

38

23



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES
 DEL GENERO *Candida* EN LECHE DE VACAS CON
 MASTITIS SUBCLINICA Y CLINICA DE CURSO
 CRONICO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
ELBA FELIX JIMENEZ

M.V.Z. ph. D. ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES
O.F.B. CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA
M.V.Z. EDGAR ALFONSECA SILVA



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
ESPECIES DEL GÉNERO *Candida* EN LECHE DE
VACAS CON MASTITIS SUBCLÍNICA Y
CLÍNICA DE CURSO CRÓNICO**

Tesis presentada ante la División de Estudios
Profesionales de la Facultad de Medicina Veterinaria y
Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México

Para la obtención del título de

Médico Veterinario Zootecnista

por

Elba Félix Jiménez

Asesores:

MVZ Ph.D. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares

QFB. Carolina Segundo Zaragoza

MVZ. Edgar Alfonso Silva

México, D.F.

1996

DIDICATORIA

A MIS PADRES:

Flavio Félix Alvarez y Dorotea Jiménez Bautista

Por la confianza que depositaron en mí y el apoyo incondicional que me brindaron durante toda mi carrera, les dedico con mucho cariño y un enorme agradecimiento esta tesis, que sin su ayuda no hubiera podido terminarla dando las gracias por todos sus esfuerzos que realizaron para mi formación.

A MI ESPOSO:

David Gutiérrez Galicia

Por tu gran paciencia, ayuda y amor que siempre me has brindado y que sin tu apoyo no hubiera podido realizar el sueño de mis padres y el mío, te dedico esta tesis con mucho cariño como símbolo de mi amor y agradecimiento.

A MIS HIJAS:

Italbi Gutiérrez Félix y Nallely Gutiérrez Félix

Por el amor incondicional que siempre me han mostrado, por haber dado de su tiempo para que haya podido terminar mi carrera, les dedico esta tesis con todo mi cariño y amor esperando que sea un estímulo para que las dos realicen una carrera quitando todos los obstáculos que se encuentren en su camino.

A MIS HERMANOS:

Belinda Félix Jiménez y Vladimir Félix Jiménez

Gracias por el amor y cariño que siempre me han dado, les dedico esta tesis esperando que siempre me consideren una hermana que los apoyará en todo.

A NUESTRO CREADOR:

Jehova

Que sin él, al hombre no le pertenece ni siquiera dirigir su paso, la sabiduría de los hombres es nada en comparación con su grandeza y poder, es por eso que para mí es la plaza fuerte que me sostiene.

AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORES:

MVZ Ph.D. Roberto Arnulfo Carvantes Olivares

QFB. Carolina Segundo Zaragoza

MVZ. Edgar Alfonseca Silva

por sus consejos, apoyo y sobre todo mucha paciencia durante la realización de este trabajo un eterno agradecimiento.

AL DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA:

MVZ Cristina Rodríguez, MVZ Francisco Suarez, MVZ Alejandro de la Peña

estoy eternamente agradecida por su gran apoyo y conocimientos que me han transmitido durante mi estancia en el departamento.

AL JURADO:

MVZ Arturo Olgún

MVZ Eduardo Posadas

MVZ Alejandro de la Peña

MVZ Rosa Elena Miranda

MVZ Edgar Alfonseca

siento un gran respeto y admiración por todos ustedes que con su experiencia y conocimientos enriquecieron mi trabajo.

A LA EMPRESA GANADEROS PRODUCTORES DE LECHE

PURA S.A. DE C.V.

MVZ Salvador Baez, y ganaderos

les agradezco mucho la gran ayuda que me brindaron al permitirme entrar a sus establos y poder llevar a cabo mi trabajo de investigación.

A UNAS PERSONAS MUY ESPECIALES:

Pablo, Juan Manuel, Leticia, Emilia, Aurelio y Alfredo

les doy las gracias por el apoyo y la gran ayuda que me brindaron sin ningún compromiso mostrandome una amistad sincera.

CONTENIDO

| | Página |
|-------------------------|--------|
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCION..... | 3 |
| MATERIAL Y METODOS..... | 9 |
| RESULTADOS..... | 15 |
| DISCUSION..... | 18 |
| LITERATURA CITADA..... | 23 |
| APENDICE..... | 30 |
| CUADROS..... | 34 |

RESUMEN

FÉLIX JIMÉNEZ ELBA. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Candida* EN LECHE DE VACAS CON MASTITIS SUBCLÍNICA Y CLÍNICA DE CURSO CRÓNICO. (bajo la dirección de: Roberto Arnulfo Cervantes Olivares, Carolina Segundo Zaragoza y Edgar Alfonseca Silva).

Una de las afecciones frecuentes en el ganado bovino lechero es la mastitis, causando graves pérdidas económicas. Se ha observado la presencia de mastitis micótica la cual se ve favorecida por un uso indiscriminado de la antibioterapia. El objetivo de este trabajo fue el aislamiento e identificación de levaduras del género *Candida* en muestras de secreción de glándulas mamarias afectadas por mastitis subclínica y clínica de curso crónico. Se muestrearon 5 ranchos ubicados en los municipios de Cuautitlán de Romero Rubio, Melchor Ocampo, Hueyoptla, Zumpango y Atitalaquila, obteniéndose de 156 vacas Holstein Friesian, 211 muestras de leche mamaria de las cuales 148 fueron de glándulas mamarias con mastitis subclínica (114 vacas) y 63 de glándulas mamarias con mastitis clínica de curso crónico (42 vacas). A las muestras se les realizó tinción de Gram para la visualización de levaduras, posteriormente fueron sembradas en caldo Sabouraud con pH 3.5 y resembradas para purificación e identificación en agar dextrosa Sabouraud. Para la identificación y diferenciación de *C. albicans* de otras especies del género, se realizó prueba de tubo germinal, formación de clamidosporas y crecimiento a pH ácido. Asimilación y fermentación de carbohidratos se realizó en las cepas que no correspondían a *C. albicans*. De las

148 muestras de leche mamitosa subclínica, se obtuvieron 38 aislamientos (25.67%) y la especie que predominó en esta mastitis fue *C. guillermondii* (52.6%). De las 63 muestras de leche mamitosa clínica de curso crónico se obtuvieron 27 aislamientos (42.86%) y la especie que predominó en esta mastitis fue *C. albicans* (33.3%). La presencia de levaduras se vio favorecida por el uso indiscriminado de antibióticos, condiciones de estrés y falta de higiene de los establos.

INTRODUCCIÓN

El ingreso reciente de México al Tratado de Libre Comercio con Norte América, obliga a la ganadería lechera nacional a producir leche de alta calidad, en cantidades suficientes y a un precio competitivo (5,16). En lo que respecta a la cantidad, México ha recurrido a la importación de leche para cubrir el 35% del consumo nacional desde 1990 a la fecha. (4,8,14) Esta deficiencia en la producción es ocasionada por diversos factores, económicos, políticos y de salud animal. De este último las enfermedades de la ubre repercuten en la producción láctea en los hatos lecheros. De todas ellas, la mastitis es la que requiere mayor atención por la frecuencia en que ocurre y por las pérdidas económicas que ocasiona (29). Esta enfermedad es una de las más costosas a nivel mundial sin embargo la mayoría de los ganaderos desconoce realmente los estragos de la enfermedad y el efecto adverso en las finanzas de su negocio; siendo la mastitis un factor clínico por el cual los establos quiebran (13).

En orden de importancia las pérdidas por mastitis se podrían agrupar de la siguiente manera :

- a) Pérdidas por producción
- b) Leche anormal eliminada
- c) Costos de los antibióticos utilizados en el tratamiento
- d) Pago por servicios veterinarios y mano de obra
- e) Animales desechados prematuramente
- f) Muertes eventuales (8,9,13)

La disminución en la producción varía dependiendo del grado de infección, en mastitis subclínica desde un 50% a 70% y para vacas afectadas con mayor severidad desde los porcentajes señalados hasta la pérdida total de la producción (14).

La pérdida en la composición de la leche varía también según el grado de infección, que va desde un 0.20 % a un 13.7 % en la grasa de la leche y un 0.046 % a un 11.3 % en sólidos no grasos, lo que redonda en demérito de la calidad de la leche (15). Las pérdidas económicas totales en México debidas a la enfermedad aún no han sido cuantificadas y no existen datos globales que garanticen una estimación rigurosa de las pérdidas económicas. De la Fuente (11) en 1982, calculaba una disminución del 12% sobre la producción por vaca, todo ello con base a trabajos realizados en la región de la Laguna. Al aplicarlo a la producción nacional de leche al año de aquel entonces, las pérdidas por producción de leche ocasionadas por mastitis, fue el equivalente a 517.1 millones de litros de leche (m.l.l.). Si lo comparamos con la producción total de 1995 (8,000 m.l.l.) las pérdidas por mastitis ascienden a 960 m.l.l. (5). Por consiguiente, para disminuir los efectos de este síndrome sobre la eficiencia productiva y evitar que se incrementen los costos de producción en el ganado bovino especializado en la producción láctea, debe ampliarse el estudio de las etiologías que intervienen en este problema para poder combatirla eficazmente.

La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria donde se dan cambios fisicoquímicos y celulares en la leche, contaminación microbiana y

pérdidas en la producción, su presentación puede ser en forma clínica y subclínica. La primera se manifiesta de una forma aparente desde el comienzo de la enfermedad, puede ser una reacción leve y localizada o llegar a ser muy severa exponiendo la vida del animal, sin embargo, la prevalencia de la mastitis clínica es menor que la del tipo subclínico (30).

La presentación subclínica, como no es posible diagnosticarla por apreciación general de la glándula, se evalúa indirectamente por la cuenta de células somáticas en la leche, utilizando exámenes tales como la prueba de California y la prueba de Wisconsin (36,39).

Una vez detectado el problema de mastitis en un hato, es necesario realizar diversas pruebas para conocer la etiología de esta patología en los animales. Las causas pueden ser agentes físicos, químicos e infecciosos; estos últimos son los más importantes y los que requieren mayor atención por la frecuencia en que se presentan. (9,29,30).

ETIOLOGÍA DE LAS MASTITIS

Se han logrado identificar diferentes microorganismos bacterianos, virales y micóticos que pueden infectar a la glándula mamaria (30). Las mastitis infecciosas causadas por hongos pueden ser ocasionadas por hongos filamentosos y leveduriformes (1,7,12).

Entre los agentes micóticos causales se encuentran (1,7,17,18,19,28,32,33,38,46)

Candida albicans

Candida maltosa

Candida guilliermondii

Candida krusei

Candida rugosa

Candida kefyr (*C. pseudotropicalis*)

Candida parapsilopsis (*C. parakrusei*)

Candida tropicalis (*C. paratropicalis*)

Cryptococcus neoformans var. *neoformans*

Cryptococcus albidus

Cryptococcus ster

Cryptococcus lactativorus

Rhodotorula muciliginosa

Trichosporon spp.

Geotrichum spp.

Aspergillus spp.

En México se han realizado varios estudios sobre mastitis micótica; Stevens (43) en 1965, reportó géneros de hongos filamentosos aislados de vacas con mastitis clínica reportando una incidencia del 11.6%; Zavala (47) en 1966 encontró una prevalencia del 24.25% de hongos filamentosos en leche de bovinos con mastitis; Lagunes y Brewer (20) en 1974, informaron de un brote de mastitis en Paso del Toro, Veracruz, aislando como único agente el hongo *Geotrichum* spp.; Murillo (25) en 1978 aisló e identificó levaduras en leche de vacas clínicamente afectadas por mastitis; y Rojano (35) en 1991 identificó a *Candida guilliermondii* y

Rhodotorula spp. en un establo ubicado en Texcoco, Edo de Méx, como las causantes de mastitis bovina.

Actualmente el género *Candida* es uno de los agentes etiológicos más comúnmente encontrados en problemas de mastitis, la mayoría de las especies de este género se encuentra distribuidos en la naturaleza a excepción de *C. albicans* que está como endosprófito del tubo digestivo de mamíferos y aves y que por lo tanto podría encontrarse en las heces de los animales, (2,17,19,23,27,30,32,33). La mastitis causada por *Candida spp.* clínicamente no se distingue de una mastitis bacteriana, debido a que hay una reacción leve, transitoria y en ocasiones, muy localizada. Sin embargo, tratamientos prolongados con antibióticos, crean las condiciones favorables para el desarrollo de *Candida spp.* provocando brotes muy severos, llegando a tener una prevalencia del 2% al 25% en el hato (1,2,18,33).

El uso de antibióticos en forma indiscriminada o la contaminación de los mismos, ha incrementado la incidencia de mastitis micóticas en varios países (1,18,22,23,27), también se ha considerado que este tipo de mastitis se presenta cuando el animal es sometido a tensión como es el caso de una mala alimentación, mala higiene, hacinamiento o golpes que sufra la glándula mamaria directamente provocando así una inmunodepresión en el animal y facilitando que las mastitis micóticas aumenten su incidencia la cual una vez que se presenta llega a ser severa y difícil de resolver ya que no ceden a tratamientos con antibióticos debido a que la composición y organización de la pared celular de los

agentes micóticos es diferente a la pared celular de las bacterias, por lo cual es necesario utilizar antimicóticos como son nistatina sola o en combinación (12,17,18,23,38), anfotericina B (18,19,23), miconazol (23,45), ketaconazol (23), sulfaetoxipridacina (21), extracto de propóleo (24).

La exigencia de producir leche de alta calidad, el impacto económico que representa la mastitis para la ganadería lechera, así como la escasa información sobre mastitis micótica en nuestro país, hacen importante detectar la prevalencia de ésta, mediante el aislamiento e identificación de levaduras, como causa probable de mastitis crónicas o reinclidentes que no hayan cedido a tratamientos antibacterianos.

OBJETIVO

Aislar e identificar las especies del género *Candida* que se encuentran involucrados en mastitis subclínica y clínica de curso crónico en ganado bovino alojados en establos del Estado de México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de 5 establos ubicados en el municipio de Cuautitlán de Romero Rubio (1), municipio de Melchor Ocampo (2), municipio de Hueyoptla (3), municipio de Zumpango (4) pertenecientes al Edo. de México; y municipio de Atitalaquia (5) que forma parte del Edo. de Hidalgo, sumando un total de 2112 vacas en producción de los cuales considerando el porcentaje de mastitis de cada rancho, se calculó que aproximadamente 470 vacas (22%) presentaron mastitis (Cuadro 1) (41). En general todas las vacas están sometidas a un régimen establecido bajo un sistema de producción intensiva.

Se llevó a cabo un muestreo por conveniencia no probabilístico a las vacas que resultaron sospechosas de mastitis subclínica en base a la prueba de Wisconsin y datos obtenidos por el encargado de la sala de ordeño. Antes del ordeño se realizó la prueba de California (CMT) para detección de mastitis subclínica y se dio preferencia a aquellas que presentaron grado de 1,2,3 (39). Siendo así que de 156 vacas Holstein Friesian, se obtuvieron 211 muestras de leche mamífera de las cuales 148 fueron tomadas de glándulas mamarias con mastitis subclínica (114 vacas) y 63 de glándulas mamarias con mastitis clínica de curso crónico (42 vacas) (Cuadro 2).

Las muestras se colectaron siguiendo la técnica recomendada por el National Mastitis Council (NMC) (27):

- Lavar y desinfectar el pezón previo a la obtención de la muestra, utilizando algodón humedecido en alcohol 70%.

- Las muestras se colectaron en tubos estériles, con tapón de baquelita, (20 x 250 mm) recolectándose aproximadamente 10 ml por cada muestra.
- Las muestras fueron identificadas con el número de la vaca y glándula mamaria al que perteneció.
- Una vez colectadas las muestras, se enviaron dentro de las siguientes 4-24 horas en condiciones de refrigeración (4°C) en cajas de poliuretano junto con refrigerantes.
- Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.

MÉTODOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL AISLAMIENTO DEL GÉNERO

Candida DE MUESTRAS DE LECHE MAMTOSA

I. AISLAMIENTO

Las muestras se colocaron en baño maría a 37°C durante 15 minutos con el fin de liberar los microorganismos atrapados en la grasa de la leche.

Las muestras se agitaron vigorosamente para homogeneizar.

Se realizaron frotis fijos, tifiéndolos con Gram (27).

Se inoculó 0.5 ml de cada muestra a cada tubo con medio líquido Sabouraud a pH 3.5 en Caldo Dextrosa Sabouraud con la finalidad de inhibir posibles contaminantes bacterianos. (Ver apéndice I). Se incubaron de 3-4 días a 37°C, posteriormente se realizaron tinciones de Gram a todas las muestras y aquellas en que la tinción reveló presencia de levaduras, fueron resembradas en cajas de

Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) incubándose a 37°C por 48 hrs. (Ver apéndice II).

II. IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR

De los cultivos en SDA , nuevamente se realizó tinción de Gram para confirmar la presencia de levaduras considerando:

- Aspecto de la colonia (color, consistencia, plana, agrupada, con pliegues regulares o irregulares).
- Tiempo de desarrollo.
- Pigmentación y la difusión del pigmento al reverso de la colonia (6,42).

III. TÉCNICAS PARA DIFERENCIAR *C. albicans* DE OTRAS ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*

Para diferenciar *C.albicans* de otras especies del género se realizaron las siguientes pruebas:

• Tubo germinativo.

Cuando se incuban células individuales de *C. albicans* producen un filamento hifal corto lateral que da origen al tubo germinativo, que no lo producen otras especies del género *Candida*.

Procedimiento:

Se preparó una suspensión diluida de levaduras en 1.0 ml de suero de equino. La mezcla se incubó a 37 ° C por 2 horas. Se utilizaron cepas conocidas de *C. albicans* y *C.tropicalis* como controles positivo y negativo, respectivamente y se observó bajo el microscopio (40 x) (4,6,10,42).

- **Tolerancia a pH ácido.**

La prueba de tolerancia a pH ácidos, ayuda a diferenciar a *C. albicans* de otras especies, ya que el rango de pH 1.2 a 1.5 es conveniente para el crecimiento de *C. albicans*, y a pH mayores pueden crecer otras especies del género. (2,6,10,42)
(Ver apéndice III)

- **Producción de Clamidosporas.**

C. albicans tiene la habilidad de formar esporas esféricas de doble pared llamadas clamidosporas, constituyendo una prueba diferencial entre las especies del género *Candida*, estas clamidosporas pueden ser inducidas a su formación en medios específicos, tales como Agar Czapek-Dox y Agar harina de maíz (Corn Meal), adicionando Tween 80 a una proporción de 1% (2,6,10,42) (Ver apéndice IV).

Las técnicas utilizadas para sembrar este medio, son las siguientes:

Técnica de Picadura: Teniendo el asa en forma de "L" y tomando una asada de la colonia, se introduce el asa al medio y se rasga el agar a lo largo de la caja Petri se deja incubando a T^o ambiente ya que de esta manera el agar no se deshidrata rápidamente y permite el desarrollo de las clamidosporas, se revisa diariamente al microscopio con objetivo 40 x.

Técnica de Sandwich: En un portaobjetos limpios y desengrasado se vierten de 4 a 5 ml del medio a utilizar, se espera a que solidifique, sembrando posteriormente sobre la superficie del agar, cubriéndose el sembrado con otro portaobjeto limpio y desengrasado, se deja incubando a T^o ambiente y observar diariamente las

taminillas para observar el desarrollo de las Clamidoporas en el microscopio con objetivo 40x. (10,42).

IV. PRUEBAS DE ASIMILACIÓN Y FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS PARA IDENTIFICAR ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*.

Las pruebas para determinar la habilidad de las levaduras para utilizar un carbohidrato (fermentación y asimilación) como única fuente de carbono es un paso importante en la identificación de levaduras (4,6,42).

Fermentación de carbohidratos o "Zimograma".

Esta prueba es menos variable y menos dependiente que las pruebas de asimilación de carbohidratos, la evidencia de la fermentación de carbohidratos por las levaduras es la producción de gas por lo que, la utilización del tubo de Durham es indispensable para su detección (4,6,42) (Ver apéndice V). Se probaron 5 azúcares: dextrosa, sacarosa, lactosa, maltosa y galactosa, usándose al 1% para las tres primeras y al .5% para las últimas, se esterilizó por filtración con filtros millipore (.22) añadiéndose a la base caldo rojo de fenol. Se colocó el medio en tubos de ensayo, 7 ml por tubo y conteniendo tubo de Durham para la detección de la producción de gas. La levadura de prueba fue inoculada, incubándose a una temperatura de 37° C por espacio de 48 hrs.

Interpretación:

Una prueba positiva se observa con una burbuja de aire recolectada en el tubo de Durham lo cual indica la producción de gas, en casos donde se aprecia

acidificación del medio sin producción de gas, podría ser indicativo de una contaminación bacteriana (4,6,42).

Asimilación de Carbohidratos o "Auxonograma".

Las pruebas de utilización de carbohidratos son las más ampliamente usadas para la identificación de levaduras. En todos los métodos se usa un medio basal que permite el crecimiento de levaduras sólo si se agrega una fuente de hidratos de carbono apropiada, un cambio de color amarillo es evidencia de la utilización de hidratos de carbono por parte de las levaduras (Ver apéndice V).

Interpretación: Una prueba positiva se observa con acidificación del medio el cual se observa por el cambio de coloración de rojo a amarillo (4,6,42). Para la identificación se utilizó como guía, un manual de micología (42).

RESULTADOS

De las 211 muestras de leche mamitosa sembradas se obtuvieron 65 aislamientos de levaduras del género *Candida* que representa 30.80 % del total de las muestras.

Se colectaron 148 muestras de glándulas mamarias afectadas por mastitis subclínica, a partir de las cuales se obtuvieron 38 aislamientos, que representan el 25.67%. De la misma manera, se colectaron 63 muestras de leche mamitosa de glándulas mamarias afectadas por mastitis clínica de curso crónico de las cuales, se obtuvieron 27 aislamientos, que representa el 42.86% (cuadro 3).

Se obtuvieron 6 diferentes especies del género *Candida*; que en base a la procedencia y a la presentación de la mastitis la distribución es la siguiente:

1.- Cuautitlán de Romero Rubio; se obtuvieron 8 aislamientos de *Candida albicans* únicamente en mastitis clínica de curso crónico (100%).

2.- Melchor Ocampo; se obtuvieron un total de 28 aislamientos, de los cuales 22 aislamientos (78.5%) fueron a partir de muestras de mastitis subclínica, y son los siguientes: 1 aislamiento de *Candida albicans*, 7 aislamientos de *C.kefyr*, 3 aislamientos de *C. parapsilopsis*, 3 aislamientos de *C tropicalis*, 7 aislamientos *C. guillemondii* y 1 aislamiento de *C. norvegensis*.

Se obtuvieron un total de 6 aislamientos (21.5%) a partir de muestras de cuartos con mastitis clínica de curso crónico, los cuales son los siguientes: 5 aislamientos de *C tropicalis* y 1 aislamiento de *C.guillemondii*.

3.- Huexpotla; se obtuvieron un total de 7 aislamientos, de los cuales 4 aislamientos (57.1%) fueron a partir de muestras de mastitis subclínicas, todas fueron *C. guilliermondii*. Se obtuvieron 3 aislamientos (42.9%) a partir de cuartos con mastitis clínica de curso crónico. La distribución es la siguiente: 2 de *C. guilliermondii* y 1 aislamiento de *C. albicans*.

4.- Zumpango; se obtuvieron un total de 17 aislamientos, de los cuales 9 (53%), fueron a partir de muestras de mastitis subclínica; la distribución es la siguiente: 7 aislamientos de *C. guilliermondii* y 2 aislamientos de *Candida albicans*.

Se obtuvieron 8 aislamientos (47%) a partir de muestras de cuartos con mastitis clínica de curso crónico. La distribución es la siguiente: 2 de *C. guilliermondii*, 5 de *C.kefyr* y 1 de *C. parapsilopsis*.

5.- Atlatlaquia; se obtuvieron un total de 5 aislamientos, de los cuales 3 (60%) se obtuvieron a partir de muestras de mastitis subclínicas. La distribución es la siguiente: 2 de *C. guilliermondii* y 1 de *C. parapsilopsis*.

Se obtuvieron 2 aislamientos (40%) a partir de cuartos con mastitis clínica de curso crónico, ambas correspondieron a *C. parapsilopsis* (cuadro 4).

Por otro lado, se analizó la presencia de las diferentes especies del género *Candida* según el tipo de mastitis. Del total de aislamientos a partir de muestras de mastitis subclínicas observamos en mayor porcentaje a *C. guilliermondii* (52.6%), seguido de *C. kefyr* (18.4%), *C.parapsilopsis* (10.5%), *C.albicans* (7.9%), *C.tropicales* (7.9%) y *C.norvogenesis* (2.6%).

Mientras que del total de aislamientos a partir de muestras de mastitis clínica de curso crónico, se observó en mayor porcentaje a *C. albicans* (33.3%), seguido de *C. guilliermondii* (18.5%), de *C. kefyr* (18.5%), *C. tropicalis* (18.5%) y finalmente, *C. parapsilopsis* (11.2%). (cuadro 5).

DISCUSIÓN

En los resultados del análisis micológico de 211 muestras de leche de vacas con mastitis se aislaron 6 diferentes especies del género *Candida*, entre las cuales se obtuvieron a *C. guillemondii*, *C. albicans*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis* y *C. norvogenisis*; lo cual concuerdan con otros autores en lo que se refiere a la presencia de éste género, en leche de vacas afectadas por mastitis y además mencionan que la mastitis micótica es un complejo de varias especies de determinado género capaces de producir mastitis y no sólo una especie en particular(1,7,12,17,18,25,31,32,33,34,38).

Considerando a cada rancho, se observó que no existe una relación entre las especies del género *Candida* con la etapa de evolución de la mastitis, las vacas de cada rancho en particular presentan una o varias especies. Sin embargo, independientemente de los ranchos estudiados, los aislamientos obtenidos en mastitis subclínica muestran que la especie que se obtuvo con mayor frecuencia fue *C. guillemondii*. En mastitis clínica de curso crónico la especie que se obtuvo más frecuentemente fue *C. albicans* (cuadro 5).

Es un hecho que diversas investigaciones concuerdan que el género *Candida* es el principal agente micótico asociado a mastitis, aunque la especie aislada con mayor frecuencia difiere según los resultados obtenidos por cada autor. Rippon (34) considera a *C. guillemondii* de patogenicidad limitada, y señala la posibilidad de encontrar a esta especie como habitante inocuo en las glándulas mamarias, sin embargo Ainsworth (1) considera la posibilidad de que causen lesiones bajo

condiciones de antibioterapia prolongada. Ezeh (12) la identificó como causante de infertilidad y mastitis, Kimatura (17) la asoció con lesiones encontradas en mastitis clínica crónica y Rey (32) la consideró dentro de las especies patógenas facultativas.

Por otra parte, *C. albicans* es considerada con un grado de patogenicidad alto en animales de laboratorio como es el ratón y conejo en comparación con otras especies del género *Candida* (32,37). En problemas de mastitis, Kirk (19) considera a *C. albicans* como una de las especies más frecuentemente aisladas. Natalia (26) aisló a *C. albicans* en animales que no respondieron a tratamientos con antibióticos, Sebryakov (40) asoció a *C. albicans* a problemas de aborto y mastitis en ganado lechero, Rahman (31) logró aislar de 265 muestras de leche procedentes de búfalos con mastitis 14 aislamientos de *C. albicans* (5.3 %) de los cuales 10 aislamientos fueron de animales que no cedieron a tratamientos con antibióticos.

En nuestro país son pocos los estudios realizados, por ejemplo Rojano (35) realizó un estudio en Texcoco, Estado de México, aislando el 54.8% de *C. guilliermondii*, de las levaduras aisladas de mastitis clínicas. Murillo (25) obtuvo un 15.2 % de *C. albicans* de 24 aislamientos de levaduras de glándulas mamarias clínicamente afectadas, Aretis (3) obtuvo el 100% de *C. albicans* de 6 muestras de exudado vaginal de vacas Holstein Freisan ubicados en Querétaro las cuales presentaron metritis y que no respondían al tratamiento con antibacterianos.

En el presente trabajo se pudo observar que en mastitis subclínica *C. guilliermondii* predominó en un 52.6 % y en mastitis clínica de curso crónico *C. albicans* se presentó en mayor porcentaje 33.3 %, sin embargo se observó que cada rancho presentaba una o varias especies que predominaban en determinada etapa de la mastitis, pudiéndose deber a las condiciones higiénicas de cada rancho, corroborándose esto ya que el rancho ubicado en Melchor Ocampo, las condiciones de higiene fueron muy deficientes, se aplicaron en mayor cantidad antibacterianos y se obtuvieron mayor cantidad de aislamientos en comparación con otros ranchos. Es por eso que los resultados obtenidos a partir de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica hacen suponer que el alto porcentaje de aislamientos de éstas especies está favorecido por factores extrínsecos como malas prácticas de higiene, uso prolongado de antibioterapias, deficiencias nutricionales y estados de inmunodepresión. Estos factores determinan la prevalencia de la mastitis subclínica micótica y bacteriana, ocasionando severas pérdidas económicas porque es difícil de detectar, reduce la producción de leche; además de que precede a la presentación clínica, de esta manera se constituye una reserva de microorganismos que transmiten la infección a otros animales en el hato.

Por otra parte, la presencia de las especies del género *Candida* en mastitis clínica de curso crónico se explica principalmente por su capacidad patogénica y a pesar de que no está bien definida esta capacidad quizá dependa de concentraciones séricas elevadas de hierro o potenciales de óxido-reducción. Por estudios

histoquímicos se ha encontrado que la superficie de la levadura tiene gran importancia durante el fenómeno de invasión y destrucción debido a la producción de fosfolipasas y quizá de enzimas hidrolíticas (2). Entre los factores de virulencia de *C. albicans*, se incluyen mayor capacidad de adherencia que al parecer es mayor en esta especie en comparación con otras especies de este mismo género, además de producción de proteasa, tolerancia a pH ácidos y formación de tubos germinativos (2,37). Añadiendo a esto, se ha reportado que hay un aumento en la concentración de ácido láctico en la leche, presumiblemente debido a la acción de *Streptococcus agalactiae* y otros microorganismos sobre la lactosa en mastitis hiperagudas ocasionado así una disminución en el pH de la leche, pudiendo favorecer así el crecimiento del género *Candida*. Sería de gran interés realizar estudios sobre la correlación de estos dos agentes etiológicos en problemas de mastitis hiperagudas (36,39). Por lo anterior se concuerda que las especies del género *Candida* se desarrollan según su grado de patogenicidad y las condiciones del medio externo que favorecen la proliferación de éstas. Así como existen diferentes agentes bacterianos de la misma manera existen diferentes agentes micóticos que intervienen en un problema de mastitis la cual afecta la producción del hato lechero y que finalmente repercute en el progreso económico de nuestro país. Es por eso que se recomienda llevar a cabo estudios micológicos más profundos que ayuden a identificar los agentes micóticos y su relación huésped-parásito que intervienen en el complejo mastitis.

CONCLUSIÓN

1. Los métodos y técnicas utilizados en este estudio mostraron ser adecuados para el aislamiento e identificación de las diferentes especies del género *Candida* a partir de muestras de leche con mastitis.
2. La presencia de levaduras del género *Candida* fue del 30.8%, al parecer se vio favorecida por el uso indiscriminado de antibióticos, condiciones de estrés y falta de higiene de los establos.
3. *C. guilliermondii* fue la especie más comúnmente aislada de casos con mastitis subclínica mientras que *C. albicans* fue la especie que se aisló en mayor porcentaje en casos con mastitis clínica de curso crónico.
4. No se observó relación de los aislamientos de las diferentes especies de *Candida* con la evolución de la mastitis micótica en los ranchos muestreados.

LITERATURA CITADA

- 1- Aisworth, G.C. and Austwick, P.K.C.: Fungal diseases of animals 2a.ed.
Commonwealth Agricultural Buresux Farnham Royal Slough, England
1973.
- 2- Arenas, R.: Micología Médica. Interamericana Mc. Graw Hill, México D.F. 1993.
- 3- Aretia, G.G., Cruz, S.T., García, V.Z.S. y Trejo, N.S.: Mastitis micótica bovina por *C. albicans*. Reunión nacional de investigación pecuaria (Memorias) Villahermosa, 1990, 24-25. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, 1990.
- 4- Bonifaz, A.: Micología Médica básica. Méndez. México, D.F., 1994.
- 5- Cano, H.G., Escamilla, G.I.: Situación de la Ganadería Lechera en México. XVI Congreso Nacional de Buiatría (Memorias), Veracruz, Ver. 1991. 369-379. AMMVER, México. D.F., (1991).
- 6- Carter, G.r.: Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 4a ed. Charles C. Thomas Publisher, Springfield Illinois., 1984.
- 7- Cervantes, O.R.A.: Principales agentes micóticos aislados en México como posibles causantes de mastitis. Primer Curso de Actualización sobre Mastitis Bovina (Memorias). México, D.F., 1978. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1978).

- 8- Colmenares, B.P.J.: Producción de leche de calidad. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México Cuautitlán Izcalli, Edo de México., 1995.
- 9- Cruz, A.M.: Mastitis clínicas de mayor frecuencia en nuestro medio. Temas Selectos sobre Fisiopatología de la Glándula Mamaria y Ordeño (Memorias). México, D.F., 62-76, 1990. División del sistema de universidad abierta. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., (1990).
- 10- Dawson, O.C.: Identification of *Candida albicans* in primary culture. Sabouraudia. J. Internal Soc. human and animal mycology. 1:(1)214-219, 1961.
- 11- De la Fuente, E.G.: Pérdidas económicas por mastitis en la producción lechera nacional. Curso sobre mastitis bovina (Memorias). México, D.F., 1983. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1983).
- 12- Ezeh, A.O., Makide, A.A., Ologun, A.G., Umo, I. and Calka, L. D.: Mycotic mastitis in a dairy herd. Bulletin of animal health and production in Africa. 35:356-357 (1987).
- 13- Flores, F.R., Manual de mastitis bovina. Universidad Nacional Autónoma de México México, D.F., 1988.

- 14- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario Estadístico de México, Subsector ganadero. Gobierno del Estado de México, México (1994).
- 15- Jansen, J.J.: Economic losses resulting from mastitis, a review. J. of Dairy Sci. 53: 9 (1970).
- 16- Kenneth, S.: El acuerdo de libre comercio: Implicaciones para la ganadería mexicana. Segundo congreso Internacional de la leche. (Memorias) Aguascalientes, Ags., 1992, 51-79. Grupo Industrial de la leche. S.A. C.V. Aguascalientes, Ags., México (1992).
- 17- Kimatura, H., Anri, A., Fuss, K., Seo, M and Itakura, C.: Chronic mastitis caused by *Candida maltosa* in a cow. Vet Path. 27: 465-466 (1990).
- 18- Kirk, J.H and Bartlett, P.C.: Bovine mycotic mastitis. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 8: F108-F110 (1986).
- 19- Kirk, J.H., Bartlett, P.C and Newman, J.P.: *Candida* mastitis in a dairy herd. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 8: F150-F152 (1986).
- 20- Lagunes, S. y Brewer, H.: Mastitis causada por un hongo del género *Geotrichum*. XI Reunión anual del I.N.I.P. (Memorias) México D.F. (1974).
- 21- Mackie, D.P; Neill, S.D; Rodgers, S.P; Lujan, E.F.: Treatment of *Candida krusei* mastitis with sulphamethoxypyridazine. Vet Rec. 120: 48 (1987).
- 22- Martínez, A.: Uso y abuso de los antibióticos. Hoard's Dairyman 442. Marzo (1995).

- 23- McDonald, J.S., Richard, J.L., Anderson, A.J and Fichtner, R.E.: In vitro antimycotic sensitivity of yeasts isolated from infected bovine mammary glands. Am. J. Vet. Res. **41**: 1987-1990 (1980).
- 24- Meresta, L; Meresta, T; Burdzinski, J; Chmurzynski, P.: Treatment of bovine mastitis with a propolis extract. Medycyna Weterynary JNA. **45**: 392-395 (1989).
- 25- Murillo, S.E.: Aislamiento e identificación de levaduras en leche de vacas clínicamente afectadas por mastitis. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1978.
- 26- Natalia, L. and Hestiano, S.: Mycotic mastitis due to *Candida albicans* in a cow. Pan. Hewan. **17**:30, 71-74, 1985.
- 27- National Mastitis Council Inc.: Laboratory and field handbook on bovine mastitis. University of New Hampshire Press Washington, D.C. (1987).
- 28- Odds, F.C.: *Candida* and candidosis. Leicester university, Park Press, Baltimore, USA 1979
- 29- Pérez, D.M., Campos, R.V.: Algunos procedimientos para la prevención y tratamiento de la mastitis. Fascículo 2. Manual sobre la glándula mamaria. Texcoco, Edo. de Méx. 9-17. Técnica y Productos Agropecuarios. (1987).
- 30- Pérez, D.M.: Generalidades sobre mastitis. Manual sobre la glándula mamaria I. Texcoco, Edo. de Méx. 1-8. Técnica y Productos Agropecuarios (1987).

- 31- Rahman, H. and Baxi, K.K.: Prevalence of *Candida albicans* in bovine mastitis. In: J. Microbiol. Immunol. Infec. Dis. 4: 1, 49-50, (1983).
- 32- Rey, F. M.: Incidencia de levaduras en la leche de abasto de la provincia de León. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria de León. Universidad de Oviedo. León, España 1972.
- 33- Richard, Ph.D.; Mc Donald, J.S.; Fichtner, R.E.; Anderson, A.J.: Identification of yeasts from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. Am. J. Vet. Res. 41: 12 1991-1994 (1980).
- 34- Rippon, J.W., y Castañeda, L.T.R.: Micología Médica, Hongos y Actinomicetos patógenos. 3a ed. Mc.Graw-Hill 1990.
- 35- Rojano, F.U. Frecuencia e Identificación de especies de levaduras aisladas de leche de vacas con mastitis. XVI Congreso Nacional de Buiatría. (Memorias) Veracruz, Ver. 1991. 444-446. AMMYEB. México D.F., (1991).
- 36- Ruiz, S.H.: Pruebas usadas en la detección de mastitis subclínica. Temas selectos en fisiopatología de la glándula mamaria y ordeño (Memorias). México D.F. 1990. División del sistema de universidad abierta. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. (1990).
- 37- Salas, T.E.: Obtención de antígenos de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* para el desarrollo de pruebas diagnósticas. Tesis de maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México., 1995.

- 38- Saxena, S.C.: Antimycotic-antibacterial therapy for bovine puerperal infections and mastitis clinical and microbial evaluation. Indian Vet J. 53: 717-720 (1976).
- 39- Schaiman, O.W., Carroll, E.J. and Jain, N.C.: Bovine Mastitis. Lea & Febiger Philadelphia, 1971.
- 40- Sebyakov, E.V., Parakin, V.K. and Voronyanskii, V.P.: *Candida* mycosis in cattle and swine. Veterinariya Moscow, 3, 43-46, 1984.
- 41- Secretaría de gobernación y gobierno del Edo. de México.: Enciclopedia de los municipios del Edo. de México. Centro Nacional de estudios municipales México. D.F., (1988).
- 42- Segundo, Z.C.: Manual teórico práctico de micología médica para la carrera de Q.F.B. (Prácticas y Alternativas). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. 1991.
- 43- Stevens, F.L.: Aislamiento e identificación de hongos patógenos de leches procedentes de bovinos con mastitis. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1985.
- 44- Trejo, J.R.: Consideraciones económicas de los efectos de la mastitis sobre la producción de la leche. Primer curso de actualización sobre mastitis bovina. (Memorias). México D.F., 1981. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México México D.F., 1981.

- 45- Van Damme, D.M.: Use of miconazole in treatment for bovine mastitis. Vet. Med. Small Anim. Clin. 78: 1425-1427 (1983).
- 46- Yeo, S.G., Chol, W.P., Sang, G.Y and Won, L.C.: Studies on yeast like fungi associated with bovine mastitis. 1. Epidemiological study. 2. Sensitivity of yeast like fungi to antifungal agents. Korean J. Vet. Res. 22: 121-147 (1982).
- 47- Zavala, S.I.: Incidencia de los géneros *Mucor*, *Aspergillus* y *Penicillium* en leches procedentes de bovinos con mastitis. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 1986.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Apéndice I

Caldo dextrosa sabouraud

Preparación:

Suspender 30 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme la cual a su vez se ajusta con ácido clorhídrico al 6N a un pH de 3.5 con ayuda del potenciómetro, posteriormente se colocan 10 ml del medio preparado en tubos de 13 x 100 y se esteriliza a 15 libras, 15 minutos a 121° C (41).

Apéndice II

Ager Dextrosa Sabouraud (SDA)

Preparación:

Suspender 65 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada mezclar bien hasta obtener una suspensión uniforme, calentar agitando frecuentemente y se deja hervir durante un minuto, se esteriliza a 15 libras, 15 minutos a 121° C posteriormente se colocaron en cajas de petri, 30 ml del medio ya preparado (41).

Pruebas de esterilidad.

Esta prueba consistió en colocar las cajas y tubos en una incubadora por 24 horas a 37° C para confirmar que los medios estuvieran libres de contaminantes.

Apéndice III

Tolerancia a pH ácido

Procedimiento:

Solución A:

Suspender 50 g de Agar Czapek Dox en 1000 ml de agua destilada, mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme, se calienta agitando frecuentemente y se deja hervir durante un minuto, posteriormente se esteriliza a 121°C 15 lb 15 min.

Solución B:

Consistió en un compuesto de fosfatos y dextrosa disueltos en agua destilada la cual a su vez se ajustó con HCl 6N al pH deseado (1.1, 1.2, 1.3) con ayuda del potenciómetro. La fórmula recomienda:

| | |
|---------------------------|---------|
| Na_2HPO_4 | 9.438 g |
| KH_2PO_4 | 9.073 g |
| Dextrosa | 10.0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

La solución final se esterilizó por filtración con filtro Millipore (.22), añadiéndose a la solución A en la siguiente proporción: por cada 180 ml de A se adicionó 20 ml de B. El medio se vació en cajas de Petri (8.5 cm de diámetro). Se dejó solidificar y se sometieron a prueba de esterilidad (4.6.41).

Apéndice IV

Producción de clamidosporas

Agar de Czapek Dox + Tween 80

Preparación:

Suspender 50 gramos del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada y mezclarlo agitando vigorosamente, posteriormente se adiciona 10 ml del Tween 80, mezclar y agitar. Calentar con agitación frecuente por espacio de un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos. Enfriar y vaciar a cajas de Petri. Dejar solidificar a temperatura ambiente. El pH final es de 5.6 a 6.2 a 25°C a temperatura ambiente.

Agar Corn Meal + Tween 80

Preparación:

Suspender 17 g del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada y mezclarlo vigorosamente, posteriormente se debe calentar a ebullición con agitación frecuente hasta que se disuelva completamente, adicionar en caliente 10 ml de tween 80 y mezclar, esterilizar por autoclave a 121°C. 15 lb 15 min, dejar enfriar aproximadamente a 45-50°C y vaciar en cajas de petri estériles dejando solidificar a T° ambiente. El pH final es de 5.6 a 6.2 a T° ambiente (6,41).

Apéndice V

Fermentación de carbohidratos o Zimograma

Preparación:

Suspender 16 g de base caldo rojo de fenol en 1000 ml de agua destilada, agitar fuertemente hasta obtener una suspensión homogénea, esterilizar en autoclave a 15 lb 15 min 121 °C.

Asimilación de carbohidratos o Auxonograma

Preparación:

Suspender 16 g de Base caldo rojo de fenol en 1000 ml de agua destilada, agitar fuertemente hasta obtener una suspensión homogénea, esterilizar en autoclave a 15 lb 15 min 121 °C. una vez que se haya enfriado se agrega la solución de carbohidratos a probar, para esto se utilizaron 12 azúcares: glucosa, sacarosa, lactosa adicionándose a una concentración del 1% mientras que la maltosa, galactosa, melobiosa, celobiosa, inositol, xilosa, rafinosa, manitol y dulcitol a una concentración final de 0.5%.

CUADRO 1

UBICACIÓN DE LOS RANCHOS Y CÁLCULO DE MASTITIS ESPERADO

| RANCHO | VACAS EN PRODUCCIÓN | % MASTITIS ESPERADO | VACAS CON MASTITIS | MUNICIPIO | LOCALIZACIÓN | CLIMA |
|--------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------------|---|---|
| 1 | 202 | 40 | 81 | Cuauhtlán de Romero Rubio | Latitud norte 18° 43' 20", longitud oeste 99° 10' 44", altitud media 2,400 msnm | Templado, subhúmedo, con lluvias en verano, temperatura media anual 18°C y precipitación pluvial 600 mm. |
| 2 | 463 | 25 | 116 | Melchor Ocampo | Latitud norte 18° 43' 20", longitud oeste 99° 08' 40", altitud media 2,300 msnm | Templado, subhúmedo, con lluvias en verano, temperatura máxima anual de 31°C y mínima de 1.8°C con precipitación pluvial de 900 mm. |
| 3 | 607 | 18 | 145 | Huapochtlán | Latitud norte 19° 20' 00", longitud oeste 98° 02' 20", altitud de 2,500 msnm. | Templado, subhúmedo con lluvias en verano, precipitación pluvial de 587.1 mm |
| 4 | 320 | 20 | 64 | Zumpango | Sitio entre los 18° 43' 20" y 18° 47' 40" de latitud norte, 99° 07' 20" y 99° 11' 00" de longitud oeste y a 2,400 msnm | Templado, subhúmedo, con lluvias en verano, temperatura máxima de 31°C y mínima de 2.3°C. La precipitación pluvial es de 617.91 mm. |
| 5 | 320 | 20 | 64 | Ahualulco | Entre las paradas 20° 01' y 20° 06' de latitud norte y entre las 99° 06' y 99° 10' de longitud oeste, a una altura de 2,873 msnm. | Templado, con temperatura anual de 18.86 y precipitación pluvial de 947 mm. |

Se considera que de los 5 ranchos de un total de 470 vacas con mastitis representando el 22% de mastitis esperado.

CUADRO 2

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SECRECIÓN DE GLÁNDULAS MAMARIAS DE VACAS CON MASTITIS SUBCLÍNICA Y CLÍNICA DE CURSO CRÓNICO

| | MASTITIS SUBCLÍNICAS | | MASTITIS CRÓNICAS | | | |
|--------------|-------------------------|------------|----------------------|-----------|------------------------------------|--------------------------------------|
| RANCHO | VACAS | CUARTOS | VACAS | CUARTOS | TOTAL DE VACAS POR RANCHO | TOTAL DE CUARTOS POR RANCHO |
| 1 | 15 | 29 | 10 | 31 | 25 | 60 |
| 2 | 42 | 58 | 8 | 6 | 50 | 64 |
| 3 | 18 | 19 | 9 | 9 | 25 | 28 |
| 4 | 24 | 25 | 8 | 10 | 32 | 35 |
| 5 | 17 | 17 | 7 | 7 | 24 | 24 |
| TOTAL | 114 | 148 | 42 | 63 | 156 | 211 |

CUADRO 3

AISLAMIENTO DE LEVADURAS EN MASTITIS SUBCLÍNICA Y MASTITIS CLÍNICA DE CURSO CRÓNICO

| TIPO DE MASTITIS | POSITIVAS | NEGATIVAS | TOTAL | % POR TIPO DE MASTITIS | % TOTAL DE LEVADURAS |
|------------------|-----------|-----------|-------|------------------------|----------------------|
| SUBCLÍNICA | 38 | 110 | 148 | 25.67 | 18 |
| CRÓNICA | 27 | 36 | 63 | 42.86 | 12.8 |
| TOTAL | 65 | 146 | 211 | | 30.8 |

CUADRO 4

FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS DE ESPECIES DEL GÉNERO *Candida* POR ESTABLO

| RANCHO | MASTITIS SUBCLÍNICA | N. DE AISLAMIENTO | TOTAL POR RANCHO | % | MASTITIS CRÓNICA | N. DE AISLAMIENTO | TOTAL POR RANCHO | % | | |
|------------------------|--------------------------|-------------------|------------------|------|--------------------------|-------------------|------------------|------|--------------------------|---|
| CUAUTITLÁN (8) | | 0 | 0 | 0 | <i>C. albicans</i> | 8 | 8 | 100 | | |
| MELCHOR OCAMPO (28) | <i>C. albicans</i> | 1 | 22 | 78.6 | | | 8 | 21.5 | | |
| | <i>C. kefyr</i> | 7 | | | | | | | | |
| | <i>C. parapsilosis</i> | 3 | | | | | | | | |
| | <i>C. tropicalis</i> | 3 | | | | | | | <i>C. tropicalis</i> | 5 |
| | <i>C. guilliermondii</i> | 7 | | | | | | | <i>C. guilliermondii</i> | 1 |
| | <i>C. norvegicensis</i> | 1 | | | | | | | | |
| HUEHUAPULTLA (7) | <i>C. guilliermondii</i> | 4 | 4 | 87.1 | <i>C. guilliermondii</i> | 2 | 3 | 42.9 | | |
| | | | | | <i>C. albicans</i> | 1 | | | | |
| ZUMPANGO (17) | <i>C. guilliermondii</i> | 7 | 9 | 82.9 | <i>C. guilliermondii</i> | 2 | 8 | 47.1 | | |
| | <i>C. albicans</i> | 2 | | | <i>C. kefyr</i> | 5 | | | | |
| | | | | | <i>C. parapsilosis</i> | 1 | | | | |
| ATITALAQUA (5) | <i>C. guilliermondii</i> | 2 | 3 | 60 | <i>C. parapsilosis</i> | 2 | 2 | 7.7 | | |
| | <i>C. parapsilosis</i> | 1 | | | | | | | | |

CUADRO 5

FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS DE ESPECIES DEL GÉNERO *Candida* EN MASTITIS SUBCLÍNICA Y MASTITIS CLÍNICA DE CURSO CRÓNICO

| TIPO DE MASTITIS | LEVADURA | No DE AISLAMIENTOS |
|--|-------------------------|--------------------|
| SUBCLÍNICAS 38 AISLAMIENTOS | <i>C. guillemontii</i> | 20 (52.6 %) |
| | <i>C. kefyr</i> | 7 (18.4 %) |
| | <i>C. parapsilopsis</i> | 4 (10.5 %) |
| | <i>C. albicans</i> | 3 (7.9 %) |
| | <i>C. tropicalis</i> | 3 (7.9 %) |
| | <i>C. norvogenensis</i> | 1 (2.7 %) |
| CRÓNICAS 27 AISLAMIENTOS | <i>C. guillemontii</i> | 5 (18.5 %) |
| | <i>C. kefyr</i> | 5 (18.5 %) |
| | <i>C. parapsilopsis</i> | 3 (11.2 %) |
| | <i>C. albicans</i> | 9 (33.3 %) |
| | <i>C. tropicalis</i> | 5 (18.5 %) |