

UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAMELICA

(Creada por Ley Nro. 25265)



FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA

TESIS

“PREVALENCIA DE MASTITIS SUBCLÍNICA, CAUSADA POR *Escherichia coli*, EN
VACAS DE DIFERENTES LACTACIONES, EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL
CALLQUI GRANDE HUANCAMELICA”

LINEA DE INVESTIGACIÓN

SANIDAD ANIMAL

DISCIPLINA

CIENCIAS VETERINARIAS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO ZOOTECNISTA

PRESENTADO POR:

Bach. HEGEL SIERRA MATOS

Bach. ROXANA CEDANO CONTRERAS

HUANCAMELICA – 2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAVELICA

FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En el Auditorium de la Facultad de Ciencias de Ingeniería, a los 20 días del mes de diciembre del año 2018, a horas 10:00 a.m, se reunieron los miembros del Jurado Calificador conformado por los siguientes: **Dr. Elmer Rene CHÁVEZ ARAUJO (PRESIDENTE)**, **M.Sc. Rufino PAUCAR CHANCA (SECRETARIO)**, **M.Sc. Héctor Marcelo GUILLEN DOMÍNGUEZ (VOCAL)**, designados con Resolución de Consejo de Facultad N° 077-2018-FCI-UNH, de fecha 27 de marzo del 2018 y ratificados con Resolución de Decano N° 180-2018-FCI-UNH de fecha 17 de diciembre del 2018, a fin de proceder con la calificación de la sustentación del informe final de tesis titulado: "PREVALENCIA DE MASTITIS SUBCLÍNICA, CAUSADA POR *Escherichia coli*, EN VACAS DE DIFERENTES LACTACIONES, EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL CALLQUI GRANDE HUANCAVELICA", presentado por los Bachilleres **Hegel SIERRA MATOS** y **Roxana CEDANO CONTRERAS**, para optar el **Título Profesional de Ingeniero Zootecnista**; en presencia del **Dr. Nicasio VALENCIA MAMANI**, como Asesor y el **M.Sc. Víctor Guillermo SÁNCHEZ ARAUJO** como Co-Asesor del presente trabajo de tesis. Finalizado la evaluación a horas 11:07 AM; se invitó al público presente y a los sustentantes abandonar el recinto. Luego de una amplia deliberación por parte de los Jurados, se llegó al siguiente resultado:

Hegel SIERRA MATOS

APROBADO POR MAYORIA

DESAPROBADO

Roxana CEDANO CONTRERAS

APROBADO POR MAYORIA

DESAPROBADO

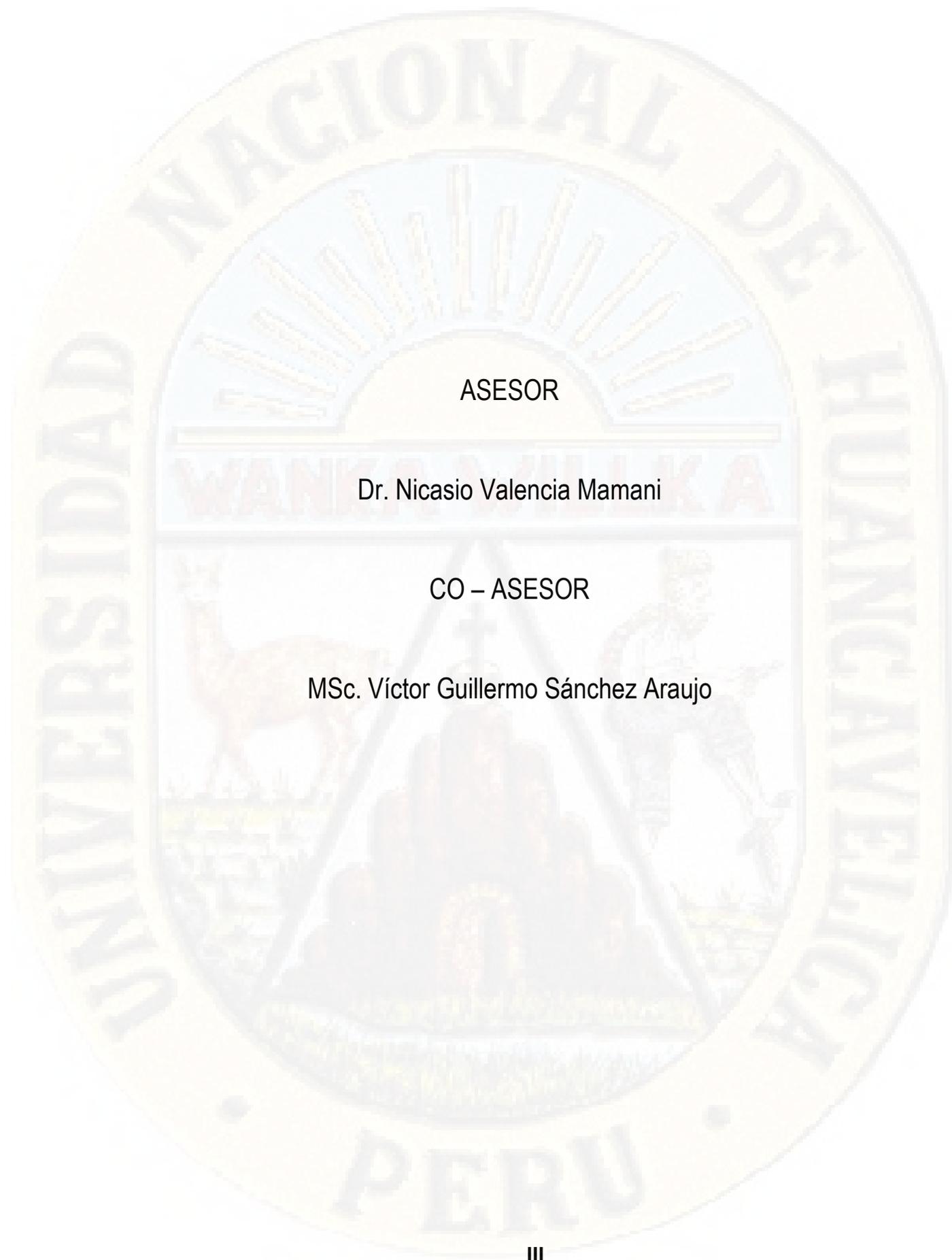
En señal de conformidad, firmamos a continuación:

Presidente

Secretario

Vocal

Vº Bº Decano

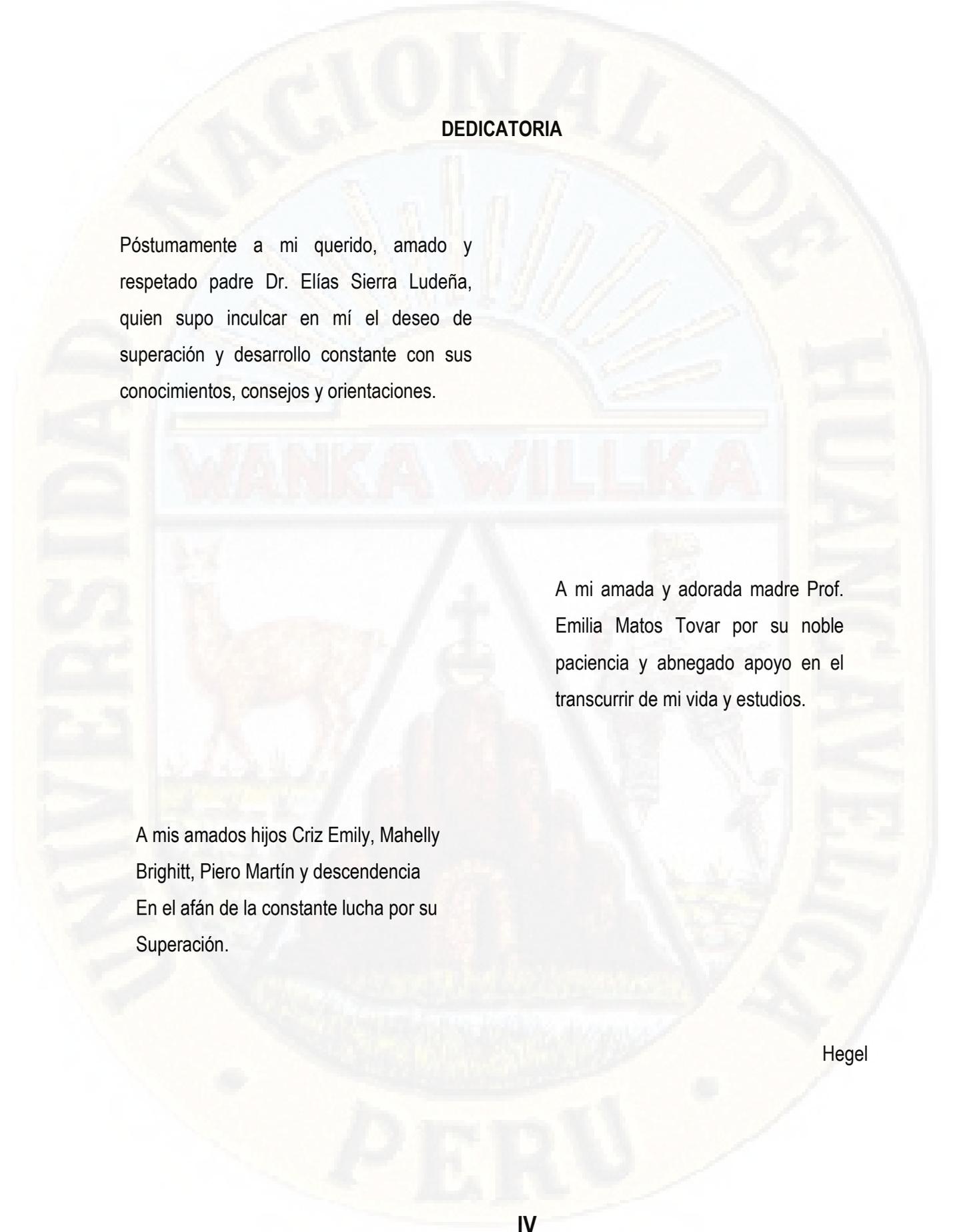


ASESOR

Dr. Nicasio Valencia Mamani

CO – ASESOR

MSc. Víctor Guillermo Sánchez Araujo



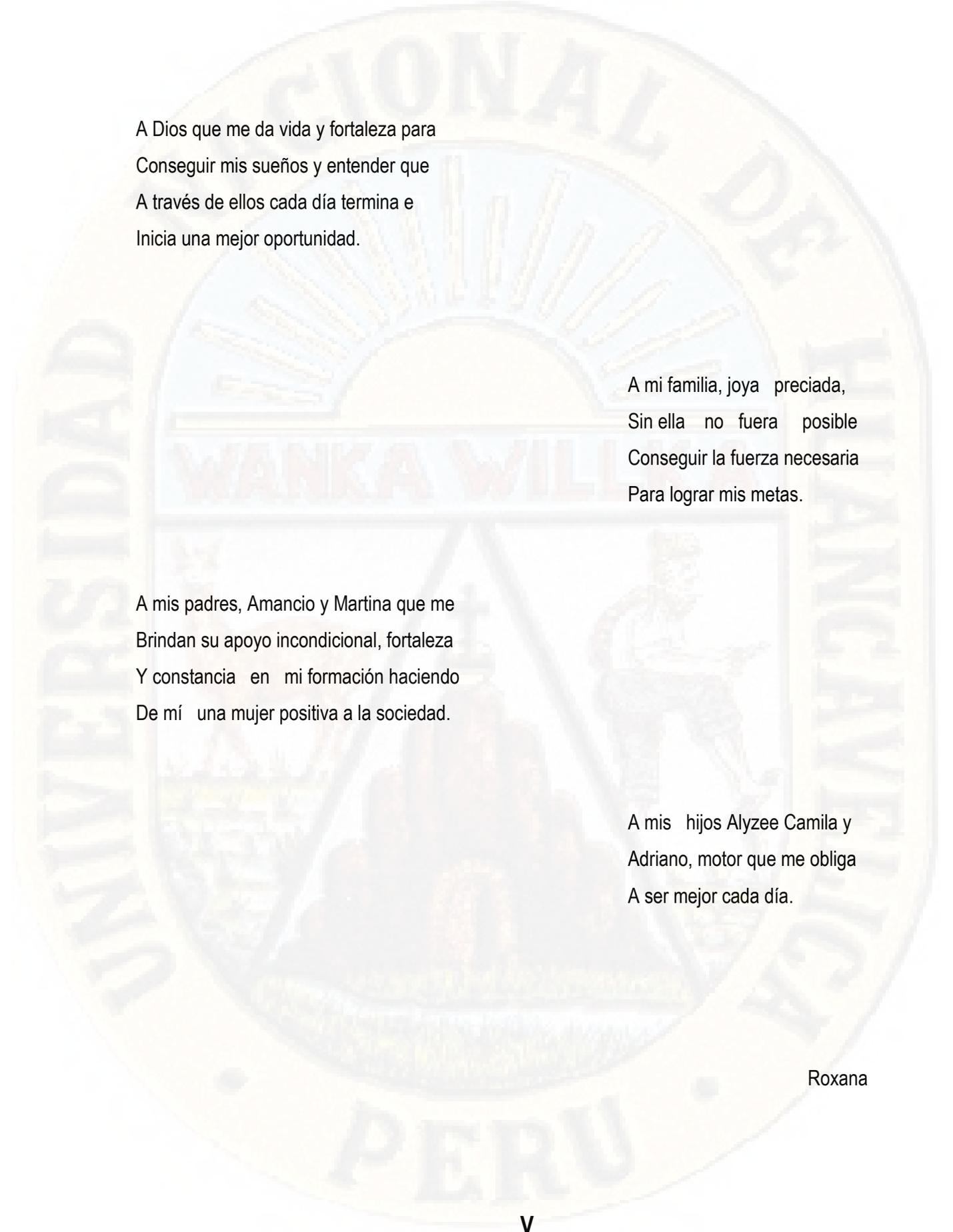
DEDICATORIA

Póstumamente a mi querido, amado y respetado padre Dr. Elías Sierra Ludeña, quien supo inculcar en mí el deseo de superación y desarrollo constante con sus conocimientos, consejos y orientaciones.

A mi amada y adorada madre Prof. Emilia Matos Tovar por su noble paciencia y abnegado apoyo en el transcurrir de mi vida y estudios.

A mis amados hijos Criz Emily, Mahelly Brighitt, Piero Martín y descendencia
En el afán de la constante lucha por su Superación.

Hegel



A Dios que me da vida y fortaleza para
Conseguir mis sueños y entender que
A través de ellos cada día termina e
Inicia una mejor oportunidad.

A mi familia, joya preciosa,
Sin ella no fuera posible
Conseguir la fuerza necesaria
Para lograr mis metas.

A mis padres, Amancio y Martina que me
Brindan su apoyo incondicional, fortaleza
Y constancia en mi formación haciendo
De mí una mujer positiva a la sociedad.

A mis hijos Alyzee Camila y
Adriano, motor que me obliga
A ser mejor cada día.

Roxana

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de mastitis subclínica causada por *Escherichia coli*, en vacas de diferentes lactaciones, para lo cual hemos utilizado una población de 20 vacas en producción, obteniendo 14 vacas positivas mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT), con prevalencia de mastitis subclínica, dando como resultado un 70% de prevalencia; luego realizamos la determinación de prevalencia de mastitis subclínica por etapas de lactación, sobre los 14 que dieron positivos habiendo obtenido una prevalencia mayor en las 1ra. Lactación en un 13%, 5ta. Lactación 14% y en la 6ta. Lactación un 13%, para determinar si las etapas de lactación influyen en la prevalencia de mastitis subclínica, utilizamos la prueba χ^2 de homogeneidad determinando que existe diferencia estadística ($p < 0.05$), lo que nos indica que influyen las etapas de lactación en la prevalencia de mastitis subclínica causada por *Escherichia coli*.

Concluyendo como resultado que las diferentes etapas de lactación influyen en la prevalencia de la mastitis subclínica y recomendando se efectúe más trabajos de investigación para *determinar* la prevalencia de mastitis subclínica causada por otras bacterias.

Palabras clave: mastitis subclínica, incidencia, prevalencia.

SUMMARY

The objective of the study was to determine the prevalence of subclinical mastitis caused by *Escherichia coli*, in cows of different lactations, for which we used a population of 20 cows in production, obtaining 14 positive cows by means of the California Mastitis Test (CMT), with prevalence of subclinical mastitis, resulting in a 70% prevalence; then we made the determination of prevalence of subclinical mastitis by stages of lactation, on the 14 that were positive having obtained a higher prevalence in the 1st. lactation by 13%, 5th. Lactation 14% and in the 6th. Lactation un13%., to determine if the stages of lactation influence the prevalence of sub-clinical mastitis, used the Ji^2 homogeneity test determining that if there statistical difference ($p < 0.05$), this indicates that if the stages of lactation influence the prevalence of subclinical mastitis caused by *Escherichia coli*.

Concluding as a result that the different stages of lactation they influence the prevalence of subclinical mastitis and recommending more research work to determine the prevalence of sub-clinical mastitis caused by other bacteria.

Key words: subclinical mastitis, incidence, prevalence.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros sinceros agradecimientos a las siguientes personas; quienes contribuyeron en forma desinteresada e incondicional, en el desarrollo de nuestro trabajo de investigación, con su apoyo, enseñanza y orientación.

Al Dr. Nicasio Valencia Mamani, docente nombrado en la Facultad de Ciencias de Ingeniería de la Universidad Nacional de Huancavelica, asesor de nuestra tesis quién dedicó parte de su tiempo guiándonos en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Ing. Marino Ártica Félix, quien nos apoyó en forma incondicional y adhonoren con su asesoría y orientación para que nuestro trabajo de investigación se concluya satisfactoriamente.

A los empleados del área administrativa, almacén y de sanidad animal del laboratorio central de la Universidad Nacional de Huancavelica; quienes nos brindaron en forma incondicional, desinteresada y amable su apoyo decidido, para la conclusión de nuestro trabajo de investigación.

Al Jefe, empleados administrativos y personal de planta de la Estación Experimental Agraria Callqui del Ministerio de Agricultura de Huancavelica, quienes nos brindaron las facilidades del caso para la obtención de nuestras muestras para el logro y consecución de nuestro trabajo de investigación.

Y al más grande, que omnipresente en todo puso fuerza, valor y tesón en nosotros para llegar a la feliz consecución de esta tesis, DIOS.

INDICE GENERAL

	Pág.
CARATULA	
ACTA DE SUSTENTACION	
ASESOR	
DEDICATORIA.....	IV
RESUMEN.....	VI
ASBTRAC.....	VII
AGRADECIMIENTO.....	VIII
INDICE GENERAL.....	IX
INDICE DE CUADROS.....	XII
INDICE DE TABLAS.....	XIII
INDICE DE FOTOGRAFIAS.....	XIV
INTRODUCCION.....	XV

CAPITULO I

PROBLEMA-

1.1.	Planteamiento del problema.....	1
1.2.	Formulación del problema.....	4
1.3.	Objetivo: General y Específicos.....	4
1.4.	Justificación.....	5

CAPÍTULO II

MARCO TEORICO

2.1.	Antecedentes.....	7
2.2.	Bases. teóricas.....	10
2.2.1.	Morfología de la glándula mamaria.....	10
2.2.2.	La ubre de la vaca y el conteo celular somático.....	11

2.2.3.	La leche.....	13
2.2.4.	Aspectos generales de la mastitis.....	16
2.2.5.	La <i>Escherichia coli</i>	25
2.2.6.	Transmisión y establecimiento de la enfermedad.....	28
2.2.7.	Impactos que genera esta enfermedad.....	29
2.2.8.	Diagnóstico de la mastitis subclínica.....	30
2.2.9.	Técnicas de identificación de <i>Escherichia coli</i> en laboratorio.....	35
2.2.10.	Vacunación contra mastitis.....	38
2.3.	Hipótesis.....	38
2.4.	Variables de estudio.....	38

CAPITULO III

METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

3.1.	Ambito de estudio.....	40
3.2.	Tipo de investigación.....	40
3.3.	Tivel de investigación.....	40
3.4.	Método de investigación.....	41
3.5.	Diseño de investigación.....	41
3.6.	Población, muestra, muestreo.....	42
3.7.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	42
3.8.	Procedimiento de recolección de datos.....	43
3.9.	Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	52

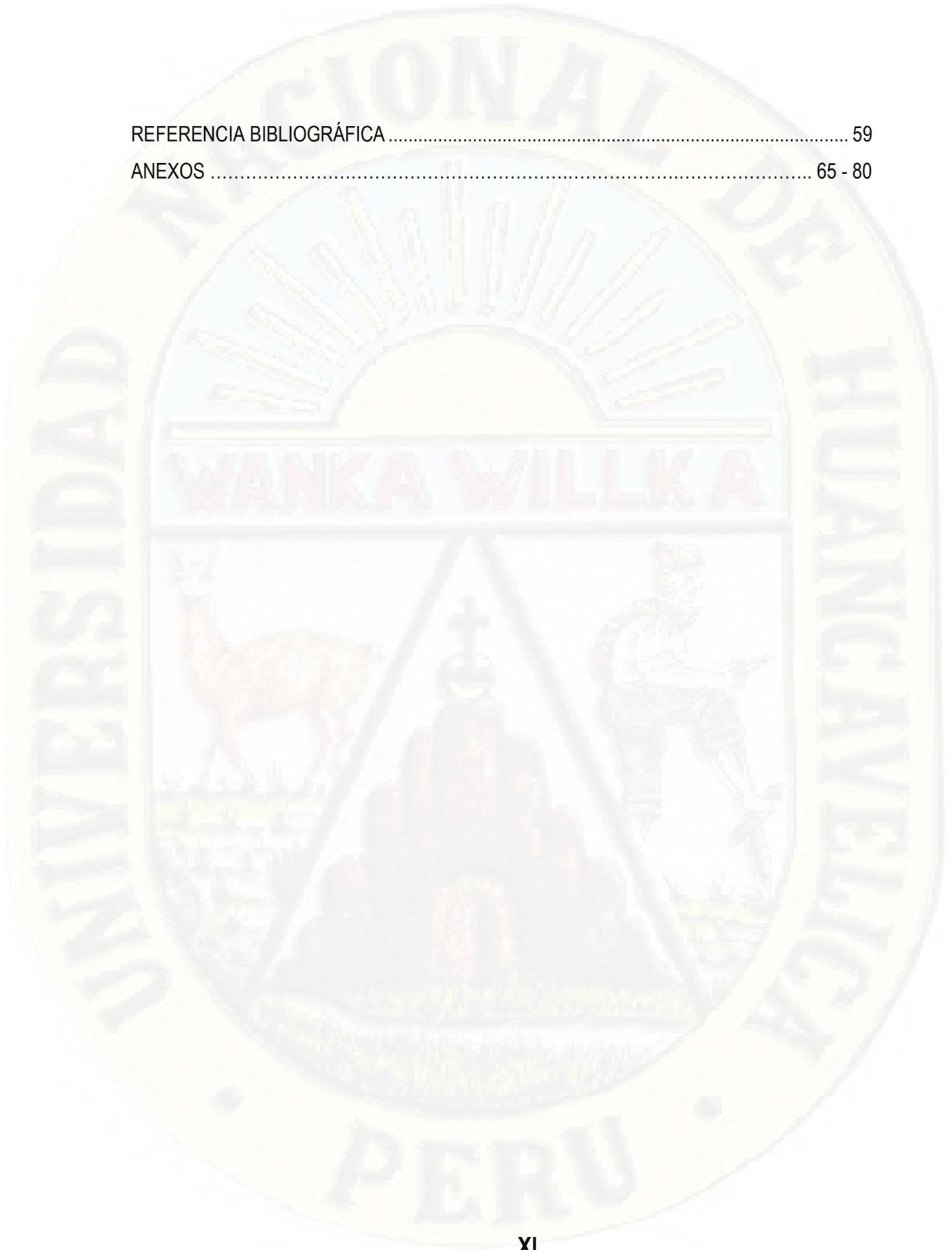
CAPITULO IV

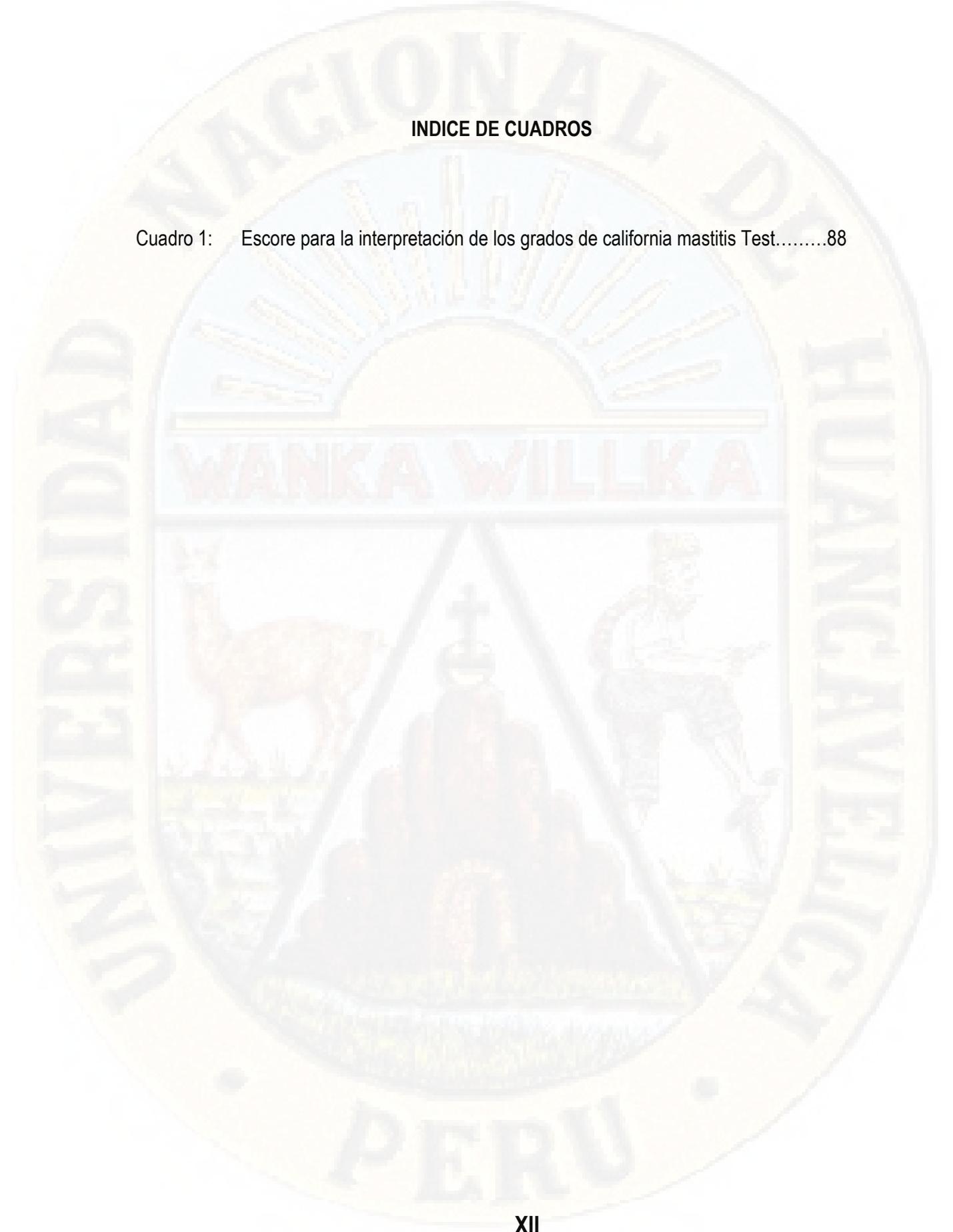
RESULTADOS

4.1.	Presentación de resultados.....	54
4.2.	Discusión.....	55
	CONCLUSIONES.....	60
	RECOMEDACIONES.....	58

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA 59

ANEXOS 65 - 80





INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Escore para la interpretación de los grados de califorma mastitis Test.....88

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Composición general de la leche en diferentes especies (por cada 100 gr).....	31
Tabla 2: Interpretación del Agar Hierro Tres Azucres (TSI).....	68
Tabla 3: Resultados de la prevalencia general de mastitis subclínica por unidad animal.....	70
Tabla 4: Resultados de la prevalencia de mastitis sub clínica por etapa de lactación en vacas que dieron positivo.....	70
Tabla 5: Resultados de la prevalencia de mastitis sub clínica en vacas que dieron Positivas por etapas de lactación.....	71
Tabla 6: Prueba de Ji^2 de homogeneidad para determinar si las etapas de lactación influyen en la prevalencia de mastitis sub clínica.....	71
Tabla 7: Lectura e interpretación de la coloración gram.....	83
Tabla 8: Resumen de la lectura de coloración gram.....	83
TABLA 9: Resultados obtenidos con medios diferenciales.....	84
TABLA 10: Estadística pecuaria sobre el número de cabezas de vacuno en la Región Huancavelica.....	86
TABLA 11: Estadística pecuaria sobre el número de cabezas existente en el distrito de Huancavelica.....	87

INDICE DE FOTOGRAFIAS

FOTO 01:	Letrero de la Estación Experimental Agraria “Callqui”	90
FOTO 02:	Vacas dispuestas para la obtención de muestras, previamente al inicio de ordeño.....	90
FOTO 03:	Obteniendo muestras de leche para evaluar mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT) in situ.....	91
FOTO 04:	Aplicando la solución CMT. a las muestras de leche para evaluarlos.....	91
FOTO 05:	Realizando el análisis de reacción de las muestras de leche.....	92
FOTO 06:	Resultados de la reacción de la leche a la aplicación de la solución del California Mastitis Test (CMT).....	92
FOTO 07:	Muestras obtenidas en los viales para su traslado al laboratorio de sanidad animal de la UNH.....	93
FOTO 08:	Soluciones bioquímicas para la realización de las pruebas en laboratorio.....	93
FOTO 09:	Algunos resultados de las colonias que se obtuvieron previamente como prueba.....	94
FOTO 10:	Resultados de colonias obtenidas mediante la prueba de Agar Macconkey; expuestas en forma general, para su evaluación.....	94
FOTO 11:	Resultados de colonias obtenidas con la prueba de Agar Macconkey de la vaca Nancy, en sus 4 flancos (ubre) expuesta como detalle regional.....	95
FOTO 12:	Medios bioquímicos listos para ser utilizados.....	95
FOTO 13:	Prueba bioquímica TSI. En tubos de ensayo.....	96
FOTO 14:	Prueba bioquímica LIA. En tubos de ensayo.....	96
FOTO 15:	Prueba bioquímica de Citrato de Simmons en tubos de ensayo.....	97
FOTO 16:	Prueba bioquímica del Medio SIM. en tubos de ensayo.....	98
FOTO17:	Protocolo para establecer las pruebas bioquímicas en el desarrollo de la investigación.....	98

FOTO 18:	Resultados de las pruebas bioquímicas expuestas en forma general para su respectiva interpretación.....	99
FOTO19:	Resultados obtenidos en forma regional (ubre) de la vaca Alicia con la prueba en medios bioquímicos.....	99
FOTO 20:	Resultados obtenidos de pezón anterior derecho de la vaca Epifania.....	100
FOTO 21:	Resultados obtenidos de pezón anterior derecho de la vaca Rufina.....	100
FOTO 22:	Equipo de investigación y asesor en pleno.....	101
FOTO 23:	Tesistas investigadores.....	101

INTRODUCCIÓN

La producción de leche es una actividad muy importante en el Perú, que permite a los productores obtener ingresos económicos para cubrir sus necesidades fundamentales; sin embargo, esta actividad muchas veces se ve afectada por una enfermedad prevalente conocida como mastitis subclínica cuya característica principal es no presentar signos visibles. Antecedentes de nivel internacional como las de Danilo (2006) en su tesis “Estudio Epidemiológico de la Prevalencia de Mastitis Sub Clínica En El Ganado Reina En La Finca Santa Rosa (UNA) En Época de Lluvia”, concluye; la mastitis subclínica es de curso apirético y sin trastornos generales, encontrándose inflamación interna de la glándula mamaria y se diagnostica solamente por la realización de pruebas secundarias como es el caso de la prueba de California. Así también Correa, Cerrón-Muñoz; Wellenberg *et al.*, (2002), explica; la mastitis es una enfermedad altamente prevaleciente en el ganado lechero, y es una de las enfermedades más importantes que afecta mundialmente la industria lechera; pues ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo debido a la disminución en el rendimiento de leche y un aumento en el número de tratamientos clínicos y desecho temprano de vacas, por lo que se ha reconocido, durante algún tiempo, como la enfermedad más costosa en los hatos lecheros.

De igual modo Ferreira, (1984) dice; la mastitis subclínica, no presenta síntomas exteriores que indican algunas anomalías, indica también que la leche no sufre una alteración visible. Es la manifestación más frecuente de mastitis (de 15 a 40 veces más común que la mastitis clínica) pero solo puede detectarse mediante la ayuda de pruebas especiales.

Luego en la tesis “Determinación de la Prevalencia e Incidencia de Mastitis Sub clínica en vacunos brown swiss del distrito de Chamaca - Chumbivilcas - Cusco”, explica; considerando las pesquisas realizadas, esta investigación se fundamenta teórica y científicamente, teniendo en cuenta la siguiente bibliografía. “La leche es un producto fisiológico de las glándulas mamarias posee un elevado contenido calórico y un equilibrio de nutrientes que satisface las necesidades de los recién nacidos durante su periodo crítico de desarrollo y permite un

crecimiento adecuado hasta que los mismos sean capaces de ingerir sus propios alimentos sólidos. (...). Señala que, estas sustancias nutritivas aportan a la dieta, algún nutriente en particular, pero ninguna la supera como alimento equilibrado en componentes para el ser vivo. Desde el punto de vista sanitario la leche, aun cuando reúne las condiciones organolépticas básicas, puede ser nociva al contener patógenos para el ser humano, toxinas de micro organismos. (...). La mastitis se define como una reacción inflamatoria de la glándula mamaria, la cual es caracterizada por alteraciones físicas y químicas de la leche representadas por el aumento del número de células somáticas de la leche y por alteraciones patológicas de la glándula mamaria. (...). Tiene una forma de presentación en la cual no hay signos visibles en la glándula, pero si una disminución en la producción de leche e incremento en el número de células somáticas, es de curso apirético y sin trastornos generales, encontrándose inflamación interna en la glándula mamaria y se diagnostica solamente por la realización de pruebas secundarias como es el caso de la prueba de California (Danilo, 2006)

Así mismo Stephen (1983) dice; se encontró una prevalencia de mastitis subclínica en 108 de 470 vacas (23%). Hubo infección en 478 de 1880 cuartos (25.3%), 286 cuartos anteriores (40%). La producción láctea actual era un promedio de 3.2 Kg. diario por vaca. La mastitis subclínica era responsable de una disminución de producción costando \$119.00 por vaca por mes o \$ 1190.00 por vaca durante una lactación de 300 días. Conclusión que demuestra que la prevalencia de mastitis sub clínica genera una baja en la producción de leche, la misma que genera pérdidas económicas para los productores que se dedican a esta actividad ganadera o agroindustrial.

Por ello la presente investigación tiene como objetivo general determinar la prevalencia de mastitis sub clínica causada por *Escherichia coli*, en vacas de diferentes lactaciones en la Estación Experimental Agraria "Callqui" de la Dirección Regional Agraria Huancavelica; ya que esta influye enormemente en los niveles de producción causando grandes pérdidas económicas.

Los Tesistas

CAPÍTULO I

PROBLEMA

1.1 Planteamiento del Problema

En el distrito de Huancavelica existen 5,440 vacunos entre productores de carne y leche que constituye el 2.20 % de la población regional que llega a 247,801 cabezas (Dirección de Información Agraria Huancavelica, 2015).

La producción de leche es una actividad económica importante en la Estación Experimental Agraria “Callqui”, de la Dirección Regional Agraria Huancavelica, que les permite obtener ingresos económicos para generar su auto sostenimiento y mantenimiento a nivel institucional (Dirección de Información Agraria Huancavelica, 2015). El tipo de producción empleada en la estación experimental es semi-intensivo o mixto no llegando a efectuar una producción técnicamente adecuada ya que a la fecha y habiendo observado insitu las técnicas de manejo que emplean es inadecuada y sin un control estricto en la limpieza, higiene y asepsia en el establo, aspecto que nos conlleva a pensar que podría existir un potencial riesgo de contaminación invisible de la leche que se produce en estas condiciones y muchas veces esta contaminación es ocasionada por la bacteria del *Escherichia coli*, que es una bacteria ambiental y además presente en la flora intestinal de los animales, en este caso las vacas y a través de sus heces pueden contaminar la leche, ya que luego de su alimentación tienden a recostarse sobre estas heces que pudieran estar contaminadas llegando a que los flancos mamarios se pongan en contacto con las zonas donde se encuentran las heces que pueden generar riesgos de contaminación de mastitis sub clínica, además hemos observado que el ordeño que realizan en la Estación Experimental Agraria “Callqui” es en forma manual habiendo notado que los operarios antes de iniciar con el ordeño no se lavan adecuadamente las manos, ni tampoco realizan la limpieza de las ubres con alcohol yodado y finalmente ni usan guantes otro aspecto que nos hace sospechar que pudiera haber contaminación de

la leche, al respecto mencionan que; “La leche que así se comercializa se obtiene bajo condiciones de higiene deficiente, a través de ordeña manual” (...), Estos aspectos pueden determinar una prevalencia de mastitis con tasas de incidencia elevadas que podrían impactar negativamente el volumen y calidad de leche que producen, la viabilidad de cuartos productivos, la tasa de segregación de vacas en producción, los costos de producción asociados al tratamiento de animales que padecen la enfermedad, e inclusive el inventario animal por la muerte asociada a cuadros de mastitis hiperaguda, o bien, por la eliminación temprana de vacas afectadas por procesos crónicos o agudos que terminaron en fibrosis de tejido glandular (Silva, 2007). Además, no hemos hallado información local, sobre trabajos de investigación referente a la prevalencia de mastitis subclínica en diferentes lactaciones que nos permitan tomar decisiones con respecto a la productividad y a la disminución económica en la producción de leche.

“La mastitis subclínica es de curso apirético y sin trastornos generales, encontrándose inflamación interna de la glándula mamaria y se diagnostica solamente por la realización de pruebas secundarias como es el caso de la prueba de California” (Danilo, 2006).

“Se dice que la mastitis es subclínica cuando no hay evidencia de inflamación; por ejemplo, recuento elevado de células sin anomalía visible de la leche o ubre” (Blood y Radostits, 1992).

Las mastitis subclínicas: No presenta signos y por lo general el animal, la ubre y la leche aparentan ser normales” (...) “Debido al elevado número de casos sub clínicos el diagnóstico de mastitis depende de pruebas indirectas basadas en recuento de leucocitos en la leche. (...). “De acuerdo a su epidemiología se clasifican en dos grupos: 1) Los microorganismos ambientales, 2) Los microorganismos contagiosos” (...). Los microorganismos ambientales viven en los alrededores de la vaca y acceden a la ubre en los intervalos entre los ordeños *Streptococcus no agalactiae*, *coliformes*, siendo estos los agentes responsables de infecciones intramamarias, siendo principalmente mastitis de

tipo clínico. La fuente de estos microorganismos es el entorno, por ejemplo; cama, estiércol, agua estancada, restos de comida y también las agujas y cánulas contaminadas de uso intramamarias (...). Los microorganismos contagiosos: La fuente es la ubre infectada, diseminándose a partir de esta hacia otras vacas. El lugar donde se produce el contagio es la sala de ordeño, este grupo incluye bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma sp* y *Corynebacterium bovis*, una característica común a los microorganismos contagiosos es la de colonizar y crecer en la piel de la ubre y dentro del canal del pezón. (Silva, 2007).

La, *Escherichia coli* es una bacteria que figura como una especie predominante entre la flora anaeróbica facultativa normal del intestino del hombre y animales, donde juega un rol importante en su fisiología. Sin embargo, dentro de la especie se encuentran cepas patógenas que causan distintos síndromes diarreicos. Se las ha clasificado en cinco categorías, de acuerdo a sus propiedades de virulencia, interacción con la mucosa intestinal, cuadro clínico, epidemiología y serotipos O: H; además Prado y O. Ryan (1994) explican, que el *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), *Escherichia coli* entero patogénica (ECEP), *Escherichia coli* entero hemorrágica (ECEH), *Escherichia coli* entero invasiva (ECEI) y *Escherichia. Coli* entero agregativa (ECEA). Actualmente se propone subdividir la categoría ECEA en *Escherichia coli* entero agregativa (ECEAgg) y *Escherichia. Coli* de adherencia difusa (ECAD) según su patrón de adherencia a la mucosa intestinal” y según Griffin y Tauxe, (1991) explican que “De todas las categorías, la única considerada como zoonosis es ECEH. (BORIE, et al., 199).

La mastitis coliforme se considera de distribución mundial y es más frecuente en vacunos lecheros que están estabulados durante los meses de invierno o mantenidos en estabulación total en lotes de secado. Aunque se ha descrito en vacuno lechero en pastoreo en Nueva Zelanda, esta enfermedad no es frecuente en ganado vacuno lechero que se mantiene en pastoreo (...). La mastitis coliforme subclínica se caracteriza por la existencia de microorganismos coliformes en muestras de leche de vaca sin datos

clínicos de mastitis. Hay un nivel de fondo de infección coliforme que varía de 0.9 a 1.2 por 100 en los cuarterones de la ubre (Blood y Radostits, 1992).

Castillo, *et al.*, (2009), la prevalencia general de mastitis subclínica estimada por el CMT (resultados positivos ≥ 2) fue de 36.2%, afectando negativamente la producción de leche de la zona de estudio. El índice de mastitis subclínica es de 1.81, lo cual indica un elevado conteo de células somáticas, como consecuencia de deficientes medidas sanitarias en los rebaños. Los resultados de análisis bacteriológicos, señalan presencia de colonias sospechosas de *Salmonella* y *S. aureus*, estas muestras deben ser sometidas a identificación definitiva de los patógenos involucrados con pruebas de alta especificidad, para poder emitir tratamientos y medidas específicas de control sanitario.

1.2 Formulación del problema

¿Cuál es la prevalencia de mastitis subclínica, causada por *Escherichia Coli*, en vacas de diferentes lactaciones, en la Estación Experimental Agraria “Callqui”, de la Dirección Regional Agraria Huancavelica?,

1.3 Objetivo: general y específicos

1.3.1. General

Determinar la prevalencia de mastitis subclínica causada por *Escherichia Coli*, en vacas de diferentes lactaciones, en la Estación Experimental Agraria “Callqui”, de la Dirección Regional Agraria Huancavelica.

1.3.2. Específicos

1. Determinar la prevalencia de mastitis sub clínica causada por *Escherichia coli*, en 1ra., 2da.,4ta.,5ta. Y 6ta. etapas de lactación en vacas de la Estación Experimental Agraria “Callqui”, de la Dirección Regional Agraria Huancavelica.
2. Determinar si las etapas de lactación influyen o no en la prevalencia de la mastitis subclínica

1.4 Justificación

La crianza de vacas productoras de leche es una actividad muy importante en la actividad pecuaria, que permite a los productores obtener ganancias económicas muy rentables, y a la población que la consume le permite aprovechar los valores nutritivos que la leche como alimento posee; siendo estas calorías, proteínas, grasa, carbohidratos, agua, vitaminas A, B1, C; es un alimento nutritivo no superado por ningún otro alimento consumido por los seres humanos, cuyas características de calidad son; limpia, de color blanco, con un sabor dulce característico, el olor lo adquiere del envase en que se almacena.

La mastitis subclínica es una enfermedad que no presenta cambios visibles en la leche o ubre de la vaca, apenas se percibe una reducción en el rendimiento de la producción de leche, siendo alterada su composición por la presencia de componentes inflamatorios y bacterias *Escherichia coli*. En la práctica los casos de mastitis subclínica no son detectadas rápidamente e incluso no son reconocidos por el ordeñador.

La mastitis se presenta en todos los mamíferos con mayor importancia en las explotaciones ganaderas bovinas, por las grandes pérdidas económicas que genera, se caracteriza por un incremento en el número de células somáticas de la leche y por la

destrucción del tejido glandular mamario, provocando descenso brusco en la producción de leche (Danilo, 2006).

Pero el principal problema sanitario en el sector lo constituye la mastitis subclínica, siendo está ocasionada por el *Escherichia coli* u otros microorganismos, ocasionando disminución en la producción láctea y en la calidad de la leche y como consecuencia de esto existan pérdidas económicas considerables para el productor y el peligro de transmitir enfermedades a la población que consuma esta leche infectada.

Además, no hemos encontrado trabajos realizados anteriormente sobre prevalencia de mastitis subclínica causada por *Escherichia coli*, en vacas de diferentes lactaciones, ni información alguna que podamos tomar como base para contrastar con nuestro trabajo de investigación; en la Estación Experimental Agraria “Callqui”, de la Dirección Regional Agraria Huancavelica, realizando nosotros mismos nuestra base de datos, utilizando la prueba de California Mastitis Test (CMT) para determinar la presencia de mastitis subclínica y análisis en laboratorio para detectar la bacteria *Escherichia coli*, considerando que la ejecución del presente trabajo de investigación es nueva en la Estación Experimental Agraria “Callqui”, de la Dirección Regional de Agricultura Huancavelica; que nos permitió determinar el bajo índice de prevalencia de mastitis subclínica causada por bacterias de *Escherichia coli*, en las vacas productoras de leche de la estación experimental, permitiéndonos recomendar, un adecuado plan de manejo, ordeño y obtención de leche de calidad; enmarcándose el proyecto dentro de las políticas de sanidad del Ministerio de Agricultura y el Servicio Nacional de Sanidad Agraria.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Silva, (2007), concluye que, más del 80% de los establos del sistema familiar de Cotzío y Tejaro, Michoacán, tienen en el periodo de un mes al menos un caso de mastitis clínica. Este comportamiento se potencializa por la tasa de reincidencia de los casos clínicos y la proporción de los casos de mastitis subclínica que evolucionan en casos de mastitis clínica. Sin embargo; se observan diferencias en la prevalencia de punto durante el periodo de estudio, lo cual confirma la presencia de factores estacionales que deben ser evaluados para la identificación de factores de riesgo específicos.

Muñoz, Hernández Andrade, Arrieta, Camacho y Hernández Valenzuela, (2012) concluyen; la prevalencia de mastitis subclínica, en vacas de doble propósito en Márquela, Guerrero, es alta y la principal bacteria asociada a esta enfermedad es *Staphylococcus aureus* y en menor medida, *Staphylococcus coagulasa negativa*, bacilos gram negativos y gram positivos. Estos microorganismos afectan principalmente a los grupos genéticos $\frac{3}{4}$ suizo y cebú.

Ruiz, *et al.*, (2011), indica en su conclusión, “los rebaños de ordeño mecánico tuvieron mayor prevalencia de mastitis subclínica, tanto en el diagnóstico por California Mastitis Test (C.M.T.) como para Conteo de Células Somáticas (C.C.S.) y cultivo bacteriológico”.

También Danilo, (2006), concluye, la prevalencia de mastitis en el hato fue de un 41%, de esto un 35% mastitis subclínica, un 5.1% de mastitis clínica y un 59% negativo. Los cuartos anteriores presentaron mayor prevalencia de mastitis con un 49.30% y el más afectado fue el anterior derecho (AD) con el 24.82%, ya que la probabilidad de infestación

de cada cuarto está influenciada por los efectos del número de partos y periodos de lactación, que interactúa con los cuartos.

Stephen, (1983), concluye, se encontró una prevalencia de mastitis subclínica en 108 de 470 vacas (23%). Hubo infección en 478 de 1880 cuartos (25.3%), 286 cuartos anteriores (40%). La producción láctea actual era un promedio de 3.2 Kg. diario por vaca. La mastitis subclínica era responsable de una disminución de producción costando \$119.00 por vaca por mes o \$ 1190.00 por vaca durante una lactación de 300 días.

Guisar, Ignacio, Bedolla y Carlos, (2008), en sus conclusiones y discusiones indican que, en base a los resultados obtenidos del estudio realizado en el período de investigación sobre la mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán., se determinó una prevalencia de 43.14%, la cual resulta baja en comparación con un estudio realizado por Armenteros, et al. (2002), En 4 zonas de la región occidental y central de Cuba, los cuales encontraron un porcentaje general de 76.5% de mastitis subclínica, de acuerdo a la prueba de California, considerando los cuartos positivos a partir de 200 000 células/ml. Resultados que se corresponden con lo encontrado por Philpot y Nickerson (1993), los cuales reportan una relación de correspondencia de 70% de afectación por conteo celular, con aproximadamente un 40% de cuartos infectados. En este mismo estudio, Armenteros, *et al.*, (2002) reportan una prevalencia de mastitis clínica general de 3.02%, la cual resulta más elevada a lo reportado en este estudio que es de un 2.02%. Sin embargo, la prevalencia de mastitis subclínica encontrada en este estudio resulta elevada en comparación con un estudio realizado también en tres vaquerías en Cuba por Alfonso, *et al.*, (2008), los cuales encontraron una prevalencia de mastitis subclínica promedio de 23,6% en los rebaños estudiados lo que se traduce en grandes pérdidas económicas por la cantidad de leche que se deja de producir.

Sin embargo, se encuentra por debajo de lo encontrado por Galeana, *et al.*, (2008). En un estudio realizado en el Municipio de Pátzcuaro Michoacán, en ocho rebaños de 10

vacas en promedio cada uno, los cuales reportan una prevalencia de mastitis subclínica de 83.52%. Asimismo, se encuentra por debajo de lo encontrado por Méndez (2005), en un estudio realizado en la cuenca lechera Morelia - Queriéndolo, el cual obtuvo una prevalencia de mastitis subclínica de 49.58%, en donde el 90% de las unidades de producción se encontraban ubicadas en la zona urbana anexa a la vivienda, con una fuerza de trabajo familiar, una alimentación del ganado a base de rastrojo de maíz, avena, alfalfa, granos y concentrados y con una producción diaria de leche de 12 litros y por lactancia de 3,697.

Así mismo Cepero, *et al.*, (S.f), Concluye, Existe una correlación positiva entre la California Mastitis Test (C.M.T.) en relación con las pruebas de conductividad eléctrica, pH y sales. No se evidencio existencia de correlación entre la California Mastitis Test (C.M.T.) y potencial redox ni tampoco entre los valores de pH y potencial redox. Se determinó correlación entre los valores de conductividad eléctrica y las sales.

Velásquez, y Vega, (2012), concluyen que, el recuento promedio de las células somáticas en tanques de leche de establos y de asociaciones de ganaderos de la provincia de Huaura es elevado y está por encima del límite máximo permitido por las normas técnicas de calidad del país. La frecuencia de mastitis subclínica fue mayor en establos grandes, en vacas con más de dos partos y en la etapa de lactancia.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1. Morfología de la glándula mamaria

La glándula mamaria de la vaca consiste de cuatro glándulas separadas, localizadas en la región ventral o inferior de la vaca. Cada glándula tiene una teta y cada teta un orificio. La piel de las glándulas está cubierta de pelo a excepción de las tetas. Las mitades derecha e izquierda están separadas

completamente, externamente esto está indicado por un surco que se observa en la región inferior de la glándula. Los cuartos traseros, aportan del 55 al 60% de la leche producida, y son el 55 al 60% del peso de la glándula y son usualmente más cortas que los cuartos delanteros. Las tetas o papilas mamarias. La función de las tetas, es únicamente para la secreción y único medio del becerro para recibir la leche. Usualmente sólo una teta drena a una glándula. Las tetas de la vaca, usualmente no tienen pelo, glándulas sebáceas o sudoríparas. El tamaño y forma es independiente del tamaño y forma o producción de leche de la glándula. El promedio de tamaño para las tetas anteriores es de cerca de 6.6. cm. de largo y 2.9 cm. de diámetro, y para las tetas posteriores es de 5.2 cm. de largo y 2.6 cm. de diámetro. (Cervantes, Hernández, Bonilla, Martínez y Lamothe, s.f.).

2.2.2. La ubre de la vaca y el conteo celular somático

Para abordar el tema referente al conteo celular somático (CCS) es necesario revisar algunos conceptos generales sobre la glándula mamaria de las vacas. En principio recordar que la leche se forma en las células del epitelio que recubren los alvéolos de la ubre y que en la vaca existen, en realidad, cuatro glándulas independientes que conocemos como “cuartos, (anterior derecho, anterior izquierdo, posterior derecho y posterior izquierdo), que no tienen en común más que la piel que los envuelve, razón por la que existen infecciones en la ubre que pueden estar localizadas en un solo cuarto. La ubre se encuentra suspendida mediante ligamentos carentes de elasticidad, lo que impide que la deformación de la glándula sea irreversible, cuando se llevan a cabo prácticas indeseables durante el ordeño. La ubre se encuentra fuertemente irrigada por dos vastas redes capilares, alimentadas por las arterias, lo que explica que por ella circulen aproximadamente 400 litros de sangre por cada litro de leche: Este enorme aporte sanguíneo hace que la ubre sea un órgano “limpiador”, de tal manera que

por esta vía se eliminan diversas sustancias, incluyendo bacterias. La migración de los leucocitos de los cuartos a la leche es un hecho fisiológico natural, no obstante, el número de células que pasan, en condiciones normales, es reducido. La presencia de numerosos leucocitos, sobre todo polimorfo nucleares, tiene un significado patológico o de enfermedad. En la ubre de una vaca se encuentran, específicamente en la leche, dos tipos de células: a) los glóbulos blancos; y b) células secretoras de leche (células epiteliales). Las células somáticas son células del cuerpo, esto quiere decir que son parte natural de la vaca. El contenido celular somático está compuesto principalmente de glóbulos blancos, por lo que es importante saber que existen diferentes tipos de células somáticas presentes en la leche de una ubre sana, en primer lugar, están los macrófagos (60%), en segundo término, los linfocitos (25%) y en tercer lugar los neutrófilos o leucocitos neutrófilos polimorfo nucleares (15%). Las células somáticas tienen dos funciones principales en la ubre, la primera es la de combatir a los microorganismos infectantes mediante un proceso llamado fagocitosis que los envuelve y destruye y, la segunda, es la de intervenir en la reparación del tejido secretor que ha sido dañado por una infección o lesión. Es por ello que el CCS es la medida más usada para evaluar el estado de salud de la ubre y puede ser medida en leche que proviene de un cuarto, de una vaca, de un hato; También, el CCS es un procedimiento común sobre todo en la industria láctea para medir la calidad de la leche cruda. Cuando el conteo celular somático resulta elevado, ya sea de una vaca o del tanque enfriador, nos indica que hay un problema en la salud de la ubre, generalmente se trata de mastitis. El CCS es un fenómeno biológico dinámico, sujeto a una gran variación debido a múltiples factores, entre los cuales se pueden señalar a la Mastitis como el principal causante que provoca incremento de leucocitos. Cuando los microorganismos entran en la ubre, los mecanismos de defensa envían grandes cantidades de leucocitos a la ubre para intentar destruir las bacterias; Si la infección es eliminada el recuento de células vuelve a su normalidad. Si los

leucocitos no pueden destruir los organismos se crea una infección subclínica y esto va originar un conteo elevado de células somáticas. Un segundo factor que contribuye en el aumento del CCS son las lesiones en la ubre, ya que atrae a los leucocitos a la zona de daño. Hay que recordar que una lesión en la ubre obedece, en la mayoría de los casos a diseños deficientes en las instalaciones y en el equipo de ordeño, otras veces se debe al accidente entre una vaca y otra, pero la mayoría de las veces el hombre es el principal responsable de las lesiones en la ubre. (Álvarez, S.f).

2.2.3. La leche

- **Concepto**

La leche es el producto de la secreción normal de la glándula mamaria de animales bovinos sanos, obtenida por uno o varios ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos. Por otro lado, desde el punto de vista dietético la leche es el alimento puro más próximo a la perfección. Su principal proteína, la caseína, contiene los aminoácidos esenciales y como fuente de calcio, fósforo y riboflavina (vitamina B12), contribuye significativamente a los requerimientos de vitamina A y B1 (tiamina). Por otra parte, los lípidos y la lactosa constituyen un importante aporte energético. Químicamente, la leche es uno de los fluidos más completos que existen. El término “sólidos totales” se usa ampliamente para indicar todos los componentes con exclusión del agua y el de “sólidos no grasos” cuando se excluye el agua y la grasa. El agua representa aproximadamente entre un 82% y un 82.5% de la leche, los sólidos totales alcanzan habitualmente la cifra de 12% hasta un 13% y los sólidos no grasos casi siempre están muy próximos al 9 %. La definición física, señala que la leche es un líquido de color blanco opalescente característico. Este color se

debe a la refracción que sufren los rayos luminosos que inciden en ella al chocar con los coloidales en suspensión. (Agudelo y Bedoya, 2005).

- **Fisiología de la producción de leche por parte de la glándula mamaria**

Explican que “La leche es producida por los alvéolos dentro del tejido mamario. Cerca del 60% de la leche se acumula en esta zona y el resto en los vasos galactóforos mayores y en la cisterna de la ubre”. (Pinzón, 2007).

- **Composición de la leche**

Menciona que La leche es un producto fisiológico de las glándulas mamarias posee un elevado contenido calórico y un equilibrio de nutrientes que satisface las necesidades de los recién nacidos durante su periodo crítico de desarrollo y permite un crecimiento adecuado hasta que los mismos sean capaces de ingerir sus propios alimentos sólidos. (...). Que estas sustancias nutritivas aportan a la dieta, algún nutriente en particular, pero ninguna la supera como alimento equilibrado en componentes para el ser vivo. Desde el punto de vista sanitario la leche, aun cuando reúne las condiciones organolépticas básicas, puede ser nociva al contener patógenos para el ser humano, toxinas de micro organismos. (Citado en Danilo, 2006).

“El valor nutritivo de la leche y de cualquier otro alimento de la dieta humana y animal está determinado por la composición y calidad de sus constituyentes”. (Citado en Danilo, 2006).

- **Composición nutricional de la leche**

La leche es una compleja mezcla de distintas sustancias, presentes en suspensión o emulsión y otras en forma de solución verdadera y presenta sustancias definidas: agua grasa, proteína, lactosa, vitaminas, minerales; a las cuales se les denomina extracto seco o sólidos totales varían por múltiples factores como lo son: la raza, el tipo de alimentación, el medio ambiente y el estado sanitario de la vaca entre otros. (Agudelo y Bedoya, 2005).

Tabla 1

Composición general de la leche en diferentes especies (por cada 100 gr).

Nutriente (gr.)	Vaca	Búfala	Mujer
Agua	88	84	87.5
Energía (Kcal)	61	97	7.0
Proteína	3.2	3.7	1.0
Grasa	3.4	6.9	4.4
Lactosa	4.7	5.2	6.9
Minerales	0.72	0.79	0.20

(Agudelo y Bedoya, 2005, p. 39.).

- **Propiedades físico químicas de la leche**

Tiene un sabor medio dulce debido, a su alto contenido de lactosa; el sabor de la leche al final de la lactancia es ligeramente salado debido al aumento de cloruros. También la leche puede absorber el sabor de los alimentos, del medio ambiente, del equipo y utensilios usados o generados a partir de la misma leche, mientras que en el Olor: La leche recién ordeñada tiene un ligero olor al medio

ambiente donde se obtiene, pero este aroma desaparece y respecto al Color: La leche es un líquido blanquecino, ligeramente amarillo y opaco el color se debe principalmente, a la dispersión de la luz por las micelas de fosfocaseinato de calcio. Los glóbulos grasos dispersan la luz, pero contribuyen muy poco al color blanco. El caroteno y la riboflavina son los responsables del color amarillo de la leche de algunas razas de vacas o especie animal. En cuanto a la Viscosidad: La viscosidad de la leche está dada por el grado de resistencia al fluir o sea que es el coeficiente entre las moléculas. La viscosidad aumenta con la temperatura, el incremento del contenido graso, el proceso de homogenización, fermentación ácida y el envejecimiento o maduración, mientras que el Calor específico: El calor específico de la leche varía según la temperatura en la que se encuentre; ejemplo: leche con 0°C, Contiene un calor específico de 0.92 15°C es de 0.94 de 40°C es de 0.93. El calor específico es necesario para determinar la cantidad de energía requerida al enfriar o calentar la leche de una temperatura a otra y el Punto de congelación: La leche se congela a 0.54°C en promedio, pero puede variar entre 0.53 – 0.57°C, en casos extremos puede llegar a 0.50 – 0.1°C. El punto de congelación se utiliza para detectar adulteración con agua; ya que la adición de esta aproxima a 0°C el punto de congelación y su Punto de ebullición: La leche hierve a 100.17°C, a nivel del mar, debido a las sustancias solubles que posee la Reacción química: La leche normal se comporta como un compuesto anfótero. Lo que significa que puede comportarse como base y como ácido. El pH de la leche normal es de 6.5 y 6.7; la leche con un pH 6.8 o mayor se consideran proveniente de una ubre con mastitis, si la leche tiene un pH de 6.4 o menor es posible que contenga calostro o que esté ácida por la acción microbiana. (Danilo, 2006).

2.2.4. Aspectos generales de la mastitis

- **Definición**

Mastitis (del griego *mastos* - glándula mamaria y del sufijo *ltis* – inflamación) se define como la inflamación de la glándula mamaria que generalmente se presenta como una respuesta a la invasión de organismos patógenos y se caracteriza por daños en el epitelio glandular, seguido por una inflamación clínica o subclínica, pudiendo presentarse con cambios patológicos localizados o generalizados, dependiendo de la magnitud del daño (...) La mastitis se define como una reacción inflamatoria de la glándula mamaria, la cual es caracterizada por alteraciones físicas y químicas de la leche representadas por el aumento del número de células somáticas de la leche y por alteraciones patológicas de la glándula mamaria. (Danilo, 2006).

- **Tipos de mastitis**

La mastitis se clasifica en mastitis *clínica*, *subclínica* para un mejor estudio según Etgen y Reaves, (1989) e infección latente, según el grado de inflamación, la inflamación de la glándula mamaria se caracteriza por los signos cardinales de esta, los cuales son tumor, rubor, dolor y calor. (Danilo, 2006).

- **Mastitis clínica:**

“En algunos casos la inflamación de los cuartos mamarios es acompañada de signos clínicos (signos pronunciados de inflamación mamaria y de enfermedad sistémica), por lo que es diagnosticada entonces como mastitis clínica” (...). Expresan que, se caracteriza por la tumefacción o dolor

en la ubre, enrojecimiento, la leche presenta una apariencia anormal y, en algunos casos, hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además, las bacterias están presentes en la leche, el rendimiento es muy reducido, y su contenido está alterado considerablemente. (Guisar, 2008).

- **Mastitis subclínica:**

Tiene una forma de presentación en la cual no hay signos visibles en la glándula, pero si una disminución en la producción de leche e incremento en el número de células somáticas, es de curso apirético y sin trastornos generales, encontrándose inflamación interna en la glándula mamaria y se diagnostica solamente por la realización de pruebas secundarias como es el caso de la prueba de California. (Danilo, 200).

“La infección latente es una forma de presentación de la mastitis subclínica en la cual se presenta en la leche el aislamiento de microorganismos considerados tradicionalmente patógenos para la glándula mamaria”. (Danilo, 2006).

- **Clasificación de los microorganismos causantes de la mastitis bovina.**

En la glándula mamaria bovina se han identificado hasta 140 especies, subespecies y cero variedades microbianas. Las técnicas microbiológicas han permitido la determinación precisa de la identidad de muchos microorganismos patógenos de la mastitis. Tomando como base la epidemiología y la fisiopatología, se han clasificado estos microorganismos como causantes de la mastitis contagiosa o ambiental, en base a su asociación epidemiológica con la

enfermedad y a su proclividad de causar la infección oportunista, persistente o transeúnte, respectivamente. (...)“Las bacterias responsables de la mastitis bovina pueden ser clasificadas como contagiosas y ambientales, dependiendo de su reservorio primario y el ambiente contra el cuarto de la glándula mamaria infectada”. (Guisar, 2008)

- **Microorganismos causantes de la mastitis contagiosa.**

Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp.*, y al *Mycoplasma spp.* (...). Son organismos transmitidos de vaca a vaca a través de los paños utilizados para limpiar las ubres, la leche residual en las pezoneras y un equipo de ordeño inadecuado donde el reservorio primario que alberga los patógenos es el animal infectado o el cuarto de la ubre. (...) y la exposición de los cuartos mamarios no infectados se restringe al proceso de la ordeña.(...).Los patógenos contagiosos de la mastitis como el *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* que son infecciosos a nivel individual y a nivel de población, han sido reportados bajo control en los hatos lecheros a través del uso de prácticas de manejo que utilizan la desinfección de las tetas después de la ordeña, terapia de la vaca seca, desecho, mantenimiento del equipo de ordeño, y terapia antibiótica de las infecciones intramamarias.(...). A pesar de que la mastitis por organismos contagiosos (especialmente *Streptococcus agalactiae*) ha disminuido por mejoramiento en el manejo, las pérdidas económicas debido a la enfermedad pueden continuar porque los organismos causales no pueden ser erradicados del medio ambiente de las vacas lecheras. (...). En general, un programa de control de la mastitis concienzudo puede erradicar a *Streptococcus agalactiae* de la mayoría de los rebaños lecheros. Es mucho más difícil tratar los rebaños en los que *Staphylococcus aureus* tiene una prevalencia alta, (Guisar, 2008).

- **Microorganismos causantes de la mastitis ambiental.**

“Los patógenos principales en este grupo son los bacilos entéricos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, y *Enterococcus spp.* (Guisar, 2008).

Otros microorganismos patógenos se incluyen en la clase ambiental de este tipo de infecciones. Se trata generalmente de oportunistas que invaden la glándula mamaria cuando los mecanismos de defensa están disminuidos o cuando se introducen inadvertidamente en la glándula mamaria al realizar un tratamiento intramamarias. Este grupo de microorganismos oportunistas incluyen a *Pseudomona spp.*, levaduras, *Prototheca spp.*, *Serratia marcescens* y *Nocardia spp.* Cada uno de estos agentes posee características de cultivo, mecanismos patógenos y consecuencias clínicas singulares. (Guisar, 2008).

La fuente de estos agentes patógenos es el entorno de la vaca. La forma de transmisión principal es del ambiente a la vaca a través de un manejo inadecuado del primero. Algunos ejemplos incluyen la cama húmeda, terrenos sucios, ubres mojadas por la leche, preparación inadecuada de la ubre y los pezones antes del ordeño y sistemas de estabulación que favorecen las lesiones en los pezones. (...). Y la exposición de los cuartos no infectados a los patógenos ambientales que puede ocurrir en cualquier momento durante la vida de una vaca. (...). Estas infecciones generalmente ocurren de forma esporádica. Sin embargo, se pueden producir brotes en los rebaños o en una región entera, normalmente como consecuencia de problemas con la higiene o el tratamiento. Por ejemplo, se ha producido mastitis causada por *Pseudomona a eruginosa* en brotes relacionados con la contaminación de las conducciones de goma en las salas de ordeño. (...). La mastitis ocasionada por

patógenos ambientales es el principal problema que afecta a muchos hatos lecheros bien manejados, que aplican un programa de control de los patógenos contagiosos de la mastitis. (...). Debido a que en la actualidad estos patógenos no han sido bien controlados por los métodos arriba mencionados, ahora están surgiendo como la causa más frecuente de mastitis en muchos hatos, particularmente bien manejados, hatos con bajo conteo de células somáticas (<200,000 cs/ml). (...). Tradicionalmente, los agentes más comunes causantes de la mastitis también han sido clasificados como patógenos principales (mayores) y menores según el grado de inflamación que estos producen en la glándula mamaria.(...). Los patógenos principales son definidos como los patógenos responsables, la mayoría de las veces, de las mastitis clínicas o de fuertes respuestas inflamatorias (conteos elevados de células somáticas en la leche) y comprenden al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* (*S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*) y coliformes.(...). Los patógenos menores son definidos como los patógenos que infectan la glándula mamaria, causando conteos moderados de células somáticas, pero en lo general no causan signos clínicos. Estas infecciones, son especialmente frecuentes, debidas sobre todo a otros *Staphylococcus* (principalmente *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. epidermidis*, y *S. xylosus*) o por *Corynebacterium bovis* y *Micrococcaceae* coagulasa-negativos. (...). (Guisar, 2008).

- **Importancia**

La mastitis es una enfermedad de mayor impacto económico para la actividad lechera, siendo la mastitis sub clínica, la cual pasa fácilmente desapercibida para el productor, la causante de la mayor parte de las pérdidas. Alrededor del 70% de las pérdidas atribuibles a mastitis están dadas por la disminución en la producción de leche, el resto se debe a descarte de leche por anomalías notorias o residuos de antibióticos, gastos en cuanto a la

magnitud de la disminución en la producción de leche, se ha encontrado asociación entre esta y la severidad de la mastitis, describiéndose pérdidas que van desde 2,8% a 45% por cuarto/día, según el grado de reacción al Test de California para la mastitis (CMT). De esta misma forma, se han estimado pérdidas de 2,5% en producción de leche por vaca, por cada 100,000 cél/ml. Sobre un nivel de 200,000 cél/ml. (...). Debido a los cambios físico-químicos, las leches mastíticas tienen una menor estabilidad, se enrancian con mayor facilidad, se dificulta la elaboración de productos fermentados, se afecta el rendimiento, tiempo y costos de elaboración de quesos, resultando también afectada la palatabilidad y el valor nutricional de la leche pasteurizada. Económicamente algunos investigadores han reportado que las vacas eliminadas, a causa de mastitis varían anualmente desde 1.3 hasta 25%. En un estudio realizado en un hato del Altiplano de México con 500 animales en ordeño, se determinó que el costo anual por mastitis clínica fue de \$244,797, que equivale a la producción por lactancia (305 días) de 43 vacas con 6,000 Kg. (Danilo, 2006).

- **Factores de riesgo en el desarrollo de la mastitis**

Son fenómenos de naturaleza físicos, químicos, orgánicos, psicológicos o sociales, en el genotipo o en el fenotipo, o alguna enfermedad anterior al efecto que se está estudiando, que por la variabilidad de su presencia o de su ausencia está relacionada con la enfermedad investigada, o puede ser la causa de su aparición. Cuando un factor es conocido como tal, se llama causa, cuando se sospecha que este evento puede tener alguna relación con el evento, se llama factor de riesgo o factor de exposición. Cuando el factor de riesgo deja el nivel de sospecha de que se produce el efecto y se comprueba efectivamente su acción en la producción del mismo, dicho factor pasa a ser causal, (Silva, 2007).

- **Algunos factores considerados entre los más importantes son los siguientes:**

Edad

“A mayor edad existe mayor predisposición, debido a una menor tendencia de curación en las alteraciones de pezones, el canal del pezón se va alterando con la edad, facilitando la entrada a microorganismos, (Silva, 2007).

Lesiones en el pezón

Las lesiones o llagas que pueden llegar a sufrir un animal en lactación, pueden ser traumáticas resultado de un mal manejo, cortaduras, infecciosas causadas por colonización bacteriana o viral en los pezones, químicas debidas a daños ocasionados por la solución para lavar ubres, o los productos de sellado de los pezones que se formulan o se mezclan de forma indebida, ambientales por problemas que resultan del congelamiento de los pezones en el invierno, genéticas estas son por defectos en el pezón o callosidades (Silva, 2007).

Etapas de lactancia

“Se ha registrado mayor susceptibilidad en la primera y última semana de la lactancia, así como, en la primera semana del secado o periodo en que el animal no produce leche (Silva, 2007).

Estación del año

“Una observación común en los informes mensuales en hatos lecheros es que aumenta la incidencia de mastitis clínica en los meses cálidos, debido al estrés derivado de las altas temperaturas (Silva, 2007).

Genéticos

Es un hecho que algunas vacas presentan una mayor susceptibilidad a la mastitis que otras, los factores estructurales del canal del pezón son importantes en la regulación de la entrada de microorganismos. Algunos autores afirman que, si el tono de las estructuras anatómicas de la apertura del pezón es reducido lo que es un carácter heredable, la resistencia a la entrada de los microorganismos será menor y seleccionando genéticamente vacas con diámetro pequeño del canal del pezón, la frecuencia de mastitis disminuirá, (Danilo, 2006).

Nutricionales

“La alimentación actual de la vaca lechera está destinada a mantener un alto nivel de producción; esto constituye un factor de tensión fisiológico que puede provocar mastitis clínica en vacas con antecedentes de infecciones o mastitis subclínica”. (Danilo, 2006).

Higiene durante el ordeño

Los procedimientos de higiene durante el ordeño como, lavado de la ubre y pezones con agua potable, desinfectantes, secado con toallas desechables antes de cada ordeño con especial atención en el interior de las pezoneras

mediante la aplicación de chorro de agua y desinfección y sellado de los pezones con material que haya mostrado capacidad para bloquear el crecimiento y desarrollo microbiano, previenen la transmisión de microorganismos entre vacas y disminuye la población microbiana sobre la piel del pezón (Danilo, 2006).

Algunos rasgos anatómicos pueden predisponer a las vacas para infecciones de organismos productores de mastitis. Una vaca con una ubre pendiente es muy probable que experimente lesiones mecánicas que pueden causar daño en el tejido e incrementar las probabilidades de infección. Esto incluye pisoteo de los pezones, cortes y hematomas. Virtualmente todas las mastitis son causadas inicialmente por microorganismos que entran el canal del pezón. Por lo tanto, las barreras físicas del pezón son la primera defensa contra mastitis. (Salazar, 2001).

2.2.5. La *Escherichia coli*

La "*Escherichia coli* se describió por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich. Fue nombrada inicialmente como "*Bacterium coli commune*", pero en 1919 fue renombrada con el nombre actual en honor a su descubridor". (Romeu, 2012).

Los representantes de esta especie son bacilos gramnegativos, oxidasa negativos, con un tamaño promedio de 1,1 – 1,5 μm de ancho y 2,0-6.0 μm de largo. De acuerdo a sus requerimientos de oxígeno son anaerobios facultativos y pueden ser móviles por la presencia de flagelos peritricos o no móviles. (Romeu, 2012).

Desde el punto de vista taxonómico su clasificación es la siguiente:

Phylum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>Escherichia coli</i> “. (Romeu, 2012).

- **Ciclo de vida de la *Escherichia coli***

Un ciclo celular es una secuencia de crecimiento de cada célula individual y su división celular; comienza con la formación de una nueva célula se divide en otras dos hijas esta mantiene cuatro fases definidas Fase de latencia (Fase de adaptación de las células a las nuevas), Fase de crecimiento exponencial (Fase en la que en la que las células se están dividiendo regularmente a ritmo constante), Fase estacionaria (El nº de células no se incrementa, el nº de células que se originan es igual al nº de las que mueren) y fase de muerte celular (las células mueren a una velocidad mayor a la que se originan); en condiciones óptimas *E. Coli* tiene un ciclo de vida de 15 – 20 minutos. (De la Cruz, 2012).

- **Etiología de la mastitis subclínica asociada a *Escherichia coli***

E. coli aislado de la leche de vaca con mastitis aguda no puede distinguirse como un grupo patógeno específico, en base al test de reacciones bioquímicas y serológicas. En un estudio, de 290 *E. coli* aislados, había sesenta y tres serogrupos O, lo que indica que la mastitis coliforme no está causada por un número limitado de cepas patógenas específicas. La incidencia de la resistencia

a los antibióticos fue también baja, posiblemente, debido a que estos microorganismos son oportunistas procedentes del tracto alimentario, en el cual es muy raro encontrar *E. coli* resistentes a los antibióticos en el adulto. (Blood y Radostits, 1992).

- **Patogenia de la mastitis subclínica asociada a *Escherichia coli*.**

Después de haber invadido e infectado la glándula mamaria, *E. coli* prolifera abundantemente y elabora una endotoxina potente, que provoca cambios en la permeabilidad vascular, Esto origina edema e inflamación aguda de la glándula y un gran aumento de los neutrófilos de la leche. Los leucocitos polimorfo nucleares pueden aumentar de 40 a 250 veces e inhibir fuertemente la supervivencia de *E. coli*. Esta acentuada diapédesis de neutrófilos explica la importante leucopenia y neutropenia que se observa en la mitad de la mastitis coliforme sobreaguda. La gravedad de la enfermedad esta favorecida por el grado de leucocitos previos en la leche y la cantidad de neutrófilos que invaden la glándula afectada, como un intento de controlar el crecimiento de los microorganismos y la susceptibilidad a las bactericidas séricas secretadas hacia la glándula, así como la cantidad de endotoxina producida. La cinética de neutrófilos en casos naturales se ha reproducido experimentalmente. La gravedad de la enfermedad puede depender también de la fase de la lactación. La infección experimental de la glándula mamaria de vacas recién paridas con *E. Coli*, produce una mastitis más grave comparada con la que se produce en animales en la fase media de la lactación. Esto quizás se deba al retraso de entre 10 y 12 horas en la diapédesis de neutrófilos hacia la glándula mamaria en vacas recién paridas. Además, debido a este retraso pueden no existir cambios no visibles en la leche durante incluso 15 horas después de la infección, pero los efectos sistémicos de la endotoxina liberada por la bacteria son evidentes en la vaca (anorexia, fiebre y diarrea grave). El resultado neto es una endotoxemia,

que posiblemente persiste mientras los microorganismos se multipliquen y liberen endotoxemia. Esta endotoxina persistente puede ser una causa importante de la falta de respuesta al tratamiento, en comparación con la endotoxemia transitoria en la inoculación experimental de una dosis de endotoxina. (Blood y Radostits, 1992).

2.2.6. Transmisión y establecimiento de la enfermedad

En un intento por controlar los diferentes tipos de infecciones, es importante considerar la fuente y formas de transmisión de la enfermedad, los organismos que causan la mastitis viven en diferentes ambientes (materia fecal, cama, piel). La limpieza general de las vacas y su alojamiento, como también buenos procedimientos de manejo (especialmente ordeño) son formas efectivas de controlar la difusión de la mastitis. (Danilo, 2006).

Algunas bacterias pueden avanzar dentro de la ubre atacando y colonizando nuevos tejidos, otras pueden moverse por medio de la corriente de leche producida por el movimiento de la vaca, las bacterias dañan primero los tejidos que recubren los grandes tubos colectores de leche. Las bacterias pueden enfrentarse con leucocitos (células blancas de la leche) presentes naturalmente en bajas cantidades en la leche. Estas células son la segunda barrera de defensa debido a que pueden englobar y destruirá las bacterias. Aun así, durante este proceso, los leucocitos liberan sustancias que atraen a más leucocitos desde el torrente circulatorio hacia la leche. (Danilo, 2006).

Si las bacterias no son totalmente destruidas, pueden continuar multiplicándose y comenzar a invadir los pequeños ductos y áreas alveolares. Las células secretoras de leche que son dañadas por las toxinas, liberan

sustancias que conducen a un incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Leucocitos adicionales se mueven al lugar de la infección ellos penetran al tejido alveolar en gran medida moviéndose entre el tejido secretor de leche dañado. Fluidos. Minerales y factores de coagulación también se mueven dentro del área infectada. La leche coagulada también puede cerrar conductos y en efecto, aislar las regiones infectadas. (Danilo, 2006).

2.2.7. Impactos que genera esta enfermedad

- **En la calidad de leche**

Investigaciones realizadas, han descubierto que la leche en crudo, que tiene un alto porcentaje de células somáticas, influye directamente en la calidad de los derivados de la misma, produciendo un queso que en textura y sabor es de inferior calidad; los niveles altos de ácidos grasos libres encontrados en leches con recuentos celulares tan bajos con 400,000 células/ml dan a la leche un sabor rancio. La leche pasteurizada que es procesada de leche cruda con un conteo de células somáticas más bajo que 250,000, tiene un promedio de vida de almacenamiento más largo que la que es procesada teniendo un conteo superior a 500,000 (Danilo, 2006).

- **En lo económico**

La mastitis representa el 26% del costo total de todas las enfermedades en el ganado lechero, las pérdidas por mastitis son el doble de altas que las pérdidas por infertilidad y problemas de reproducción, un cuarto glandular afectado experimenta un 30% de baja en su productividad y una vaca afectada pierde un 15% de su productividad". Confirman que del 70 al 80% de todas las pérdidas

son asociadas con la mastitis subclínica mientras que solo del 20% al 30% se deben a la mastitis clínica. Se estima que un cuarto infectado produce aproximadamente 780 litros menos de leche por lactancia que un cuarto sin infección. Conteo de células somáticas debajo de 250,000 leucocitos/ml son indicadores de ausencia de inflamación a pesar de que la mayor parte de cuartos normales presenta conteos inferiores a 100,000 leucocitos/ml de leche. La mayoría de los hatos estudiados en Estados Unidos tienen un nivel de células somáticas entre 200,000 y 500,000 células por mililitro. Estos hatos están perdiendo por lo menos 8% en producción potencial de leche. Las pérdidas con conteo de células de 400,000 están perdiendo 586 litros de leche por vaca adulta por año". "Las pérdidas son aún mayores cuando el conteo es más alto (Danilo, 2006).

2.2.8. Diagnóstico de la mastitis subclínica

Las vacas afectadas con mastitis clínica muestran una marcada declinación en la producción láctea, signos cardinales de la inflamación y cambios macroscópicos en la composición de la leche, no requiriendo de pruebas complementarias para el diagnóstico. En la mastitis subclínica, por el contrario, no se observan alteraciones macroscópicas de la leche, pero se reduce la producción y se altera la composición química de la misma. La inflamación debería ser analizada haciendo un seguimiento de diversos mediadores del proceso. Sin embargo, estos compuestos son inestables y su análisis requiere técnicas sofisticadas de laboratorio. Por este motivo, las pruebas de rutina sólo detectan los cambios secundarios que tienen lugar en la composición de la leche. (Calvino, S.f).

El diagnóstico de Inflamación Intra Mamaria (IIM) se puede hacer por métodos directos o indirectos. El primero es el aislamiento del agente causal.

Para ello se toman muestras de leche en forma aséptica sobre las cuales se practican análisis bacteriológicos. Para el segundo existen varias técnicas, incluyendo la medición de variables tales como el número de células somáticas, concentración de lactosa, albúmina sérica, N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAGasa), anti tripsina, enzimas, aumento de la conductividad eléctrica, y presencia de antígenos bacterianos. (Calvino, S.f).

- **Recuento de células somáticas.**

En el caso del diagnóstico de mastitis subclínica a nivel de rodeo, el método más utilizado es el recuento electrónico de células somáticas en leche Recuento de Células Somáticas (RCS). El RCS es un indicador general de la salud de la ubre, ya que el factor más importante responsable de altos RCS en leche individual de vacas es la IIM por patógenos de mastitis. Existe correlación entre el número de vacas con cuartos infectados en un rodeo y el valor del RCS en leche de tanque. Aunque el RCS es un índice confiable para medir la salud de la ubre en un rodeo particular, la evaluación de un sólo resultado puede llevar a una conclusión equivocada. Para evitar errores se deben promediar varios resultados y obtener la media geométrica de los mismos. En general, un promedio inferior a las 200.000 células/ml en la leche total del tambo indica bajo nivel de IIM en el rodeo, mientras que por encima de las 500.000 cél. /ml., se considera un rodeo problema. (Calvino, s.f.).

Las Células Somáticas (CS) se cuentan normalmente en leche a granel o en leche proveniente de los cuatro cuartos de la vaca. El RCS en leche de vaca y de tanque es utilizado como una herramienta diagnóstica y de seguimiento de los progresos en el control de mastitis. Además, el RCS en leche de tanque es utilizado para determinar la calidad sanitaria de la leche cruda y es generalmente incluido dentro de los parámetros que definen el pago de la leche. (Calvino, s.f.).

Para determinar el número de células somáticas en la leche existen métodos "directos", que son aquellos que cuentan partículas o células y los "indirectos", que estiman la cantidad de células sobre la base de reacciones que ponen en evidencia componentes celulares. Tradicionalmente, la interpretación de los RCS se ha basado en el número total de células presentes, incluyendo células epiteliales y glóbulos blancos. En la leche de una glándula mamaria sana, se considera que el 10 al 20% está compuesto por células epiteliales. El aumento del número de CS está sujeto a distintos factores independientes de la infección. Sin embargo, la mayor influencia en el contenido individual de células de un animal la ejerce la inflamación. Las células presentes en un cuarto sano son fundamentalmente macrófagos, mientras que durante la inflamación se produce un aumento en la proporción de leucocitos polimorfo nucleares neutrófilos. En casos de mastitis, más del 90% de las CS pertenecen a esta serie de células blancas. ¿Cuál es el número de células que se considera normal? Antes de considerar un valor como normal, se debe tener en cuenta que existen diferencias entre los valores de RCS de leche de vaca y de tanque. Cuando la leche de los cuartos afectados es mezclada con la leche de los cuartos normales, el RCS de la vaca y del rodeo tenderá a aumentar. Paralelamente, el contenido de células de la leche de tanque puede reflejar la dilución de leches con contenidos de CS variables. Existe acuerdo general en que un elevado recuento de CS en leche de tanque está asociado a una prevalencia alta de mastitis en el rodeo. Sin embargo, la correlación con el aislamiento bacteriano, considerado como método de diagnóstico directo, es pobre. Esto es debido a que existen variables que influyen sobre el contenido celular de la leche normal y anormal y a que los patógenos de mastitis presentan distintos patrones de eliminación en la leche de vacas infectadas. Si bien los coeficientes de correlación entre RCS y presencia de IIM están en el orden de 0,5 a 0,6, la prevalencia de cuartos infectados dentro de un rodeo es el factor más determinante en el RCS del mismo. Por eso, está generalmente aceptado que

cuanto mayor es el recuento individual, mayor será el problema de mastitis. (Calvino, s.f.).

- **Cultivo bacteriológico de la leche**

El cultivo de muestras de leche es un método típico de examen para descubrir mastitis. Debe efectuarse con muestras diferentes de cada cuarterón o de muestras conjuntas que incluyan leche de los cuatro cuarterones individuales, pues los costos de tratamiento requieren que se trate el menor número posible de cuarterones en cada ubre. Al usar la primera técnica, se tratan solo los cuarterones afectados y, si es bajo el índice de infección, el ahorro podría ser considerable. En los programas de control de mastitis, los costos del cultivo bacteriológico en el laboratorio pueden reducirse mucho si sometemos primero a las vacas a una prueba indirecta, para luego practicar cultivo en los animales positivos. A menos que sea necesaria la identificación bacteriológica o haya cambiado la frecuencia o cuadro clínico, este estudio puede ser el primer examen del rebaño y puede lograrse un ahorro adicional estudiando pequeños grupos representativos del total del rebaño...El cultivo de muestras de leche procedente de cuarterones que se ha tratado recientemente, trae el inconveniente de que se eliminan bacterias importantes. Sin embargo, el muestreo debe retrasarse hasta al menos 12 horas después del tratamiento, en caso contrario las muestras son en su mayoría positivas en el cultivo (53). (Blood y Radostits, 1992).

Los cultivos en laboratorio son necesarios para identificar los organismos específicos que se encuentran comprendidos en un caso clínico de mastitis y para distinguir los animales sanos de aquellos que presentan un caso subclínico. LA fidelidad de los resultados de laboratorio depende de los cuidados

sanitarios que se tengan durante la toma de muestras y su manipulación posterior. (Almeida, 2015).

- **Otros métodos indirectos.**

Una prueba de uso extensivo es el Test de mastitis de California, conocida generalmente por su sigla en inglés "CMT" (California Mastitis Test). Esta prueba mide en forma indirecta la cantidad de células somáticas suspendidas en la leche del cuarto mamario. Es muy práctica para utilizar al pie de la vaca, aunque la interpretación de los resultados tiene cierto grado de subjetividad. (Calvino, s.f.).

- **La prueba california mastitis test**

“Entre otras pruebas empleadas para explorar por inspección mediata el contenido de células somáticas en la leche se tiene: la prueba de California para Mastitis (CMT)”. (...). (Ávila y Gutiérrez, 2010).

En la infección de la glándula mamaria, de los vasos localizados en el área afectada, escapan leucocitos y es por lo general esta respuesta celular proporcional a la severidad de la infección. No obstante, en algunas infecciones latentes o subclínicas pueden o no aparecer leucocitos en la leche, menciona que las cuentas de células somáticas mayores a 500 000/mL., indican mastitis sub clínica. (Ávila y Gutiérrez, 2013).

“La Prueba de California para Mastitis (CMT, por sus siglas en inglés) ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de

campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino. (Bedolla, Castañeda y Wolter, 2007).

Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar groseramente el recuento de células de la leche. No proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso. (Bedolla, Castañeda y Wolter, 200).

2.2.9. Técnicas de identificación de *Escherichia coli* en laboratorio

- **Medio de cultivo**

“Son fuentes nutritivas, naturales o sintéticas que se asemejan al nicho ecológico de los microorganismos en el cual se desarrollan; estas necesidades nutricionales se han determinado mediante extensas investigaciones”. (De la Cruz, 2012).

- **Cultivo en placas**

“La técnica más utilizada es la siembra por estría en placa Petri esto permite obtener colonias separadas”. (Dela Cruz, 201).

- **Cultivo en tubos**

“Para repartir los medios de cultivo en tubos el operador debe sentarse cómodamente, colocando los tubos al lado izquierdo y el medio a repartir al lado derecho”. (Dela Cruz, 2012).

- **Medio selectivo:**

- Agar Mac conkey

- Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas. Todas las especies de la familia Enterobacteriaceae desarrollan en el mismo; el medio preparado es de color rojo purpura; los inhibidores no permiten el desarrollo de otras bacterias especialmente de las gram positivas. Las bacterias degradan la lactosa, haciendo variar el pH, y el indicador es el cambio de color, la *Escherichia coli* es una de las especies bacterianas, capaz de fermentar la lactosa”. Así mismo, Jawetz, *et al.*, 2005) explica “específicamente forman colonias lisas, circulares, convexas, con bordes bien diferenciados; fermenta la lactosa. (Dela Cruz, 201).

- **Medios diferenciales:**

- Agar citrato de Simmons

- “Medio para la diferenciación de entero bacterias basadas en la, utilización del citrato como única fuente de carbono”. (Dela Cruz, 2012, p. 20.)

- Agar Hierro Tres Azucares (TSI)

- Los cultivos típicos de *E. coli* en 1⁰⁰⁰⁰⁰⁰agar TSI presentan el bisel amarillo, sin oscurecimiento y con formación de gas; este medio se emplea para detectar la fermentación de la lactosa, sacarosa y glucosa, con formación de ácido y gas y, también para detectar la producción de ácido sulfhídrico, (Dela Cruz, 2012).

Agar Lisina Hierro (LIA)

“Medio diferencial para la detección de entero bacterias, basada en la descarboxilación de la lisina (anaerobias), formación de sulfuro de hidrógeno y producción de gas”, (Dela Cruz, 201).

Medio para Sulfuro, Indol y Movilidad (SIM)

“Se usa en la determinación de la producción de sulfuro de hidrógeno, la formación de Indol y la movilidad de miembros de los grupos de Salmonella y Shigella”. (Lecciones de microbiología y medios de cultivo, 1995).

- **Tinción gram**

Una posible teoría del mecanismo de tinción es la siguiente: El colorante básico entra al microorganismo, donde forma con el yodo una laca insoluble en agua. El alcohol o la acetona empleados para aclarar, deshidrata las paredes de los microorganismos Gram. Positivos, tratados con mordiente, y forma una barrera que la laca no puede atravesar. En las células Gram. Negativas, los lípidos de la pared (más abundantes que en las células Gram. positivas) se disuelven por este tratamiento, lo que permite el escape del complejo de violeta de genciana con yodo. Algunos autores objetan esta teoría, pero es indudable la importancia general de la pared celular. (Acuña y Rivadeneira, 2008).

Varias son las teorías emitidas para explicar el mecanismo de la tinción de Gram, basan la suya en una combinación química entre el colorante y las proteínas de las bacterias. Las proteínas y aminoácidos son cuerpos anfóteros, esto es, tienen la facultad de reaccionar con ácidos y con bases, gracias a sus

grupos amino y carboxilo; en soluciones ácidas, reaccionan con los ácidos, y en soluciones alcalinas lo hacen con las bases. (Acuña y Rivadeneira, 2008).

Elaborada por Hans Gram en 1884, es la más empleada en bacteriología, permite diferenciar a las bacterias en:

- Bacterias Gram positivas

Toman el colorante violeta de genciana, tiñéndose de azul violáceo.

- Bacterias Gramnegativos

Pierden el violeta de genciana al ser lavados con el diferenciador (alcohol-acetona). Es necesario imprimir un colorante de contraste (fucsina o safranina), para ser observadas, tiñéndose de rojo.

Cuando las bacterias se tiñen con el complejo colorante básico-mordiente, este queda atrapado en las bacterias Gram positivas y no puede ser arrastrado por el decolorante a causa de la naturaleza y físico-química de su pared. Por el contrario, en los gramnegativos es arrastrado debido a su alto contenido lipídico. (Lecciones de microbiología y medios de cultivo, (1995).

2.2.10. Vacunación contra mastitis

Las vacunas desarrolladas contra la mastitis no han tenido mucho éxito en el pasado. Hace varias décadas se elaboró un toxoide a base de *Staphylococcus aureus* para inmunizar las vacas contra mastitis causadas por este germen, pero lamentablemente tuvo poco éxito. Hasta hace poco, la única vacuna que ha demostrado un éxito razonable ha sido la J-5 (basado en una mutante de *E.*

Coli) en el control de mastitis aguda causada por coliformes (E. coli, Klebsiella, Enterobacter y Serratia), con un 70 a 80% de reducción en la casuística clínica, siguiendo un programa de 3 vacunaciones: (60 y 30 días antes del parto, y al parto). La mutante J-5 posee algunos carbohidratos que pueden causar algunos efectos indeseables en los animales vacunados. (Andresen, 2001).

2.3 Hipótesis

Ho = La prevalencia de mastitis subclínica no es diferente en las diversas lactaciones.

Ha = La prevalencia de mastitis subclínica es diferente en las diversas lactaciones.

2.4 Variables de estudio

Prevalencia de mastitis subclínica.

Diferentes lactaciones

Definición operativa de variables

VARIABLES	DIMENSIÓN	INDICADORES	INSTRUMENTOS DE MEDICION	UNIDAD DE MEDIDA
VARIABLE Independiente	Evaluación de la leche en 1ra. Lactación.	Formación de grumos en forma de gel en el centro de la paleta de CMT.	Paleta CMT. Prueba CMT. Toma de muestras	<i>Ufc/g.</i> > 10 ⁿ
Diferentes lactaciones	Evaluación de la leche en 2da. Lactación. Evaluación de la leche en 5ta. Lactación. Evaluación de la leche en 5ta. Lactación.	de la paleta de CMT. Formación de colonias de <i>Escherichia coli</i> .	Pruebas bioquímicas. Control de las etapas de lactación.	Si a las 72 horas las Unidades Formadoras de Colonias (<i>ufc</i>) del <i>e. coli</i> , son mayores a 10 ⁿ entonces la prevalencia de mastitis sub clínica es positivo.
VARIABLE Dependiente	Evaluación de la leche en 6ta. Lactación.	Presencia de bacterias de <i>E. coli</i> .	Agar MacConkey Citrato de Simmons (C.S.) Tres Azúcar Hierro (T.S.I.) Agar Lisina Hierro (L.I.A.) Medio SIM.	RCS/ml. N. Negativo de 0 - 200.000 T. Trazas de 150.000 - 500.000 1.Ligeramente positivo De 400.000 -1.500.000 2.Positivo De 800.000 – 5.000.000 3.Muy positivo > 5.000.000 Mililitros <i>Ufc/g</i> , Ranking
Prevalencia de mastitis subclínica	Evaluación por el método de CMT. Pruebas bioquímicas Medios diferenciales			

CAPÍTULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 **Ámbito de estudio**

El estudio fue ejecutado en la Estación Experimental Agraria "Callqui", de la Dirección Regional Agraria de Huancavelica, cuya localización y ubicación geográfica es; región y provincia: Huancavelica, distrito: Ascensión, lugar: Callqui ubicado al oeste de la ciudad, a una distancia de 7.07 km del centro de Huancavelica, contando con una trocha carrozable, de acceso al margen izquierdo del río Ichu; con una altitud de 3,718 m.s.n.m., Latitud Sur: 12° 46' 59.2" y Longitud Oeste: 75° 2' 1.5", su clima y meteorología presentan una temperatura máxima de 16°C. Y una temperatura mínima de 15°C. Con una precipitación pluvial de 829.6 mm.

3.2 **Tipo de investigación**

Básica; Tiene fines teóricos y científicos: descubrir leyes, principios o formular teorías. (Yarleque, 2014)

3.3 **Nivel de investigación**

Descriptivo; Consiste en describir, analizar e interpretar sistemáticamente un conjunto de hechos relacionados con otras variables tal como se dan en el presente. El método descriptivo apunta a estudiar el fenómeno en su estado actual y en su forma natural, (...) (Sánchez y Reyes, 1998)

3.4 Método de investigación

Deductivo; El método deductivo, (...) considera que la conclusión está implícita en las premisas, (...) Es un tipo de razonamiento que nos lleva: a) de lo general a lo particular, b) de lo complejo a lo simple. (Estrada, 2014)

3.5 Diseño de investigación

✓ Diseño no experimental o ex post facto; la investigación se desarrolló de acuerdo al cronograma que hemos establecido, donde se evaluó el porcentaje de la prevalencia general por unidad animal, luego se determinó la prevalencia de mastitis sub clínica en diferentes etapas de lactación, determinó la prevalencia de mastitis sub clínica por cuartos, luego se detectó la presencia de la *Escherichia coli*, mediante la aplicación de Agar MacConkey, contrastando con los medios diferenciales Agar citrato de Simmons, Agar Hierro Tres Azucres (TSI), Agar Lisina Hierro (LIA), Medio para Sulfuro, Indol y Movilidad (SIM) y se determinó, si las etapas de lactación influyen o no en la prevalencia de la mastitis sub clínica mediante la prueba de Ji^2 de homogeneidad, habiendo sido el esquema el siguiente:

M ----- O

Donde:

M : Muestra

O : Observación

3.6 Población, Muestreo

Población

La población en estudio fue 20 vacas que se encontraban en producción al momento de iniciar con el trabajo de investigación en la Estación Experimental Agraria de "Callqui"

3.7 Técnicas e instrumentos de Recolección de Datos

- **Técnica de colección de muestras de leche**

Se utilizó muestras representativas de las vacas productoras de leche, en época de lactación, para realizar la prueba de California Mastitis Test (CMT), así como de la prueba en laboratorio, para el análisis bacteriológico del *Escherichia coli*.

- **Toma de muestras de leche para análisis bacteriológico**

El método de obtención fue el siguiente:

Se tomaron de las 20 vacas de leche de la estación experimental, obteniendo un total de 80 muestras debido a que cada vaca productora de leche posee cuatro pezones.

Las muestras se tomaron siguiendo los procedimientos descritos en la recolección de datos.

El mínimo total de toma de muestras fue de 4 a 5 ml., por pezón.

Se identificó cada muestra mediante marcas realizadas en los viales correspondientes al número de vaca y pezón al que corresponde.

El material obtenido se guardó en una caja isotérmica, con hielo.

Luego este material se trasladó directamente al laboratorio de sanidad animal de la Universidad Nacional de Huancavelica

3.8 Procedimiento de Recolección de Datos

- **Preparación de los pezones**

Se lavaron los pezones con solución salina, secándolos luego con toallas desechables, luego de esto se procedió a eliminar los primeros chorros de leche cuyo propósito fue evitar residuos contaminantes.

Con torundas de algodón humedecidas en alcohol (metílico, etílico al 70% se desinfecto la punta del pezón, para tomar las muestras de los cuatro pezones para evitar la contaminación.

Luego se tomó las muestras, identificándolos con el número de la vaca y el pezón muestreado.

Se tomó el tubo con la mano y el dedo meñique y la palma de la otra mano se quitó el tapón.

Sin que el tubo toque el pezón. Con la misma presión posible se ordeño manteniendo alejado del pezón el tubo.

Hemos procedido a recolectar de 4 a 5 ml., de leche que fueron suficientes y luego se tapó el tubo, este proceso de muestreo se hizo lo más rápido posible comenzando por los más cercanos.

Las pruebas para determinar la mastitis subclínica se realizaron directamente en el lugar de recolección aplicando la metodología de California Mastitis Test (CMT).

Para el análisis en laboratorio se tomaron muestras de cada flanco de la ubre de las vacas primeros chorros, se mantuvieron a una temperatura de 4 a 5 C°, por lo que fue necesario mantenerlas en cajas isotérmicas con hielo.

Luego se trasladaron las muestras al laboratorio para efectuar el cultivo bacteriano y poder determinar la prevalencia de *Escherichia coli.*, en vacas de diferentes lactaciones, en la estación experimental agraria, Callqui Huancavelica.

- **Actividades previas en laboratorio**

Previo al inicio del cultivo y aislamiento del *Escherichia coli*, se ha procedido a efectuar la preparación del material de laboratorio, (instrumental, placas Petri, pipetas, probetas entre otros) procediendo a esterilizar los mismos en la autoclave a una temperatura de 121°C por un periodo de 20 minutos.

- **Proceso de preparación de los medios de cultivo**

Primero hemos realizado el pesaje del Agar Mac conkey en la balanza analítica, en la siguiente proporción:

Agar Mac conkey, la cantidad de 5.15 gr. Por cada 100 mililitros de agua destilada.

Hicimos previamente la tara del papel; en seguida se inició con la dilución del agar, en el agua destilada, calentándolo en la estufa eléctrica a punto de ebullición para homogeneizar el medio y quede sin granulaciones, luego se dejó entibiar, para luego

cubrir el frasco de Erlenmeyer con torunda de algodón y papel aluminio y se llevó el medio de cultivo al autoclave por un periodo de 15 minutos a una temperatura de 121°C, concluido el proceso de preparado y esterilizado, procedimos a distribuir en las placas Petri el medio de cultivo, apoyándonos con el mechero de bunsen para evitar que se contamine el ambiente, en todo momento del proceso hemos utilizado en forma muy estricta guantes quirúrgico, mascara protectora para la boca, el mandil o guardapolvo y la gorra, con la finalidad de mantener la asepsia respectiva en los ambientes del laboratorio, en el proceso de reparto del medio de cultivo en las placas Petri, estas se colocaron al lado izquierdo de nuestra ubicación y el balón conteniendo el medio de cultivo al lado derecho; para iniciar con la distribución del medio del cultivo, hemos procedido a desatar el hilo de la boca del balón, abriendo el frasco con la mano derecha y tomarlo con la misma, con la mano izquierda abrimos la placa Petri y vertimos una cantidad adecuada de medio de cultivo en forma lenta, flameando entre 2 a 3 veces la boca del frasco de Erlenmeyer, manteniéndolo en una posición semi inclinada cerca del mechero; luego finalmente depositamos las placa de Petri conteniendo el medio de cultivo en un lugar plano para que enfríe y posteriormente efectuar la siembra en ellas; haciendo la aclaración que hemos utilizado el mismo procedimiento para con las demás placas Petri hasta concluir con todas las placas en uso.

- **Coloración gram**

Luego procedimos a efectuar la coloración o tinción gram, con la finalidad de detectar la existencia de *Escherichia coli*, gram – realizando el siguiente procedimiento; tomamos un portaobjetos nuevo y con el asa bacteriológica al cual previamente lo calentamos en el mechero, tomamos una muestra de las colonias de *Escherichia coli* formadas en la placa Petri en el orden en el que se realizó la siembra, luego hicimos un frotis en el porta objetivo, habiendo puesto previamente una gota de agua destilada para extender en forma más fácil y uniforme la muestra de bacterias, luego de esto procedimos a fijar la muestra en el portaobjetos pasándolo por el fuego del mechero de bunsen hasta por dos

veces, luego hemos cubierto la muestra fijada, primero con el reactivo cristal violeta (violeta de genciana) y hemos esperado a que se seque por un tiempo de 2 minutos y luego de esto quitamos el exceso con de cristal violeta, aplicando unos chorritos de agua mediante el cristal piceta, para luego aplicar el reactivo lugol y dejar secar por 2 minutos procediendo a lavar con agua mediante el cristal piceta; seguidamente hemos procedido a efectuar la decoloración, agregando el alcohol acetona cubriendo en su totalidad la muestra y lo dejamos secar igual por 2 minutos, para posteriormente enjuagar con agua y finalmente agregamos unas gotas de safranina tratando de cubrir toda la muestra y luego escurrimos el exceso para lavar igual con agua que se aplicó con el cristal piceta, esperando a que se sequen por 2 minutos, este mismo procedimiento se aplicó en todos los demás casos hasta culminar con las 28 muestras de colonias cultivadas en las placas Petri, que solo presentaron prevalencia de mastitis subclínica.

- **Lectura e interpretación de resultados**

Una vez terminado con las muestras preparadas en la porta objetivos, procedimos a observar en el microscopio, primero a 10X para enfocar el campo microscópico, luego pasamos a 40X, para confirmar el campo seleccionado, en esta etapa procedimos a agregar una gota de aceite de inmersión y colocamos el objetivo a 100X, para poder observar la morfología, agrupación y el color de los bacilos.

- **Morfología, agrupación y color**

Al observar al microscopio la morfología de las bacterias del *Escherichia coli*, se notó que la forma era de bacilos (abastonado) y realizando la medición con el microscopio esta resulto en promedio 2 μm . De largo, la agrupación que presentaron fueron en cadenas, el color que presentaron fue rosado intenso.

- **Preparación de los medios diferenciales**

Se pesó cada uno de los medios diferenciales, en la balanza analítica por separado y en la siguiente proporción:

- ✓ Agar citrato de Simmons, la cantidad de 2.40gr., por cada 100 ml. de agua destilada.
- ✓ Agar Hierro Tres Azucres (TSI), la cantidad de 6.46gr., por cada 100 ml., de agua destilada.
- ✓ Agar Lisina Hierro (LIA), la cantidad de 3.45gr., por cada 100 ml., de aguas destilada.
- ✓ Medio para Sulfuro, Indol y Movilidad (SIM), la cantidad de 3.00gr., por cada 100 ml., de agua destilada.
- ✓ Peptona, la cantidad de 2.00gr., por cada 100 ml., de agua destilada.

En vista que se obtuvo 76 muestras en viales graduados de 5 ml., de las 20 vacas en observación, habiendo existido 04 flancos con el pezón reprimido, cerrado y seco, siendo estos de las siguientes; vaca Nancy presento 01 pezón reprimido en el flanco anterior derecho, vaca Lili presento 02 pezones cerrados en los flancos posterior izquierdo y anterior derecho, finalmente la vaca Deisy presento un pezón seco en el flanco posterior derecho; sin embargo hemos utilizado la cantidad de 1280 tubos de ensayo, siendo distribuido para cada agar del siguiente modo:

- ✓ Agar citrato de Simmons, 320 tubos de ensayo
- ✓ Agar Hierro Tres Azucres (TSI), 320 tubos de ensayo
- ✓ Agar Lisina Hierro (LIA), 320 tubos de ensayo
- ✓ Medio para Sulfuro, Indol y Movilidad (SIM), 320 tubos de ensayo

Luego hemos iniciado con la dilución de cada medio hasta llegar a homogeneizar uniformemente, calentando con la estufa a punto de ebullición, luego dejamos enfriar y

una vez manipulable procedimos a tapar el frasco con algodón y papel Graf amarrándolo luego con papel pabilo, llevándolo luego a esterilizar en el autoclave a 121°C por 15 minutos; luego de esto repartimos en cada tubo de ensayo, colocando los tubos de ensayo al lado izquierdo y el balón conteniendo el medio de cultivo al lado derechos, para el respectivo servido tal y como lo recomiendan los procedimientos, en el proceso de servido se destapo el tubo luego se vertió el agar en forma lenta, se hizo el flameo de la boca del frasco entre 2 a 3 veces manteniendo este último en una posición semi inclinada y cerca al mechero, acostando los tubos de ensayo sobre una tablilla de aproximadamente 3 cm., de grosos de tal modo que permanezcan en una posición de echado semi inclinada con la finalidad de que enfríen los medios y conserven al secarse la posición de bisel; mientras que con el medio SIM una vez servido en una posición recta se ha procedido a colocar los mismos en una gradilla (por ser este un medio solido); procediendo de igual modo con todo los tubos y en cada tipo de agar hasta culminar con la cantidad arriba indicada de 1280 tubos en general.

- **Evaluación microbiológica**

Para realizar la evaluación microbiológica se ha tenido en cuenta los siguientes datos; el número de lactación, la fecha de siembra de la muestra, cantidad de colonias crecidas, fecha de siembra de colonias crecidas, resultado de las pruebas bioquímicas; agar citrato de Simmons, agar Hierro Tres Azucares (TSI), agar Lisina Hierro (LIA), Medio para Sulfuro, Indol y Movilidad (SIM).

- **Siembra de muestra (leche) en agar Mac conkey**

Iniciamos este procedimiento tomando 1ml. de las muestras de leche pura de los viales graduados; con la finalidad de hacer la dilución del mismo en 9ml., de caldo peptona, manteniendo el orden en el que se trasladó dichas muestras del Centro

Experimental Callqui hacia el laboratorio; los mismos que fueron, vacas en 1ra. Lactación, 2da. Lactación hasta la sexta lactación, iniciándose con la vaca Roxana hasta culminar con la vaca Perica; llegando a hacer la dilución hasta una tercera vez es decir 10^{-3} , repitiendo el proceso para todas las muestras; hemos tomado una muestra de 1ml. de leche con la pipeta graduada y servido en los 9ml., de caldo peptona para el primer tubo de ensayo, seguidamente tomamos nuevamente 1 ml., de la dilución en el primer tubo de ensayo y lo servimos al segundo tubo de ensayo que contenía 9ml. de caldo peptona y finalmente tomamos de nuevo 1ml., de dilución de este segundo tubo de ensayo y lo servimos en el tercer tubo de ensayo conteniendo 9ml., de caldo peptona, luego de esto hemos procedido a efectuar la siembra en las placas Petri previamente conteniendo la preparación del agar Mac conkey, inoculando 1ml., de la solución con la pipeta, para luego hacer la siembra por extensión con el asa Drigalsky el cual hemos esterilizado y flameado constantemente con el mechero de bunsen, el proceso de extendido, distribución de la solución fue en forma constante llevando una secuencia hasta que la solución se impregne en el agar Mac conkey llegando a tomar una contextura gelatinosa semi sólida, repitiendo este proceso en forma idéntica con las demás placas Petri hasta concluir con todas las muestras, finalmente cerramos la placa e identificamos con el plumón indeleble para luego colocarlos en la incubadora en forma invertida para el respectivo crecimiento de las colonias a una temperatura de 37°C por 24 horas.

- **Siembra de las colonias en los medios diferenciales**

Una vez se tuvo servido y enfriado los medios diferenciales dimos inicio con la siembra de las colonias de *Escherichia coli*, tomando muestras de colonias de las placas Petri con cultivos, donde se podía observar el crecimiento de las mismas en forma abundante, realizando de la siguiente manera:

Primero realizamos el conteo de las colonias crecidas para verificar la presencia de estas en los cultivos, siendo lactosa positiva (color rojo) y lactosa negativa (color blanco).

Luego separamos las placas para apreciar el crecimiento de las colonias en el siguiente orden, primero las placas que contenían las lactosas positivas (color rojo) y luego las lactosas negativas (color blanco), finalmente aquellas placas que no contenían crecimiento bacteriano alguno.

Luego procedimos a realizar el conteo en el contador de colonias.

En seguida colocamos los tubos de ensayo conteniendo los medios diferenciales en las gradillas con la finalidad de realizar la siembra en el siguiente orden: Agar citrato de Simmons, Agar Hierro Tres Azucares (TSI), Agar Lisina Hierro (LIA), Medio para Sulfuro, Indol y Movilidad (SIM).

Luego iniciamos con la siembra de las colonias en los medios diferenciales; cogiendo solo una colonia con el asa de Colle o siembra, el cual desinfectamos previamente con el mechero de bunsen, escogiendo preferentemente de las colonias más grandes y con mayor crecimiento de colonias, sembrando con el método de estrías en el siguiente orden, Agar citrato de Simmons de (color verde), Agar Hierro Tres Azucares (TSI) (color rojo) y Agar Lisina Hierro (LIA)(color morado) para lo cual tomamos los tubos que contenían el medio, en posición inclinada a bisel, inoculando las colonias con una misma toma de muestra para los medios, jalando la punta del asa de siembra hasta el final, procediendo a rotular en cada una de las muestras el flanco, el número de lactación y la vaca a al que pertenecía; seguidamente procedimos con la siembra en el Medio para Sulfuro, Indol y Movilidad (SIM) (color amarillo) introduciendo la punta en forma recta y profunda en el medio, procediendo a rotular con plumón indeleble cada una de las muestras igualmente, el cuarto, el número de lactación y la vaca a al que pertenecía.

Una vez concluida con todas las siembras procedimos a colocar las gradillas en la incubadora por un tiempo de 24 horas a 37°C.

Finalmente, pasada las 24 horas procedimos a realizar la lectura de las muestras de los tubos y la correspondiente toma de datos obtenidos procesando estos datos en tablas anexas.

- **Lectura del *Escherichia coli* en los medios diferenciales**

Para efectuar la lectura de las colonias que crecieron en las pruebas bioquímicas hemos tomados características resaltantes de cada medio, expresadas en forma de letras (A, K) y signos (+) (-) según la característica de cada medio, dando inicio con el medio, Agar citrato de Simmons, prosiguiendo con el Agar Hierro Tres Azucres (TSI), continuando con el Agar Lisina Hierro (LIA), para finalmente seguir con el Medio para Sulfuro, Indol y Movilidad (SIM).

□ Interpretación del medio Agar citrato de Simmons; estos cultivos típicos de *Escherichia coli*, no utilizan el citrato como fuente de carbono (citrato -) por esto mantienen en color verde.

Interpretación del medio, Agar Hierro Tres Azucres (TSI); este medio arroja resultados expresados en forma de letras y signos, tal como podemos apreciar en el cuadro abajo descrito; los cultivos típicos de *Escherichia coli*, presentan el bisel amarillo, por la fermentación de la glucosa (A), si fermenta la lactosa y/o sacarosa entonces presenta el tendido amarillo (A), y si existe formación de gas es (+) y si es sin producción de H₂O – con oscurecimiento (-).

Tabla 2

Interpretación del Agar Hierro Tres Azucres (TSI)

Expresiones	Interpretación del medio	Características
A/K	Fermentación por acidificación	Color amarillo
A/K	Fermentación por bacidificación	Color amarillo
+/-	Producción de gas	Presencia de aire
+/-	Hidrogeno	Color negro
<i>Escherichia coli</i> = A/A +++,-		

Interpretación del medio, Agar Lisina Hierro (LIA); Los cultivos típicos de *Escherichia coli*, en este medio descarboxilan la lisina y presentan el fondo y tendido purpura, el signo es (+).

Medio para Sulfuro, Indol y Movilidad (SIM); los cultivos típicos del *Escherichia coli*, en este medio presentan enturbiamiento del medio y hay motilidad de la bacteria, el signo es (+).

3.9 Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

Los datos se procesaron mediante la aplicación de estadística descriptiva y para determinar la influencia de las lactaciones sobre la prevalencia de la mastitis se utilizó el Ji^2 de homogeneidad:

$$X^2 = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^k \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Dónde:

O_{ij} = Valor observado del evento j .

E_{ij} = Valor esperado del evento j .

X^2 = Es el Ji cuadrado.

CAPÍTULO IV:

RESULTADOS

4.1 Presentación de Resultados.

En la tabla 3 se aprecian los resultados obtenidos de la prueba de *California Mastitis Test*, (C.M.T.) efectuada a las 20 vacas que se encontraban en producción de leche, de las cuales 14 animales dieron positivos significando una prevalencia del 70% y 6 resultaron negativos (30%).

Tabla 3

Resultados de la prevalencia general de mastitis subclínica por unidad animal.

Nº DE VACAS	POSITIVOS	NEGATIVOS	PREVALENCIA (%)
20	14	6	70

En la tabla 4 se aprecian los resultados obtenidos de prevalencia de mastitis subclínica por etapa de lactación de las 14 vacas que resultaron positivo; mismos que reflejan en 1ra. Lactación una prevalencia del 15%, en 2da. Lactación un 10%, en 4ta. Lactación un 5%, en 5ta. Lactación un 25% y en 6ta. Lactación un 15%, que sumados a nivel general dan un 70%

Tabla 4

Resultados de la prevalencia de mastitis sub clínica por etapa de lactación en vacas que dieron positivo.

ETAPA DE LACTACION	NUMERO TOTAL DE VACAS	VACAS CON PREVALENCIA POSITIVA	NEGATIVO	PREVALENCIA (%)
1ra	7	3	4	15
2da	2	2	0	10
4ta	3	1	2	5
5ta	5	5	0	25
6ta	3	3	0	15
total	20	14	6	70

En la tabla 5 podemos ver los resultados obtenidos en la prueba de *California Mastitis Test*, efectuada a las 14 vacas que dieron positivo en las diferentes etapas de lactación siendo; en 1ra. Lactación un 13%, 2da. Lactación 7%, 4ta. Lactación 4%, 5ta. Lactación 14% y 6ta. Lactación 13% que en forma general suman un 50%.

Tabla 5

Resultados de la prevalencia de mastitis sub clínica en vacas que dieron positivas, por etapas de lactación.

ETAPA DE LACTACION	VACAS CON PREVALENCIA POSITIVA	NUMERO DE CUARTOS CON PREVALENCIA POSITIVA	NUMERO TOTAL DE CUARTOS	PREVALENCIA (%)
1ra	3	7	14	13
2da	2	4	8	7
4ta	1	2	4	4
5ta	5	8	16	14
6ta	3	7	14	13
total	14	28	56	50

En la tabla 6 observamos resultados sobre la influencia de las etapas de lactación en la prevalencia de mastitis subclínica mediante la prueba Ji^2 de homogeneidad que existe diferencia estadística ($p < 0.05$), lo que indica que influye sobre la mastitis subclínica causada por *Escherichia coli* en vacas de diferentes lactaciones en la Estación Experimental Agraria "Callqui" Huancavelica.

Tabla 6

Prueba Ji^2 de homogeneidad para determinar si las etapas de lactación influyen en la prevalencia de mastitis sub clínica.

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)
Ji-cuadrado de homogeneidad	7,619 ^a	5	0,179

4.2 Discusión.

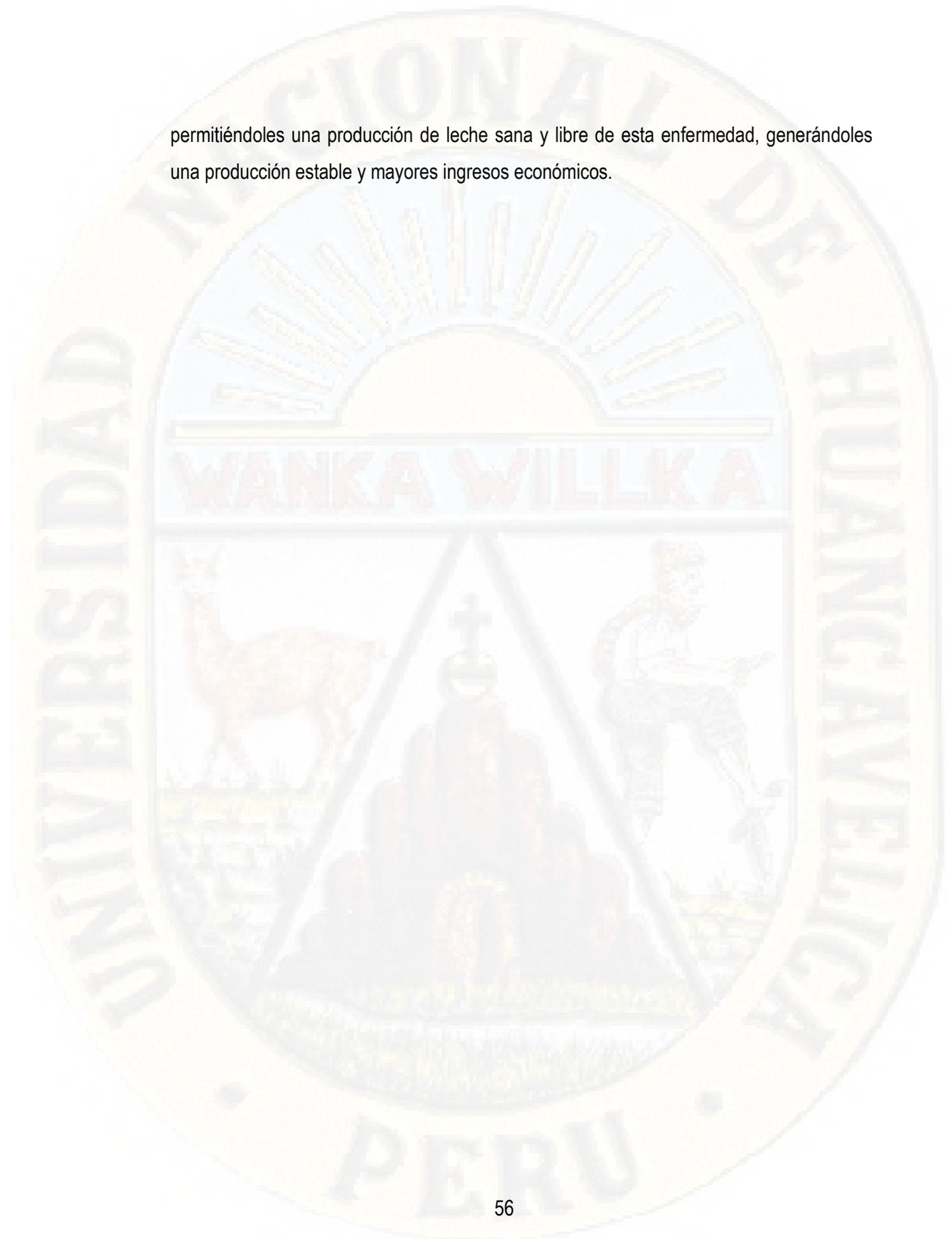
En el presente estudio se encontró un 70% de prevalencia de mastitis subclínica causada por *Escherichia coli*, resultados similares encontró, Guisar, *et al.*, (2008) en sus conclusiones y discusiones indica; “en base a los resultados obtenidos del estudio realizado en el período de investigación sobre la mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán., se determinó una prevalencia de 43.14%”; por otro lado , Danilo, (2006) concluye, la prevalencia de mastitis en el hato fue de un 41%, (...). Fenómeno que se asemeja a lo anterior.

Colque (2015) concluye, “la prevalencia de mastitis subclínica en vacunos según el mes de lactación fue 4.41, 8.82 y 6.62 % para 1 a 3 meses, 4 a 6 meses, y de 7 a 9 meses de lactación, respectivamente ($P \geq 0.05$)”. Este comportamiento es similar a lo hallado por nosotros en las etapas de lactación (Tabla 4) donde encontramos 9, 5, 3, 10 y 9% para la 1ra., 2da., 4ta., 5ta y 6ta. Lactación respectivamente y del mismo modo contrastamos con estos resultados con los obtenidos de la prevalencia de mastitis subclínica positiva, ya que se asemejan en los resultados por etapas de lactación 1ra. 2da. 4ta. 5ta y 6ta. Cuya prevalencia general fue de 50%.

Muñoz, *et al.*, (2012), concluye; la prevalencia de mastitis subclínica, en vacas de doble propósito en Márquela, Guerrero, (...), resultados que no muestran la presencia de *Escherichia coli*. Resultado que se asemeja a lo obtenido por nosotros en nuestro trabajo de investigación en el cuadro 1, donde obtuvimos de la suma de todas las etapas de lactación, un total de 1938 colonias de *Escherichia coli*. Siendo muy bajo para ser considerado como infección.

Finalmente, consideramos que esta investigación es un aporte que permitirá en el futuro tener en cuenta el control de la prevalencia de la mastitis sub clínica en la Estación Experimental Agraria “Callqui”, de la Dirección Regional de Agricultura Huancavelica,

permitiéndoles una producción de leche sana y libre de esta enfermedad, generándoles una producción estable y mayores ingresos económicos.



CONCLUSIONES

1. La prevalencia general de mastitis subclínica por unidad animal en vacas de diferentes lactaciones, en la estación Experimental Agraria "Callqui", de la Dirección Regional Agraria Huancavelica, fue del 70%.
2. La prevalencia de mastitis subclínica en vacas que dieron por etapas de lactación fueron; en 1ra. etapa de lactación del 13%, 2da., etapa de lactación del 7% en, 4ta etapa de lactación de 14%., en 5ta., etapa de lactación del 14% y en la 6ta., etapa de lactación del 13%. Significando que en las cinco etapas tienen el riesgo de ser infectados.
3. De acuerdo al valor arrojado mediante el Ji^2 de homogeneidad las etapas de lactación si influyen en la prevalencia de mastitis subclínica.

RECOMEDACIONES

Se recomienda profundizar y realizar trabajos de investigación en prevalencia de mastitis subclínica causada por otras bacterias tales *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma sp* y *Corynebacterium bovis* y otros ya que se han encontrado ubres con presencia de mastitis aguda.

Se recomienda efectuar cursos de capacitación en manejo y sanidad al personal encargado del ordeño, con la finalidad de mejorar la producción de leche.

Se recomienda llevar un historial de las enfermedades que presenten las vacas en producción, mediante tablas de control, los cuales deben estar debidamente actualizadas y refrendadas por un profesional competente.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Acuña, M. y Rivadeneira, E. (2008). *Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de pichincha*. Trabajo de grado, Ingeniero Agropecuario, Escuela Politécnica del Ejercito, Ecuador, Quito.

Agudelo, G. y Bedoya, M. (2005). Composición Nutricional de la leche de ganado vacuno. *REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACIÓN*, 2 (1), 38 – 42.

Aguilar A., Bañuelos, P., Pimienta, B., Aguilar F. y Torres, M., (2014). PREVALENCIA DE MASTITIS SUB CLINICA EN LA REGION CIENAGA DEL ESTADO DE JALISCO. *Abanico veterinario* 4 (1), 24 – 31.

Almeida, A. (2015). *PREVALENCIA DE MASTITIS BOVINA MEDIANTE LA PRUEBA DE CALIFORNIA MASTITIS TEST E IDENTIFICACION DEL AGENTE ETIOLOGICO, EN EL CENTRO DE ACOPIO DE LECHE EN LA COMUNIDAD SAN PABLO URCO, OLMEDO – CAMBEYE – ECUADOR 2014*, Trabajo de grado, Ingeniería Agropecuaria, Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Ecuador, Cayambe, Olmedo.

Álvarez, C. (s.f.) Factores que influyen en el conteo celular somático (p. 1 y 2).

Andresen, S. (2001). MASTITIS: PREVENCIÓN Y CONTROL. *Rev. Inv. Vet. Perú* 12 (2), 55 – 64.

Ávila T., S. y Gutiérrez Ch., A. (2010). Procedimiento para el diagnóstico de la mastitis bovina; Prueba de california para mastitis (CMT). En Producción de leche con ganado

bovino. (pp. 177 y 183) (Segunda edición) (Volumen 1). México: Editorial El Manual Moderno.

Bedolla, CC., Castañeda, VH. Y Wolter, W. (2007). Métodos de detección de la mastitis bovina. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria VIII* (9), 1 – 17.

Blood, D.C. y Radostits, O. M., colaboración, Arundel, J.H. y Gay, C.C. (1992). Manifestaciones clínicas; Patología clínica; Mastitis causada por *Escherichia coli* especies de *Klebsiella* y *Enterobacter aerogenes* (mastitis ambiental), etiología, patogenia, manifestaciones clínicas. En Medicina Veterinaria. (pp. 543, 545, 563, 565 y 567) (Séptima edición) (Volumen I) México, D.F.: Editorial Interamericana Mc Graw – Hill.

Borie *et al.*, (1997) Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* entero hemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago de Chile. *Arch. Med. Vet.* 29 (2), 1 – 13.

Calvino, L.F. (s.f.) Pérdidas económicas: Consecuencias para la industria, el productor y el consumidor, diagnóstico. En Mastitis bovina. (pp.07 y 08) Argentina

Castillo, *et al.*, 2009) Estudio de prevalencia de Mastitis Subclínica en la zona alta del estado de Mérida. *Agricultura Andina* 16 (1), 39 – 40.

Cepero, R., Castillo, C., Salado, R. y Montegudo, J. (s.f.). Conclusiones. En Detección de la mastitis subclínica mediante diferentes técnicas diagnósticas en unidades bovinas. Cuba: Santa Clara, Villa Clara.

Cervantes, A., Hernández, B., Bonilla, S., Martínez, H. y Lamothe, Z. (s.f.). Generalidades de la morfología de la glándula mamaria. En Mastitis y células somáticas: factores no Nutricionales que alteran la composición láctea (pp. 4.) México: Veracruz.

Colque, C. (2015). *“Determinación de la Prevalencia e Incidencia de Mastitis Subclínica en vacunos Brown swiss del distrito de Chamaca – Chumbivilcas – Cusco”*. Tesis de grado, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Perú, Puno.

Danilo, P. (2006). *“Estudio Epidemiológico de la Prevalencia de Mastitis Sub clínica”*. En *El Ganado Reina En La Finca Santa Rosa (UNA) En Época de Lluvia*. Tesis de grado, Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Agraria, Nicaragua, Managua.

De la Cruz, C. (2012, p.11 y 12). *“PRESENCIA DE ESCHERISCHIA COLI EN CRIAS DE ALPACAS (Vicugna pacos) EN LA ZONA DE LACHOCC – HUANCAMELICA”* Tesis de grado, Ingeniería de Zootecnia, Universidad Nacional de Huancavelica, Perú, Huancavelica.

Dirección de Información Agraria Huancavelica, (2015). *“Compendio Estadístico Agrario de la Región Huancavelica”*. Perú, Huancavelica: Editorial Dirección Regional Agraria Huancavelica.

Eyzaguirre P., R. (s.f.). Pruebas Chi-Cuadrado para Tablas de Contingencias de dos Entradas, Prueba de Homogeneidad de Subpoblaciones. En *Métodos Estadísticos para la Investigación I* (pp. 8.) (primera edición) (volumen 1). Lima: Departamento de Estadística e Informática de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Estrada, M. C.G. (2014). *Metodología de la investigación*. Lima Perú: Educación. Recuperado de http://es.slideshare.net/pikaragabriela/metodologa-de-la-investigacion-35727551?from_action=save.

Giannechini, et.al., (s.f.). *Discusión*. En *Ocurrencia de mastitis clínica y subclínica en rodeos lecheros de Uruguay*. (pp. 8 y 9.). Uruguay.

Guisar, F., Ignacio, C. Bedolla y Carlos (2008). Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, mediante la prueba de California. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, IX (10), 1 -34.

Hernández S., R., Fernández C., C. y Baptista L., M.del P. (2010). Investigación transaccional o transversal. *En Metodología de la investigación* (pp. 151) (quinta edición) (volumen 1). México: Editorial McGraw-Hill/INTERAMERICA EDITORES, S.A. DE C.V.

Investigación descriptiva: análisis de información, (s.f.), FUOC (pp. 36).

Lecciones de microbiología y medios de cultivo. (1995), MEDIO SIM (Medio para Sulfuro, Indol y Movilidad, fundamento (pp. 185.) (Cuarta edición). Perú, Lima (Ediciones laborales SRL).

Muñoz, S., Hernández A., Arrieta, B. Camacho, D. y Hernández V., (2012). Aislamiento Bacteriano en bovinos de doble propósito con mastitis sub clínica, en la costa de Guerrero, México. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 13 (7), 1 – 11.

Pinzón, T. (2007.) *EFFECTOS DE LA MASTITIS SUBCLÍNICA EN ALGUNOS HATOS DE LA CUENCA LECHERA DEL ALTO CHICAMOCHA (DEPARTAMENTO DE BOYACÁ)*, Tesis de grado, Medicina Veterinaria, Universidad de la Salle, Colombia, Bogotá.

Romeu, A. (2012). *CARACTERIZACION DE CEPAS DE Escherichia coli DE IMPORTANCIA CLINICA HUMANA AISLADAS DE ECOSISTEMAS DULCEACUICOLAS DE LA HABANA*, Tesis de grado doctoral, Ciencias Biológicas, Universidad de la Habana, Cuba, la Habana.

Ruiz *et al.*, (2011). Prevalencia de Mastitis Bovina Subclínica y Microorganismos asociados: Comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil. *Rev. Salud Anim.* 33 (1), 57 – 64.

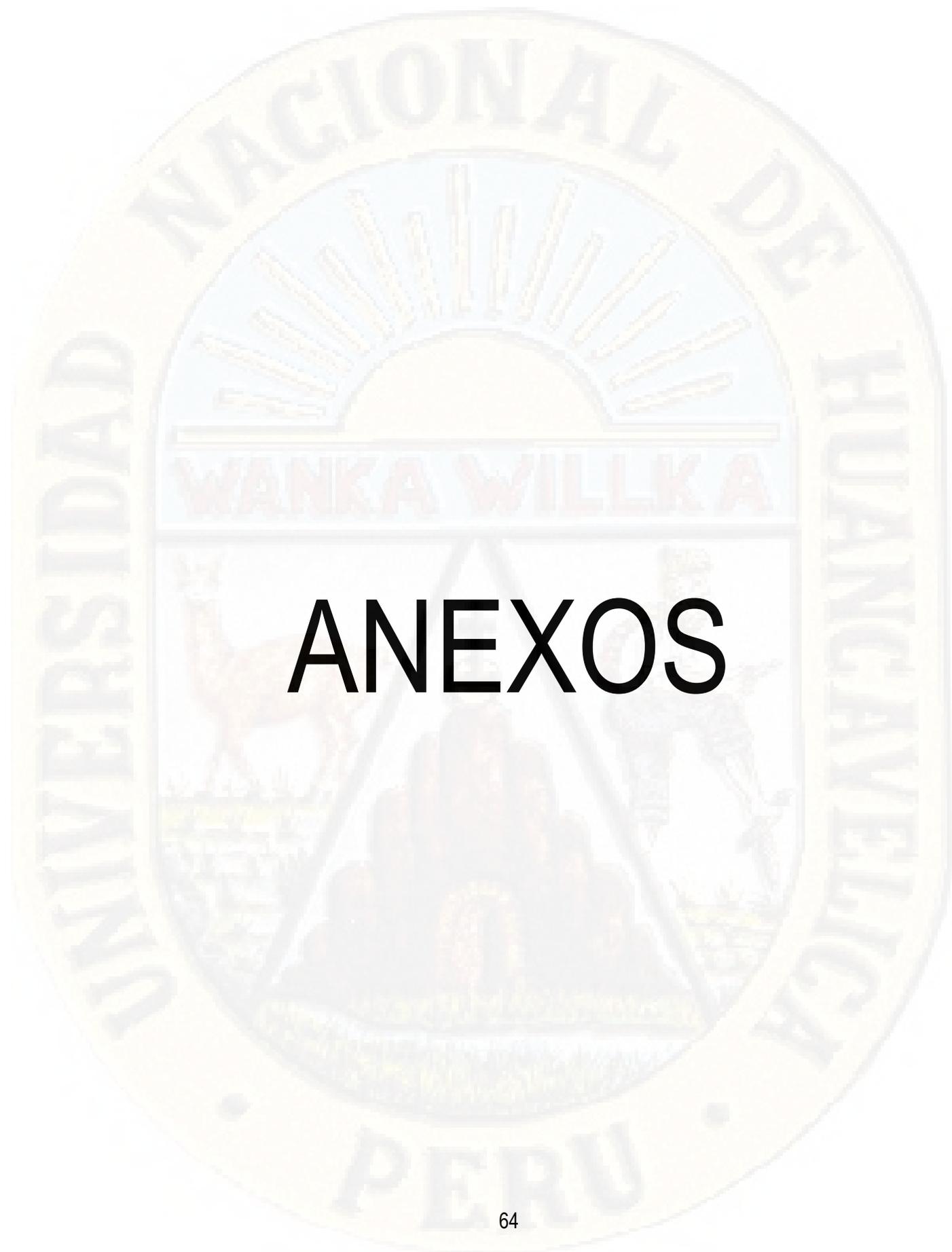
Salazar, R. (2012). *Prevalencia de la Mastitis Subclínica en el área de influencia de la carretera antigua a Cochabamba (Prov. Andrés Ibáñez, Dpto. Santa Cruz)*, Tesis de grado, Médico Veterinario Zootecnista, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Bolivia, Santa Cruz.

Silva, H. (2007). *Prevalencia e incidencia de mastitis bovina en el sistema de lechería familiar de Tejaro y Cotzio, Michoacán*, Tesis de grado, Médico Veterinario Zootecnista, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. Morelia, Michoacán.

Stephen, J. (1983). "*Prevalencia de Mastitis Subclínica en bovinos mediante la prueba de Mastitis de California (CMT) en el Municipio de Medellín Veracruz*". Trabajo de grado, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Colombia, Medellín.

Velásquez, V. y Vega, V. (2012). Calidad de la leche y mastitis sub clínica en establos de la provincia de Huaura, Lima. *Rev. Investig. Vet. Perú* 23 (1), 1 – 8.

Yarleque, Ch.L. (2014) *Elaboración de proyectos de investigación*. Lima: Vargas. Recuperado de <https://es.scribd.com/presentation/200661079/INVESTIGACION-yarleque>



ANEXOS

Anexo A

MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO: PREVALENCIA DE MASTITIS SUBCLÍNICA, CAUSADA POR *Escherichia coli*, EN VACAS DE DIFERENTES LACTACIONES, EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGRARIA “CALLQUI” HUANCVELICA.

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES	INDICADOR	DISEÑO	POBLACION Y MUESTRA
¿Cuál es la prevalencia de mastitis subclínica, causada por <i>Escherichia coli</i> , en vacas de diferentes lactaciones, en la Estación Experimental Agraria “Callqui”, de la Dirección Regional Agraria Huancavelica ?	<p>General: Determinar la prevalencia de mastitis subclínica causada por <i>Escherichia Coli</i>, en vacas de diferentes lactaciones, en la Estación Experimental Agraria “Callqui”, de la Dirección Regional Agraria Huancavelica.</p> <p>3. Específicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> Determinar la prevalencia de mastitis subclínica causada por <i>Escherichia coli</i>, en 1ra., 2da., 4ta., 5ta. Y 6ta. etapas de lactación en vacas de la Estación Experimental Agraria “Callqui”, de la Dirección Regional Agraria Huancavelica. Determinar si las etapas de lactación influyen o no en la prevalencia de la mastitis subclínica 	<p>Hipótesis: Ho = La prevalencia de mastitis subclínica no es diferente en las diversas lactaciones. Ha =La prevalencia de mastitis subclínica es diferente en las diversas lactaciones.</p>	<p>Independiente Diferentes lactaciones</p> <p>Dependiente Prevalencia de mastitis subclínica.</p>	<p>Presencia de bacterias de <i>E. coli</i>; en colonias. Formación de grumos en forma de gel en El centro de la paleta de CMT. La etapa de lactación en el que se encuentran las vacas de leche.</p>	<p>Tipo de Investigación Observación</p> <p>Nivel de Investigación Descripción univariable</p> <p>Método de Investigación Transversal</p> <p>Diseño de Investigación Ji² de homogeneidad</p>	<p>Población La población experimental es de aproximadamente 90 vacas de leche en la zona de intervención.</p> <p>Muestra La muestra será tomada de 20 vacas de leche en la zona de intervención haciendo un total de 80 muestras independientes debido a que cada vaca posee cuatro pezones por ubre.</p>

Anexo B

DEFINICIÓN OPERATIVA DE VARIABLES

VARIABLES	DIMENSIÓN	INDICADORES	INSTRUMENTOS DE MEDICION	UNIDAD DE MEDIDA
VARIABLE Independiente	Evaluación de la leche en 1ra. Lactación.	Formación de grumos en forma de gel en el centro de la paleta de CMT.	Paleta CMT. Prueba CMT. Toma de muestras	$Ufc/g. > 10^n$
Diferentes lactaciones	Evaluación de la leche en 2da. Lactación.	Formación de colonias de <i>Escherichia coli</i> .	Pruebas bioquímicas. Control de las etapas de lactación	Si a las 72 horas las Unidades Formadoras de Colonias (<i>ufc</i>) del <i>e. coli</i> , son mayores a 10^n entonces la prevalencia de mastitis sub clínica es positivo.
VARIABLE Dependiente	Evaluación de la leche en 5ta. Lactación.	Presencia de bacterias de <i>E. coli</i> .	Agar Mac conkey Citrato de Simmons (C.S.)	RCS/ml.
Prevalencia de mastitis subclínica	Evaluación de la leche en 6ta. Lactación.		Tres Azúcar Hierro (T.S.I.) Agar Lisina Hierro (L.I.A.) Medio SIM.	N. Negativo de 0 - 200.000
	Evaluación por el método de CMT. Pruebas bioquímicas Medios diferenciales.			T. Trazas de 150.000 - 500.000 1.Ligeramente positivo De 400.000 -1.500.000 2.Positivo De 800.000 – 5.000.000 3.Muy positivo > 5.000.000

Anexo C

TABLA 7

Lectura e interpretación de la coloración gram

LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS DE LA COLORACION GRAM

TOMA DE DATOS EN LABORATORIO

Nombre del dueño : Estación experimental Agraria "Callqui"
 Fecha : Huancavelica 12 de octubre del 2016

Nº DE	Número de lactación	DATOS DEL ANIMAL				SCORE	FLANCOS			
		VACA N°	Nombre	Nº Arete	IZQUIERDO		DERECHO			
					AI		PI	AD	PD	
1	1ra.	12	ROXANA	358	T	+	+	+	+	
2		16	CARMEN	362	T				+	
3		19	MARITZA	348	T			+	+	
4	2da.	3	RUFINA	280	T			+		
5		15	DEYSI	272	T	+	+	+		
6	4ta.	5	PAOLA	156	T				+	
7	5ta.	2	EPIFANIA	164	T				+	
8		7	PAULINA	186	1			+	+	
9		8	LILI	6032	1	+			+	
10		13	NELLY	200	T				+	
11		18	ROCIO	192	T		+		+	
12		4	ROSALINA	158	1			+	+	
13	6ta.	14	ALICIA	182	T			+	+	
14		17	PERICA	20510	T	+	+	+	+	

TABLA 8

Resumen de la lectura de coloración gram

Numero de lactación	Positivo	Negativo
1ra.	7	
2da.	4	
3ra.	-	-
4ta.	2	
5ta.	8	
6ta.	7	
Total	28	

TABLA 9

Resultados obtenidos con medios diferenciales

RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS MEDIOS DIFERENCIALES

Fecha		:		Huancavelica, 12 de Octubre del 2016				
Número de				FLANCOS				
Nº	VACA N°	Nombre	Arete	MEDIO DE CULTIVO	IZQUIERDO		DERECHO	
					PEZONES		PEZONES	
lactación				AI	PI	AD	PD	
1	12	ROXANA	358	Agar Citrato de Simmons	+		+	
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/A+	A/K++	A/K+	A/K++
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+	+	+	+
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	-	-	+	-
2	16	CARMEN	362	Agar Citrato de Simmons	-		-	+
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/A+	A/A+	A/A++	A/K++
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+	+	+	+
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	+	+	+	+
3	19	MARITZA	348	Agar Citrato de Simmons	-		+	+
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/A++	A/A++	A/K+	A/K+
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+	+	+	+
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	+	+	+	+
4	3	RUFINA	280	Agar Citrato de Simmons	-		-	-
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/A+	A/A+	A/A+	A/A+
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+	+	+	+
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	-	-	-	-
5	15	DEYSI	272	Agar Citrato de Simmons	+	+	+	
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/K+	K++	K++	S
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+	+	+	
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	+	+	+	
6	4ta	PAOLA	156	Agar Citrato de Simmons	-		-	
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/A+	A/A+	A/A+	A/A+
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+	+	+	+
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	-	-	-	-
7	2	EPIFANIA	164	Agar Citrato de Simmons	-		-	-
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/A+	A/k++	A/k+	A/k++
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+	+	+	+
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	-	-	-	-
8	7	PAULINA	186	Agar Citrato de Simmons	-		+	+
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/A++	A/A++	A/K-	A/K-
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+	+	+	+
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	+	+	-	-
9	5ta.	LILI	6092	Agar Citrato de Simmons	+			+
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/K+	C	C	A/K+
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+			+
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	-			
10	13	NELLY	200	Agar Citrato de Simmons	+	+	+	+
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/K++	A/K++	A/K++	A/K++
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+	+	+	+
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	-	-	-	-
11	18	ROCIO	192	Agar Citrato de Simmons	-	+	+	+
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/A+	A/K-	A/A++	A/K+
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+	+	+	+
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	+	-	+	+
12	4	ROSALINA	158	Agar Citrato de Simmons	-		-	-
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/A--	A/A--	A/A--	A/A--
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+	+	+	+
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	-	-	-	-
13	6ta.	ALICIA	182	Agar Citrato de Simmons	-		+	+
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/A++	A/A+	A/K++	K++
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+	+	+	+
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	+	+	+	+
14	17	PERICA	20510	Agar Citrato de Simmons	+	+	+	+
				Agar Hierro Tres Azucares (TSI)	A/K++	K++	A/K+	A/K-
				Agar Lisina Hierro (LIA)	+	+	+	+
				Medio para Sulfuro Indol y Motilidad (SIM)	-	-	+	-

Cuadro 1

CUADRO PARA LA INTERPRETACION DE LOS GRADOS DEL CALIFORNIAN MASTITIS TEST

CODIGO	SIGNIFICADO	RANGO DE CELULAS SOMATICAS	INTERPRETACION
C	Pezon Cerrado	0	Sin presencia de leche
R	Pezon Reprimido	0	Sin presencia de leche
S	Pezon seco	0	Sin presencia de leche
N	Negativo	0 - 200.000	Cuarto sano
T	Trazas	150.000 - 500.000	Cuarto con Mastitis Subclinica
1	Ligeramente positivo	400.000 - 1.500.000	Cuarto con Mastitis Subclinica
2	Positivo	800.000 - 5.000.000	Cuarto con infeccion seria
3	Muy Positivo	> 5.000.000	Cuarto con infeccion seria

LEYENDA

T = Trazas : Hay principios de mastitis sibclinica en el cuarto
1 = Ligeramente positivo : Hay presencia de mastitis sibclinica en el cuarto

Anexo D

TABLA 10

Estadística pecuaria sobre el número de cabezas de vacuno en la Región Huancavelica

RESUMEN DE LA PRODUCCION PECUARIA				
REGION HUANCVELICA				
AÑO: 2015				
CRIANZA	SACA TOTAL Nº DE ANIMALES	PRODUCCION TM	RENDIMIENTO KG/CABEZA	PRECIO CHACRA S/KG
CARNES	2,340,570.00	11,678.45		
ALPACA	36,037	927.01	25.72	4.46
GALLINA	180,940	306.90	1.70	7.06
CAPRINO	35,143	437.25	12.44	5.44
CUY	1,840,029	1,047.26	0.57	7.88
EQUINO	2,404	311.43	129.54	2.87
LLAMA	17,015	449.40	26.41	4.38
OVINO	146,988	1,702.17	11.58	5.47
PORCINO	40,681	1,437.23	35.33	5.35
VACUNO	41,333	5,059.80	122.42	5.08
SUB PRODUCTOS	433,586	26,621.46		
FIBRA DE ALPACA	79,107	212.64	2.69	4.34
FIBRA DE LLAMA	8,583	16.27	1.90	2.83
HUEVO	44,804	477.33	10.65	4.73
LANA DE OVINO	279,072	1,702.17	6.10	1.44
LECHE DE CAPRINO	3,683	1,629.47	0.44	0.99
LECHE DE VACUNO	18,337	22,583.58	1.23	1.12
POBLACION DE GANADOS Nº DE CABEZAS				
ALPACA	362,104.00			
GALLINA	380,324.00			
CAPRINO	232,542.00			
CUY	1,617,855.00			
EQUINO	63,847.00			
LLAMA	172,071.00			
OVINO	1,172,238.00			
PORCINO	144,165.00			
VACUNO	247,801.00			
VICUNA	14,338.00			

FUENTE.: Dirección Regional Agraria Huancavelica

Anexo E

TABLA 11

Estadística pecuaria sobre el número de cabezas existente en el distrito de Huancavelica

DIA															
DISTRITO DE HUANCAMELICA															
POBLAC./	Unidades	4,500	4,500												
	Unid. (Saca)	3,500	2,090	170	160	180	190	195	200	180	175	180	165	155	140
	(T.M.)	6.95	3.48	0.28	0.27	0.30	0.32	0.33	0.34	0.31	0.29	0.29	0.27	0.25	0.23
	Precio en Ch.		5.37	6.5	6.14	6.7	6.20	6.23	6.28	6.20	6.30	6.32	6.35	6.37	6.38
	(\$/x kg.)														
	Rendimiento		1.66	1.64	1.67	1.68	1.68	1.68	1.71	1.70	1.63	1.63	1.64	1.64	1.65
	Aves Post.	1,100	603	600	650	630	610	580	510	600	620	600	585	570	560
	(T.M.)	10.32	5.22	0.49	0.47	0.45	0.44	0.42	0.37	0.47	0.45	0.43	0.42	0.41	0.40
	Precio en Ch.		3.65	3.60	3.61	3.65	3.60	3.67	3.67	3.67	3.67	3.67	3.67	3.67	3.67
	(\$/x kg.)														
	Rendimiento		8.66	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72
	(T.M.)														
	Precio en Ch.		4.06	4.05	4.05	4.00	4.02	4.01	4.03	4.03	4.03	4.03	4.03	4.03	4.03
	(\$/x kg.)														
	Unid. (Saca)	800	924	65	80	68	95	100	70	60	75	70	65	70	66
	(T.M.)	85.57	110.95	10.20	9.48	10.56	11.47	12.13	8.52	7.6	8.97	8.37	7.78	8.39	7.92
	Precio en Ch.														
	(\$/x kg.)														

Cantidad de vacunos en el distrito de Huancavelica

FUENTE: Dirección Regional Agraria Huancavelica



FOTOGRAFIAS



FOTO 01: Letrero de la Estación Experimental Agraria "Callqui"



FOTO 02: Vacas dispuestas para la obtención de muestras, Previamente al Inicio de ordeño.



FOTO 03: Obteniendo muestras de leche para evaluar mediante la prueba de CMT in situ.

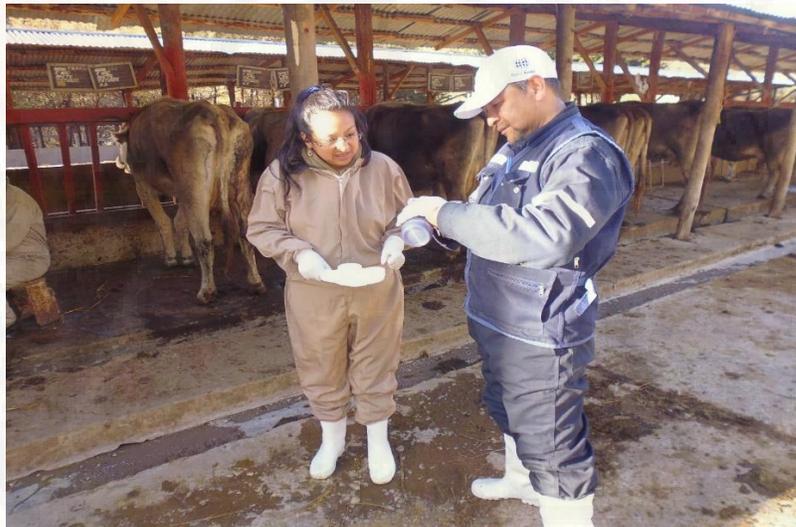


FOTO 04: Aplicando la solución CMT. a las muestras de leche para Evaluarlos.



FOTO 05: Realizando el análisis de reacción de las muestras de leche



FOTO 06: Resultados de la reacción de la leche a la aplicación de la solución del CMT.

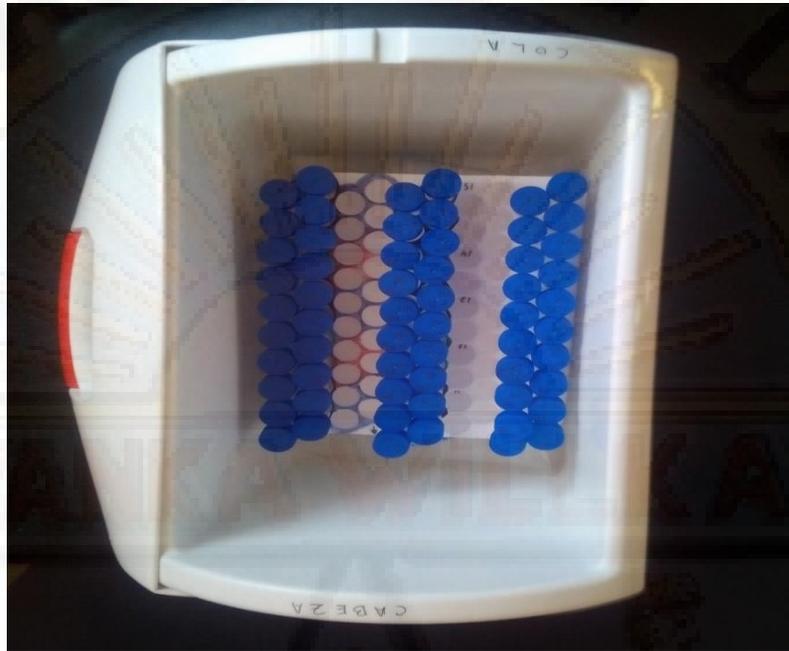


FOTO 07: Muestras obtenidas en los viales para su traslado al laboratorio de sanidad animal de la UNH.



FOTO 08: Soluciones bioquímicas para la realización de las pruebas en laboratorio.

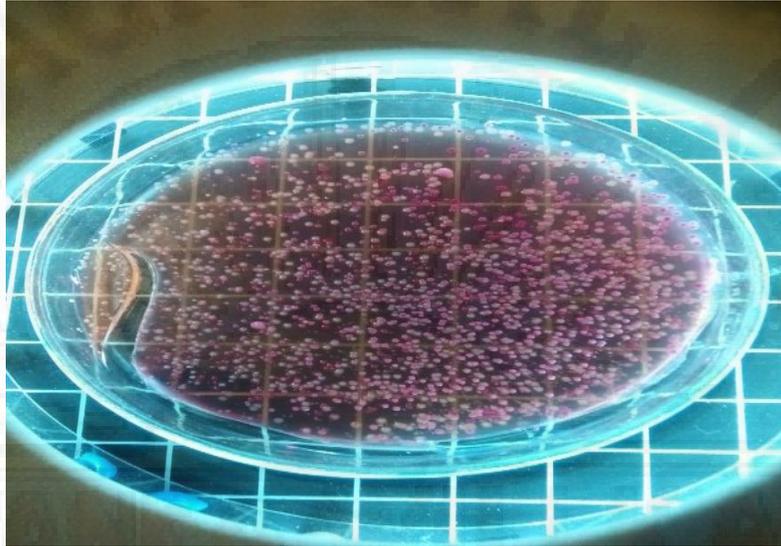


FOTO 09: Algunos resultados de las colonias que se obtuvieron
Previamente como prueba.



FOTO 10: Resultados de colonias obtenidas mediante la
prueba de Agar Mac conkey; expuestas en
forma general, para su evaluación



FOTO 11: Resultados de colonias obtenidas con la prueba de Agar Macconkey de la vaca Nancy, en sus 4 flancos (ubres) expuesta como detalle regional



FOTO 12: Medios bioquímicos listos para ser utilizados



FOTO 13: Prueba bioquímica TSI. En tubos de ensayo



FOTO 14: Prueba bioquímica LIA. En tubos de ensayo



FOTO 15: Prueba bioquímica de Citrato de Simmons en tubos de ensayo.



FOTO 16: Prueba bioquímica del Medio SIM. en tubos de Ensayo.

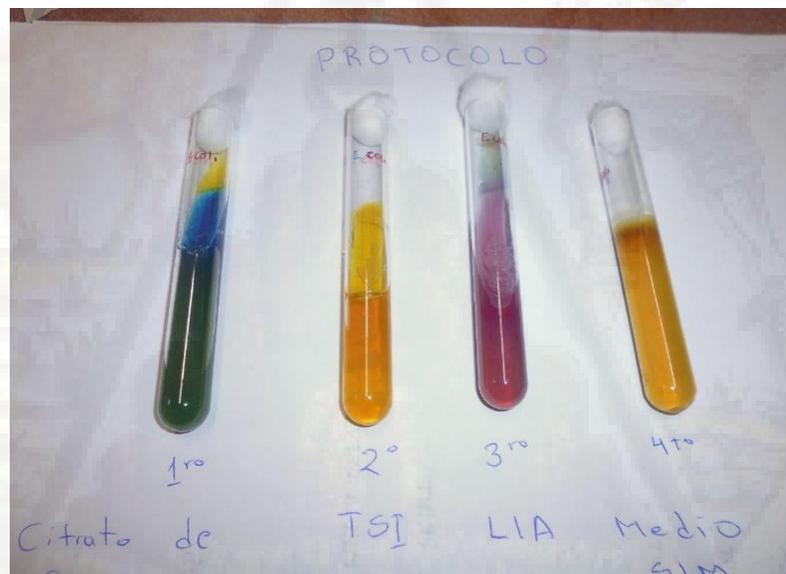


FOTO 17: Protocolo para establecer las pruebas bioquímicas en el desarrollo de la investigación.



FOTO 18: Resultados de las pruebas bioquímicas expuestas en forma general para su respectiva interpretación



FOTO 19: Resultados obtenidos en forma regional (ubre) de la vaca Alicia con la prueba en medios bioquímicos



FOTO 20: Resultados obtenidos de pezón anterior derecho de la vaca Epifania.



FOTO 21: Resultados obtenidos de pezón anterior derecho de la vaca Rufina



FOTO 22: Equipo de investigación y asesor en pleno



FOTO 23: Tesistas investigadores