119)^2 + \dots + (0.138)^2 - \frac{(2.314)^2}{18}$$

$$scx = 0.298238 - 0.297477$$

$$scx = 0.000762$$

Suma de cuadrado de y

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

$$scy = (1400)^2 + (130)^2 + (140)^2 + (130)^2 + \dots + (1500)^2 - \frac{(17470)^2}{18}$$

$$scy = 23388900 - 16,955605.56$$

$$scy = 6433294.445$$

$$\sum xy = (0.117 \times 1400) + (0.118 \times 130) + (0.119 \times 140) + \dots + (0.138 \times 190)$$

$$\sum xy = 2266.78$$

Prueba de correlación para leches sanas.

$$\frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}$$

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

$$\frac{2266.78 - (2.314 \times 17470)/18}{\sqrt{\frac{0.298238 - (2.314)^2}{18} \cdot \frac{23388900 - (17470)^2}{18}}}$$

$$r = \frac{2266.78 - 2245.86}{\sqrt{4902.170367}}$$

$$r = 0.2990$$

$$r = 0.2990$$

Prueba de regresión para leches en transición

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

$$b = \frac{2266.48 - 2245.865556}{0.298238 - 0.297477555}$$

$$b = 27502.9$$

ANEXO 6. Cálculo de correlación de leches enfermas.

Sumatoria de x (concentración de cloruros)

$$\Sigma x = x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n$$

$$\Sigma x = 0.140 + 0.141 + 0.144 + 0.147 + \dots + 0.332$$

$$\Sigma x = 8.85$$

Sumatoria de y (número de colonias bacterianas)

$$\Sigma y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_n$$

$$\Sigma y = 1700 + 1700 + 1700 + 1700 + 1700 + 1800 + \dots + 5,000,000$$

$$\Sigma y = 84240400$$

Media de x

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

Media de y

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

$$\bar{x} = \frac{8.85}{42}$$

$$\bar{y} = \frac{84240400}{42}$$

$$\bar{x} = 0.210714285$$

$$\bar{y} = 2,005,723.81$$

Suma de cuadrado de x

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

$$scx = (0.140)^2 + (0.141)^2 + (0.144)^2 + \dots + (0.332)^2 - \frac{[(0.140 + 0.141 + \dots + 0.332)^2]}{42}$$

$$scx = 1.986022 - 1.864821429$$

$$scx = 0.121200571$$

Suma de cuadro de y

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

$$scy = (1700)^2 + (1700)^2 + \dots + (5,000,000)^2 - \frac{(1700 + 1700 + \dots + 5,000,000)^2}{42}$$

$$scy = 332456772500000 - 16896297600000$$

$$scy = 163493+96500000$$

Sumatoria producto x,y

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

$$\sum xy = (0.140 \times 1700) + (0.141 \times 1700) + \dots + (0.332 \times 5,000,000)$$

$$\sum xy = 21861863.7$$

Prueba de correlación para leches enfermas.

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

$$21861863.7 - 17 \cdot 50655.71$$

$$r = \frac{\quad}{\sqrt{1.981557418 \times 1013}}$$

$$r = 0.923562$$

Prueba de regresión para leches enfermas.

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

$$4111207.99$$

$$b = \frac{\quad}{0.121200571}$$

$$b = 33920698.2$$

ANEXO 7. Prueba de hipótesis correlativa para leches sanas.

Ho P = 0

Ho P ≠ 0

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

$$t = 0.971 \frac{\sqrt{13-2}}{1-(0.971)^2}$$

$$t = 13.47$$

$$t = (\text{tabla}) = 2.201 \text{ al } 5\% *$$

$$= 3.106 \text{ al } 1\% **$$

Altamente significativo al 1 %

Significativo al 5 %

ANEXO 8. Prueba de hipótesis correlativa para leches en transición.

$$H_0 = 0$$

$$H_0 \neq 0$$

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

$$t = 0.299 \frac{\sqrt{18-2}}{1-(0.357)^2}$$

$$t = 0.299 \frac{\sqrt{16}}{0.872551}$$

$$t = 1.28$$

t (tabla) = 2.120 al 5% ^{ns}
2.921 al 1% ^{ns}

No significativo al 1%

No significativo al 5%

ANEXO 9. Prueba de hipótesis correlativa para leches enfermas.

$H_0 = 0$

$H_0 \neq 0$

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

$$t = 0.923 \sqrt{\frac{42 - 2}{1 - (0.923)^2}}$$

$$t = 0.923 \sqrt{\frac{40}{1 - 0.851929}}$$

$$t = 0.923 \sqrt{\frac{40}{0.148071}}$$

t = 15.17

t = (tabla) = 2.021 al 5% *
= 2.704 al 1% **

Altamente significativo al 1%
significativo al 5%

ANEXO 10. Coeficiente de variación para leches sanas.

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

$$S = \sqrt{\frac{0.00129237}{12}}$$

$$S = 0.01037749$$

S

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

\bar{x}

$$0.01037749$$

$$CV = \frac{0.01037749}{0.1027} \times 100$$

$$0.1027$$

$$CV = 10.1$$

ANEXO 11. Coeficiente de variación para leches en período de transición

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

$$S = \sqrt{\frac{0.000760444}{17}}$$

$$S = 0.0066882$$

$$C.V. = \frac{5}{\bar{x}} \times 100$$

$$C.V. = \frac{0.0066882}{0.1285} \times 100$$

$$C.V. = 5.20$$

ANEXO 12. Coeficiente de variación para leches enfermas

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

$$S = \sqrt{\frac{0.121200571}{41}}$$

$$S = 0.054370134$$

$$C.V. = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

$$C.V. = \frac{0.054370134}{0.210714} \times 100$$

$$C.V. = 25.80$$

ANEXO 13. Grado de representatividad de la media aritmética, para distinto coeficientes de variabilidad.

Valor del coeficiente de variabilidad.	Grado en que la media representa a la serie.
De 0 a menos de 10 %	Media altamente representativa.
De 10 a menos de 20%	Media bastante representativa
De 20 a menos de 30%	Media tiene representatividad.
De 30 a menos de 40%	Medida cuya representatividad es dudosa.
De 40% o más	Media carente de representatividad.

ANEXO 14. Concentraciones de cloruros por hacienda.

HACIENDA LOS LAURELES.

NOMBRES	CONCENTRACIONES DE CLORUROS (%)			
	1	2	3	4
1- Monja	0.096	0.112	0.096	0.107
2- Compena	0.106	0.110	0.116	0.118
3- Comara	0.127	0.099	0.111	0.133
4- Celina	0.122	0.129	0.116	0.107
5- Alcaravana	0.129	0.123	0.121	0.107
6- Jardín	0.140	0.143	0.108	0.127
7- Esperanza	0.107	0.117	0.157	0.151
8- Granadilla	0.152	0.152	0.142	0.106
9- Holandesa	0.128	0.158	0.147	0.142

HACIENDA SAN JUAN

1.- Deysi	0.117	0.123	0.123	0.1084
2.- Bellaca	0.136	0.112	0.127	0.127
3.- Dálida	0.132	0.126	0.132	0.132
4.- Karina	0.148	0.147	0.121	0.149
5.- Ranchera	0.156	0.128	0.152	0.152
6.- Ballena	0.133	0.168	0.184	0.139
7.- Guerrero	0.150	0.139	0.158	0.203
8.- Española	0.161	0.203	0.158	0.191
9.- Mexicana	0.154	0.154	0.199	0.291

HACIENDA LOS LIMONES

Nombre	Concentración de cloruros (%)			
	1	2	3	4
1.- Chica	0.085	0.096	0.078	0.077
2.- Macarena	0.102	0.090	0.087	0.113
3.- Chucara	0.096	0.113	0.101	0.106
4.- Caprichosa	0.106	0.096	0.115	0.096
5.- Reyna	0.084	0.138	0.109	0.129
6.- Raymunda	0.154	0.106	0.088	0.113
7.- Toribia	0.117	0.125	0.118	0.112
8.- Charamusca	0.127	0.121	0.118	0.106

RANCHO TIERRA SANTA

Nombre	Concentración de cloruros (%)			
	1	2	3	4
1.- Sarceta	0.104	0.118	0.118	0.122
2.- Secretaria	0.157	0.105	0.147	0.166
3.- Negrita	0.153	0.119	0.132	0.126
4.- Juncuya	0.158	0.169	0.145	0.143
5.- Panderosa	0.197	0.158	0.147	0.186
6.- Gaviota	0.183	0.187	0.246	0.187
7.- Argentina	0.230	0.233	0.224	0.226
8.- Pasita	0.210	0.256	0.195	0.228
9.- Desconocida	0.309	0.252	0.286	0.263

HACIENDA LA CEIBA

Concentración de cloruros (%)

Nombre	1	2	3	4
1.- Gaviota	0.12312	0.1317	0.1018	0.1009
2.- Chibola	0.1200	0.1155	0.1210	0.096015
3.- Violeta	0.1117	0.1146	0.11606	0.12055
4.- Orgullosa	0.1098	0.1146	0.1190	0.1089
5.- Norteño	0.1098	0.11316	0.1018	0.09764
6.- Julia	0.1062	0.117	0.1066	0.0912
7.- Coqueta	0.0980	0.09089	0.1027	0.0944
8.- Clavellina	0.0860	0.0853	0.1018	0.1027
9.- Empañada	0.09283	0.09764	0.09764	0.09682

HACIENDA CIEZ

Concentración de cloruros (%)

Nombre	1	2	3	4
1.- Sospecha	0.143	0.132	0.151	0.144
2.- China	0.185	0.146	0.173	0.164
3.- Flor de Maria	0.170	0.167	0.158	0.172
4.- Evelin	0.187	0.194	0.195	0.184
5.- Sirenita	0.194	0.201	0.198	0.203
6.- Lorita	0.204	0.210	0.215	0.223
7.- Chilecita	0.218	0.223	0.196	0.238
8.- Tequilera	0.224	0.230	0.234	0.228
9.- Mirna	0.234	0.246	0.253	0.260

ANEXO 15. Análisis de regresión dispuesto en forma de análisis de varianza

<i>F. de V.</i>	<i>Gl.</i>	<i>S.C.T.</i>	<i>C.M.</i>	<i>F.C.</i>	<i>5% FT</i> <i>1%</i>
Regresión	(a - L)	$r^2 \frac{(\sum y^2 - (\sum y)^2)}{n}$	$r^2 \frac{(\sum y^2 - (\sum y)^2)}{n}$	$\frac{r^2 (\sum y^2 - (\sum y)^2)}{n}$	
Desv. de Regresión	(N - 1)	$(L - r^2) \frac{(E y^2 - (2y)^2)}{n}$	(a - L)	(a - 1)	$\frac{(L - r^2) (E y^2 - (2y)^2/n)}{(N - L) - (A - L)}$
	(a - 1)		$\frac{(L - r^2) (E y^2 - (2y)^2/n)}{(N - L) - (A - L)}$	+	
Total	(N - 1)	$\frac{\sum y^2 - (\sum y)^2}{n}$			

Nota : Los grados de libertad para la regresión (a - 1) es igual a 1.0

ANEXO 16. Análisis de regresión para leches sana dispuesto en forma de análisis de varianza (ANVA)

F. de V.	GL	Sct	CM	Fc	5% Ft 1%
Regresión	1	2538.42	2538.42	** 181.44	4.84 9.65
desviación de Regresión	11	153.89	13.99		
Total	12	2692.31			

En el análisis de regresión de leches sanas dispuesto en forma de ANVA se obtuvo:

Alta significancia al 1.0%

Significativo al 5%

ANEXO 17. ANVA de regresión para leches en transición

F. de V.	GL	Sc	CM	Fc	5% Ft 1%
Regresión	1	57142.957	575142.957	1.669 ns	4.45 8.48
desviación de Regresión	17	5858151.488	344597.146		
Total	18	6433294.445			

En el análisis de regresión de leches en transición se obtuvo.

No significancia.

ANEXO 18. ANVA DE REGRESIÓN PARA LECHE ENFERMAS

F. de V.	GL	Sct	CM	Fc	5% Ft 1%
Regresión	1	1394548131 00000	139,454,813, 100,000	** 237.85	4.06 7.31
desviación de Regresión	41	2403898338 0000	586,316,667, 800		
Total	42	163,443,796, 500,000			

En el análisis de regresión dispuesto en forma de ANVA se obtuvo.

Alta significancia al 1.0%

Significativo al 5%

ANEXO 19. COLORACIÓN BACTERIANA DE GRAM

En este método de coloración, las bacterias se dividen en dos grandes grupos: Las que conservan el cristal violeta llamadas "Gran Positivas" y las que se decoloran y se tifican 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 una frotis de cada una de las diferentes colonias que se desarrollan en los medios de cultivos selectivos, los cuales se dejaron secar al aire y fijaron a la llama del mechero; luego se procedió de la siguiente manera :

- a) El frotis fijado se cubrió con cristal violeta un minuto, se lavó luego con agua del chorro.
- b) Se cubrió con lugol un minuto, se escurrió y se lavó con agua de chorro (20)
- c) Se añadió alcohol acetona hasta que se 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 (21)

ANEXO 20. GLOSARIO

ABCESO: Una acumulación de pus en la ubre de tejido cicatrizado e inaccesible a las infusiones antibióticas.

ALVEOLO: Unidad productora de leche en la ubre de tamaño microscópico, compuesto por células epiteliales.

ANTICUERPO: Proteínas sintetizadas por los órganos inmunológicos que ayudan en la eliminación de sustancias extrañas, tales como microorganismos.

ANTITOXINAS: Anticuerpos que trabajan para neutralizar o inactivar toxinas.

ATROFIADO: (Cuarto): Cuarto de la ubre que es de menor tamaño debido a su habilidad reducida de producir leche. Generalmente como resultado de una mastitis.

BOMBA DE VACÍO: Bomba que evacua el aire del sistema de ordeño y produce un vacío parcial.

CANAL DE PEZÓN: Paso por el cual la leche fluye de la ubre. Está rodeado por un músculo lo esfinter que lo mantiene cerrado entre ordeño y ordeño.

CASEINA: La proteína encontrada en a leche

CASQUILLO: La pieza metálica o plástica que cubre la pezonera.

CÉLULAS EPITELIALES: Células en la ubre que forman el alvecio sintetizan y secretan la leche.

CÉLULAS SOMÁTICAS : incluye principalmente células blancas que se dirigen a la ubre durante una inflamación y un pequeño porcentaje de células epiteliales.

CFM : Pies cúbitos por minuto de aire femovido

CALIFORMES : Bacteria con forma lineal, que se origina en el tracto intestinal.

CORTICOSTEROIDES : Un grupo de hormonas esteroides , que son usadas como agentes anti-inflamatorio y para restringir la respuesta inmune.

DESPUNTE : Proceso por medio del cual los primeros chorros de leche se remueven de los pezones antes del ordeño, para observar anomalías y para evaluar canal del pezón.

EDEMA : (de la ubre) : Inflamación de la ubre o pezones causada por la acumulación de fluidos bajo la piel.

ESTAFILOCOCOS : Bacteria esférica que crecen forma de ramo de uvas.

ESTREPTOCOCOS : Bacteria esférica que crecen forma de cadenas.

FAGOCITOSIS : El proceso por el cual las células blancas absorben microorganismos .

FORMA -L : Forma de estado fisiológico de pared la bacteria en la que no tiene pared y es resistente a ciertas drogas.

HATO CERRADO : Un hato en el que no se permite el ingreso de animales comprados .

INFECCIÓN : La presencia de microorganismos en crecimiento en la ubre.

INFLAMACIÓN : La condición con la cual el cuerpo trata de eliminar o neutralizar microorganismos invasores y reparar el daño al tejido.

EVOLUCIÓN : El proceso por el cual el tejido de la ubre se revierte a un estado no productivo después del secado.

LIBRA : Unidad de peso 2.2 libras = 1 Kilo (Kg.)

LINEA DE LECHE : La tubería que cumple la doble función de transportar leche y arte.

LINEA DE PULSACIÓN : La tubería que suministra el vacío a los cuidadores.

LINEA PRINCIPAL DE VACÍO : Es la que va de la bomba a la trampa del receptor.

LINFOCITO : Clase de células blanca involucrada en la inmunidad de la ubre .

LIPASA ; Enzima en la leche que descompone la grasa y produce acidez.

LPM : Libros de aire por minuto de aire evacuado.

MACRÓFAGA : Una clase de célula blanca que absorbe y destruye microorganismos en la leche .

MASTITIS : Inflamación de la ubre, generalmente causada por microorganismos infecciosos.

MASTITIS AGUDA : Inflamación en la ubre caracterizada por su manifestación súbita . Enrojecimiento por su manifestación, endurecimiento, dolor , leche anormal y reducción de la producción.

MASTITIS CLINICA : Inflamación en la ubre caracterizada por anormalidades visibles en la ubre o en la leche.

MASTITIS CRÓNICA ; Inflamación en la ubre que continúa por un largo período de tiempo , con desarrollo progresivo de tejido cicatrizante y una reducción en la producción.

MASTITIS DE VERANO : Una forma de mastitis caracterizada por una secreción espesa y de mal olor (pus) generalmente causada por *Antinomyces pyogenes* y *feptococcus indolicus* .

MASTITIS PARAGUDA : Una forma de inflamación de la ubre con complicación del sistema que incluye depresión , pulso acelerado diarrea y deshidratación.

MASTITIS SUBAGUDA : Forma de inflamación en la ubre que es mediante clínica donde los síntomas incluyen gramas escamas en la leche.

MASTITIS SUBCLÍNICA : La forma más prevalente de infecciones de ubres. No se detecta visualmente y causa las más grandes pérdidas económicas .

MICROORGANISMOS: Organismo unicelular o multicelular que solo se puede ver con microscopio.

MYCOPLASMA : Microorganismo de tamaño intermedio entre la bacteria y el virus.

NEUTROFIA : Una clase de célula blanca que absorbe y destruye microorganismos en la leche.

OPSONIS : Anticuerpos que funcionan preparando a los microorganismos para ser absorbidos por las células blancas.

ORDEÑO MOJADO: El ordeñar con pezones que no han sido completamente secos.

OXITOCINA: Hormona que produce la bajada de la leche.

PEZONERA: Elemento de caucho o similar que está en contacto con el pezón y dentro del casquillo.

PREVALENCIA: (de mastitis): El porcentaje de vacas o cuartos que están infectado en un momento dado.

PROSTAGLANDINA: Grupo de drogas usadas para controlar inflamaciones y regular la temperatura del cuerpo.

PULSADOR: Componente del equipo de ordeño que varía el vacío (presión) entre la pezonera y el casquillo, permitiendo así la apertura y cerrado de la pezonera para cosechar la leche.

QUERATINA: Una sustancia cerosa producida por las células en el canal del pezón. Sirve como tapón entre ordeños y ayuda a la reducir la penetración de microorganismos.

RECUPERACIÓN ESPONTÁNEA: La habilidad de la vaca a curarse a sí misma de una infección sin la ayuda de drogas.

REGULADOS DE VACÍO: Elemento en el equipo de ordenó accionado por válvulas, resortes diafragmas que controla y mantiene un nivel establecido de vacío.

RELACIÓN DE PULSACIÓN: Relación de tiempo en que el pulsador admite vacío para abrir la pezonera y aire para cerrarla.

RESTABILAMIENTO DE PEZONERAS : Condición en la que la pezonera aire, produciendo un ruido característico, causado por mas diseño de la pezonera, peso de la unidad , fluctuaciones de vacío y ordeña pezones mojados.