



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICÓTICA
DE DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*
OBTENIDOS DE LECHE DE BOVINOS Y CAPRINOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:
GUADALUPE FLORES ARIZMENDI**

**ASESORA:
DRA. CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA**



Ciudad Universitaria, CDMX.

2023



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.

Dedicatorias.

A mi madre Feliciano Arizmendi Navarrete, la mejor madre que me pudo tocar, la mujer que más admiro, quién siempre ha estado a mi lado dándome el amor más puro y sincero y ha estado dispuesta a apoyarme en todo.

A mi padre Pantaleón Flores Sánchez, por impulsarme a lograr mis metas, por todo tu apoyo e inculcarme junto con mi madre que no hay imposibles.

Gracias a ustedes, mis padres, por su sacrificio y amor, he logrado llegar donde estoy y ser la persona que soy y aunque aún queda un largo camino por recorrer, esta tesis es solo una pequeña muestra de lo que he podido lograr, gracias a ustedes "mis héroes". Los amo.

A Coco mi fiel compañero canino, mi paciente modelo y una de mis mayores inspiraciones a lo largo de mi carrera. Tu amor y lealtad han sido una fuente inagotable de motivación para mí.

A César Enrique Flores Cisneros, mi mejor amigo y compañero de aventuras, por estar en las buenas celebrando más que yo mis logros y en las malas levantándome cada que siento que el mundo se me viene encima. Agradezco que hayas llegado a mi vida a resignificar la palabra "amor", a darme siempre tu apoyo incondicional e impulsándome a ser siempre la mejor versión de mí. Te amo.

A mi hermano Antonio Flores Arizmendi, por ser mi ejemplo de perseverancia y superación pues tu discapacidad nunca ha sido un obstáculo para ti, al contrario, has demostrado una fuerza y determinación admirables para alcanzar tus metas y ser alguien en la vida.

A mi cuñada Edith Morales, gracias por estar ahí cuando lo necesito y por tus sabias palabras, sabes que eres como una hermana para mí, te agradezco por darme junto con mi hermano a esos tres pequeños.

A Alexa, Emiliano y Julia mis tres pequeños sobrinos, a través de ustedes he aprendido la importancia de la paciencia, me han impulsado a ser mejor persona con el objetivo dejarles un mundo mejor. Los quiero con el corazón y espero seguir siendo parte de sus vidas mientras crecen y se convierten en personas maravillosas.

Agradecimientos

Dra. Carolina Segundo Zaragoza gracias por confiar en mí para realizar este proyecto, por todas las facilidades que me dio, en lo académico y lo no académico.

Agradezco su paciencia y cariño con el cual me enseñó un mundo (fungí) prácticamente desconocido para mí y resultó ser maravilloso. Por ser una excelente mentora y hacer que reafirmara mi amor por la microbiología. Por abrirme las puertas de su laboratorio el cual yo llamé "mi lugar feliz". Por tomarse el tiempo de asesorarme en cada uno de los pasos que conllevo este proyecto. Es por todo esto y más que admiro la gran persona que es.

Samantha P. Llanos Salinas y Alejandra Morales Murillo, el dormitorio 1 del CEIEPAA nos hizo roomies pero la vida se ha encargado de volvernos hermanas. Gracias por su amistad, cariño y apoyo constante. Se han vuelto parte importante de mi vida. Siempre tendré en mi corazón los momentos tan divertidos y experiencias que le dieron y siguen dando a mi vida. ¡Las quiero mucho!

Alfredo Pérez, aunque la vida te llevó por otro rumbo mejor para ti, agradezco tu apoyo y los momentos inolvidables que vivimos Sam, tú y yo. Ambos son ejemplo de lo que algún día me gustaría llegar a ser.

Daniel Alquisira, mi primer amigo fuera del dormitorio 1, gracias por tus palabras de apoyo cuando más frustrada estaba por sentir que no avanzaba, al final se logró.

Mis amigos con los que sigo teniendo contacto e incluso con los que no, gracias por los momentos, las risas y las experiencias, los llevo en mi mente.

A la familia Flores Cisneros, en ustedes he encontrado una segunda familia, gracias por abrazarme como parte de ustedes, por su apoyo y cariño.

A todo el personal del CEIEPAA y la USEDICO, por las facilidades dadas durante mi estancia en sus instalaciones, sin duda son parte importante de este trabajo.

A mi primo Rogelio Catalán Sánchez, por ser mi primer acercamiento real a la Medicina Veterinaria y Zootecnia, gracias por contarme tus experiencias por las cuales decidí estudiar esta hermosa carrera.

A mis sinodales quienes se tomaron el tiempo de revisar y enriquecer con sus conocimientos y experiencia mi trabajo.

Agradecimiento especial al Dr. Ángel Rosendo Pulido Albores por su apoyo en el análisis estadístico.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a la Universidad Nacional Autónoma de México ¡gracias por tanto!

El presente trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) PE 205522 “Desarrollo de estrategias multimedia para la elaboración, adecuación y mejora de los recursos en Micología Veterinaria. Segunda parte”.

La sustentante recibió beca otorgada por el Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME), proyecto PE205522.

Contenido

Tema	Página
Dedicatorias	II
Agradecimientos	III
Contenido	VI
Índice de figuras	VIII
Índice de cuadros	X
Resumen	1
1. Introducción.	2
1.1. Generalidades de la leche de vaca y cabra.	2
1.2. Afecciones de la glándula mamaria: mastitis.	3
1.2.1. Mastitis micótica.	4
1.3. Género <i>Candida</i>.	5
1.3.1. Identificación micológica de especies del género <i>Candida</i>.	6
1.4. Susceptibilidad antimicótica del género <i>Candida</i>.	6
1.5. Sustancias con actividad antimicótica.	7
1.6. Fármacos antimicóticos.	7
1.6.1. Antimicóticos que actúan a nivel de pared celular.	10
1.6.1.1. Equinocandinas	10
1.6.2. Antimicóticos que actúan a nivel de membrana citoplasmática	11
1.6.2.1. Polienos macrólidos	11
1.6.2.2. Azoles	14
1.6.2.2.1. Imidazoles	15
1.6.2.2.2. Triazoles	16
1.6.2.3. Alilaminas	18
1.6.3. Antimicóticos que actúan a nivel de ácidos nucleicos.	19
1.6.3.1. Flucitosina (5-fluorocitosina)	19
1.6.3.2. Griseofulvina	21
1.7. Pruebas de susceptibilidad a antimicóticos	22
1.7.1. Dilución en caldo para levaduras	23
1.7.2. Microdilución en caldo para levaduras	23
2. Hipótesis	24
3. Objetivo	24
4. Materiales y métodos	24
4.1. Obtención de aislados de especies del género <i>Candida</i>	24
4.2. Cepas de referencia	25
4.3. Reactivación de aislados	25
4.4. Confirmación de pureza e identificación de aislados	26
4.4.1. Tinción de Gram	26
4.4.2. Identificación de especies del género <i>Candida</i> de los aislados de leche de vaca	27

4.4.3.	Formación de pseudohifas	27
4.4.4.	Sensibilidad a la cicloheximida 0.1%	27
4.4.5.	Asimilación y fermentación de carbohidratos	28
4.4.6.	Medios selectivos y diferenciales	28
4.5.	Conservación de aislados de <i>Candida</i>	35
4.6.	Prueba de susceptibilidad a antimicóticos	35
4.6.1.	Preparación de soluciones de antimicóticos	35
4.6.2.	Preparación del inóculo	36
4.6.3.	Procedimiento del método de microdilución en placa	36
4.6.4.	Lectura de resultados	38
4.7.	Análisis de información	40
5.	Resultados	41
5.1.	Reactivación de aislados de especies del género <i>Candida</i>	41
5.2.	Identificación de especies del género <i>Candida</i> a partir de leches de vacas	41
5.2.1.	Formación de pseudohifas	44
5.2.2.	Desarrollo en cicloheximida al 0.1%	44
5.2.3.	Asimilación y fermentación de carbohidratos	45
5.2.4.	Cultivo en CHROMagar y agar BIGGY	46
5.3.	Pruebas de susceptibilidad a antimicóticos	50
6.	Discusión	76
7.	Conclusiones	81
8.	Anexos	82
9.	Referencias	90

Índice de figuras

No	Descripción	Página
1	Morfogénesis de <i>C. albicans</i>	5
2	Línea del tiempo de aprobación de los principales fármacos antimicóticos	8
3	Clasificación de los antimicóticos de acuerdo con su sitio de acción	9
4	Sitio y mecanismo de acción de los antimicóticos en la célula fúngica	9
5	Mecanismo de acción de las equinocandinas	10
6	Mecanismo de acción de los polienos macrólidos	12
7	Mecanismo de acción de los azoles	15
8	Mecanismo de acción de las alilaminas (terbinafina y naftifina)	19
9	Mecanismo de acción de la 5-fluorocitosina	20
10	Mecanismo de acción de la griseofulvina	22
11	Preparación del inóculo de las levaduras a utilizar en el ensayo de susceptibilidad por el método de microdilución en placa	36
12	Representación del llenado de placas para la prueba de susceptibilidad antimicótica por el método de microdilución en placa.	37
13	Morfología macroscópica de cepas de referencia del género <i>Candida</i> desarrolladas en SDA de 24 a 48h a 37°C	42
14	Morfología microscópica de cepas de referencia del género <i>Candida</i> teñidas con tinción de Gram.	43
15	Formación de pseudohifas en agar arroz a 37°C durante 72 horas	44
16	Prueba de susceptibilidad a cicloheximida al 0.1%.	45
17	Asimilación y fermentación de carbohidratos de un aislado problema.	46
18	Desarrollo de las cepas de referencia del género <i>Candida</i> en CHROMagar y agar BIGGY.	47-48
19	Ejemplo de algunos de los aislados de muestras de leche de vaca en CHROMagar y Agar BIGGY.	49
20	Prueba de susceptibilidad antimicótica a la 5- fluorocitosina de cepas de referencia	52
21	Prueba de susceptibilidad antimicótica a anfotericina B de cepas de referencia	53
22	Prueba de susceptibilidad antimicótica a fluconazol de cepas de referencia	53
23	Prueba de susceptibilidad antimicótica a itraconazol de cepas de referencia	54
24	Prueba de susceptibilidad antimicótica a ketoconazol de cepas de referencia	54
25	Prueba de susceptibilidad antimicótica a posaconazol de cepas de referencia	55
26	Prueba de susceptibilidad antimicótica a voriconazol de cepas de referencia	55
27 A	Prueba de susceptibilidad a 5 fluorocitosina. Aislados de <i>C. guilliermondii</i> obtenidos de leche cabras sanas	58

27 B	Prueba de susceptibilidad a anfotericina B. Aislados de <i>C. guilliermondii</i> obtenidos de leche cabras sanas	58
27 C	Prueba de susceptibilidad a Fluconazol. Aislados de <i>C. guilliermondii</i> obtenidos de leche cabras sanas	59
27 D	Prueba de susceptibilidad a Itraconazol. Aislados de <i>C. guilliermondii</i> obtenidos de leche cabras sanas	59
27 E	Prueba de susceptibilidad a ketoconazol. Aislados de <i>C. guilliermondii</i> obtenidos de leche cabras sanas	60
27 F	Prueba de susceptibilidad a posaconazol. Aislados de <i>C. guilliermondii</i> obtenidos de leche cabras sanas	61
27 G	Pruebas de susceptibilidad a voriconazol. Aislados de <i>C. guilliermondii</i> obtenidos de leche cabras sanas	60
28 A	Pruebas de susceptibilidad a 5 Fluorocitosina. Aislados de <i>C. glabrata</i> obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios	65
28 B	Prueba de susceptibilidad a anfotericina B. Aislados de <i>C. glabrata</i> obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios	65
28 C	Prueba de susceptibilidad a fluconazol. Aislados de <i>C. glabrata</i> obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios	66
28 D	Prueba de susceptibilidad a itraconazol. Aislados de <i>C. glabrata</i> obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios	66
28 E	Prueba de susceptibilidad a ketoconazol. Aislados de <i>C. glabrata</i> obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios	67
28 F	Prueba de susceptibilidad a posaconazol. Aislados de <i>C. glabrata</i> obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios	67
28 G	Prueba de susceptibilidad a voriconazol. Aislados de <i>C. glabrata</i> obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios.	68
29	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>C. guilliermondii</i> provenientes de leche de cabras.	69
30	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>C. kefyr</i> provenientes de leche de cabras.	70
31	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>C. famata</i> provenientes de leche de cabras.	71
32	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>Candida</i> spp. provenientes de leche de cabras.	71
33	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>C. glabrata</i> provenientes de leche de vacas.	72
34	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>C. zeylanoides</i> provenientes de leche de vacas con mastitis subclínica.	73
35	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>C. krusei</i> provenientes de leche de vacas.	74
36	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>Candida</i> spp. provenientes de leche de vaca.	75

Índice de cuadros

No	Descripción	Página
1	Origen de las especies del género <i>Candida</i> utilizadas en el estudio.	25
2	Interpretación del desarrollo en medio CHROMagar <i>Candida</i> de algunas especies del género <i>Candida</i> .	29
3	Interpretación del desarrollo en agar BIGGY de algunas especies del género <i>Candida</i> .	31
4	Características de especies del género <i>Candida</i> utilizadas en su identificación	32
5	Asimilación y fermentación de carbohidratos de especies del género <i>Candida</i>	34
6	Antimicóticos utilizados, concentraciones y disolventes recomendados.	35
7	Intervalos de las CMI de los antimicóticos utilizados para las cepas de control de calidad a las 24 y 48h, obtenidos por el método de microdilución en placa	38
8	Puntos de corte en $\mu\text{g/ml}$ según el CLSI	40
9	Reactivación de aislados de las diversas especies del género <i>Candida</i>	41
10	Identificación de las especies del género <i>Candida</i> aisladas de la leche de vacas clínicamente sanas y con mastitis clínica y subclínica.	50
11	Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las cepas de control de calidad utilizadas.	51
12	Resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicótica de las cepas de referencia.	51
13	Patrones de susceptibilidad de las especies del género <i>Candida</i> obtenidos de la leche de cabras clínicamente sanas	57
14	Patrones de susceptibilidad de las especies del género <i>Candida</i> obtenidos de la leche de vacas clínicamente sanas y con mastitis subclínica y clínica	64

RESUMEN

FLORES ARIZMENDI GUADALUPE. Evaluación de la susceptibilidad antimicótica de diferentes especies del género *Candida* obtenidos de leche de bovinos y caprinos (bajo la dirección de: Dra. Carolina Segundo Zaragoza).

La leche es un nutriente importante de la dieta de los seres humanos, siendo las leches de vaca y cabra las de mayor producción y demanda en México. Una de las afecciones más frecuentes del ganado lechero, son los problemas de mastitis, y la mastitis micótica ha ido en aumento en las últimas dos décadas, encontrándose principalmente especies del género *Candida*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la susceptibilidad antimicótica de especies del género *Candida* obtenidas de la leche de bovinos y caprinos, mediante el método de microdilución en placa, para conocer el patrón de susceptibilidad y posible correlación con el estado clínico. Se trabajaron 171 aislados de especies del género *Candida* obtenidos de la leche de cabras clínicamente sanas, identificadas como: 67 de *C. guilliermondii*, 56 de *C. kefyr*, 40 de *C. famata* y 8 *Candida* spp. Asimismo, se identificaron 25 aislados de la leche de vacas con mastitis clínica, 32 de vacas clínicamente sanas, y 41 con mastitis subclínica. La identificación de las levaduras se realizó por medio de: tinción de Gram, formación de pseudohifas, desarrollo en cicloheximida al 0.1%, asimilación y fermentación de carbohidratos y siembra en CHROMagar *Candida* y agar BIGGY. La prueba de susceptibilidad antimicótica se realizó para los 269 aislados mediante el método de microdilución en placa. Las especies identificadas de las leches de vacas fueron, *C. glabrata* (68 aislados), *C. zeylanoides* (11), *C. krusei* (7) y *C. parapsilosis* (1), *C. lusitaniae* (1), *C. bombi* (1) y *Candida* spp (9) Con relación a las pruebas de susceptibilidad antimicótica, los resultados obtenidos no tuvieron correlación con el estado sanitario y los aislados de *C. krusei* y *C. glabrata* presentaron resistencia a azoles de primera y segunda generación.

1. Introducción

La leche es uno de los principales nutrientes de la alimentación humana y animal. (1) A nivel mundial la leche que más se consume es la vaca, sin embargo, en las últimas dos décadas se ha incrementado el consumo de otras leches y sus subproductos, como es el caso de las cabras, las ovejas y las búfalas. (2) En los hatos lecheros los animales son susceptibles de padecer algún proceso infeccioso durante su vida productiva, como es el caso de las mastitis, las cuales pueden ser ocasionadas por patógenos primarios y oportunistas. (3, 4, 5) Con relación a los agentes oportunistas, las levaduras del género *Candida* se han reportado principalmente en cabras y vacas tanto clínicamente sanas como con mastitis subclínica y clínica (6). El tratamiento para los casos de mastitis micótica puede ser complicado por el costo y su duración, en animales en producción son factores para considerar al establecer un régimen terapéutico. Aunado a ello, las opciones terapéuticas para casos de mastitis micótica son limitadas, y en parte se debe al desconocimiento que existe con relación al comportamiento que las especies del género *Candida* presentan ante los antimicóticos más utilizados principalmente en humanos. El conocer este comportamiento, puede ser una alternativa futura para el desarrollo de fármacos de fácil acceso, baratos y eficaces para el tratamiento de las mastitis causadas por este género micótico.

1.1 Generalidades de la leche de vaca y cabra.

La leche por definición es la secreción natural proveniente de las glándulas mamarias de mamíferos que es destinada a alimentar a sus crías, excluyendo la primera fracción láctea que producen los primeros días y que corresponde al calostro. El proceso de producción de la leche en el animal involucra un importante gasto de energía, por ejemplo, en vacas debe circular entre 400 a 500 kg de sangre por la ubre para producir un kilogramo de leche (1).

Históricamente se ha consumido la leche de diversas especies animales diferentes a la humana. Los primeros indicios del consumo de leche de vaca data desde el año 3100 años a. E. (antes de nuestra era) ya que en la ciudad de Ur (antiguo centro de

Mesopotamia) durante las excavaciones, se encontró evidencia pictórica de un hombre sentado en un taburete apretando los pezones de una vaca y recolectando la leche en un balde. (7).

En la actualidad, la leche que más se consume en el mundo proviene principalmente de las vacas (85%), y en menor cantidad de búfalas, cabras, ovejas y camellas (2).

En México, las dos especies que se destinan principalmente a la producción láctea son las vacas y las cabras. De acuerdo con datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) en el 2021 hubo una producción anual de leche de vaca de 12 867 364 litros y de leche de cabra de 166 546 litros (8).

1.2 Afecciones de la glándula mamaria: Mastitis

La mastitis se define como la inflamación del tejido de la glándula mamaria, la cual ocurre cuando se infiltran leucocitos al mismo, generalmente en respuesta a la invasión de microorganismos que infectan a través del canal del pezón, afectan a la producción de la leche y pueden producir cambios patológicos, incluyendo hinchazón, dolor, edema y fibrosis. La mastitis puede ser ocasionada por mecanismos físicos o químicos los cuales predisponen a la colonización por microorganismos (9,10).

En términos generales, la mastitis se clasifica en subclínica y clínica. En la primera, la glándula mamaria tiene una apariencia normal, sin embargo, existe un aumento en el recuento de células somáticas, mayor contaminación bacteriana en la leche, disminución de la producción láctea y cambios en composición y calidad de esta. En los casos clínicos, hay signos visibles en la glándula mamaria, como el enrojecimiento e inflamación de las áreas afectadas, dolor, pérdida de apetito, aumento de temperatura corporal y reducción en la producción de leche (10).

Esta enfermedad del ganado lechero es la de mayor impacto económico, ya que provoca disminución en la calidad y producción de la leche, aumento en costos de atención médica y mayores tasas de sacrificio y muerte (11). Entre los microorganismos que se han asociado a la mastitis, las bacterias se reconocen

como patógenos primarios. Algunos ejemplos son: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Shigella spp.*, *Bacillus spp.*, *Edwardisela spp.*, *Sarcina spp.*, *Providencia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Corynebacterium spp.* y *Nocardia spp.* Otros agentes involucrados son los hongos, que generalmente se manifiestan como agentes secundarios u oportunistas (3, 4, 5).

1.2.1 Mastitis micótica

Algunos géneros micóticos, tienen la característica de ser organismos oportunistas cuando los mecanismos de defensa del sistema inmune del animal se encuentran disminuidos. Los hongos que ocasionan mastitis micótica pueden estar presentes en el ambiente, en el agua, el suelo, el polvo, las manos del ordeñador, el equipo de ordeño, y productos de limpieza, que al entrar en contacto con la ubre la pueden colonizar el tejido glandular. Además, la colonización puede verse favorecida por el uso de jeringas contaminadas, cánulas y preparaciones de antibióticos contaminados. (10, 12).

Actualmente hay un aumento de casos de mastitis micótica como consecuencia del uso indiscriminado de antibióticos para tratar mastitis bacterianas y el uso de medicamentos esteroidales sin una causa justificada para su uso.

Entre los géneros de hongos frecuentemente aislados en las mastitis micóticas se incluyen a: *Aspergillus spp.*, *Alternaria spp.*, *Aerobasidium spp.*, *Geotrichum spp.*, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Rhodotorula spp.* y *Trichosporum spp.* Diversas especies del género *Candida* son las más aisladas en animales clínicamente sanos y con mastitis clínica y subclínica (12).

Las principales especies aisladas de este género micótico son: *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. norvegica*, *C. viswanathii*, *C. intermedia*, *C. macedoniensis*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides*, *C. famata* y *C. lusitaniae* (13, 14, 15).

1.3 Género *Candida*

Las primeras levaduras de este género fueron descritas por Berkhout en 1923, y actualmente se han descrito más de 200 especies. (16)

Las especies del género *Candida* se desarrollan rápidamente en agar Sabouraud. Sus colonias pueden medir de 2 a 4 mm, con apariencia de lisa a rugosa, de consistencia cremosa a seca y generalmente de color blanco a beige. (16, 17)

Microscópicamente, las especies de *Candida* forman blastoconidios, cuyo tamaño oscila entre 3 a 6 μm , pueden ser redondos, ovalados o alargados. (16,17)

La mayoría de las especies forman pseudohifas, estructuras que permiten a la levadura invadir los tejidos del huésped, con excepción de *C. glabrata*, que es la única especie de este género que no forma estas estructuras (16, 17, 18). (Figura 1)

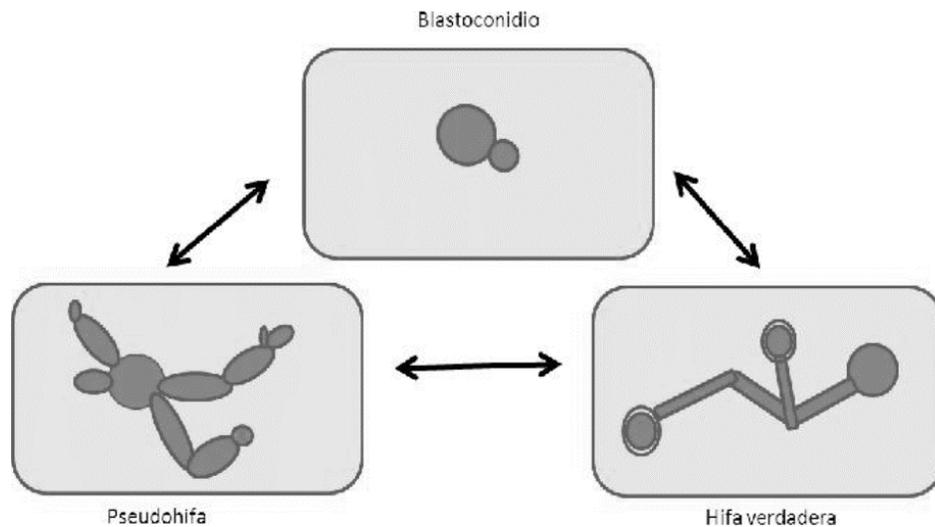


Figura 1. Morfogénesis de *C. albicans*. La transición morfológica de *C. albicans* se considera reversible entre los blastoconidios, las pseudohifas e hifas verdaderas. Adaptado de "Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*" Berman J. 2006. (19)

1.3.1 Identificación micológica de especies del género *Candida*.

Para la identificación de levaduras del género *Candida* se requiere evaluar las características morfológicas y bioquímicas, como: forma de los blastoconidios, formación de pseudohifas, tubos germinativos y clamidoconidios, desarrollo a diferentes temperaturas, desarrollo en presencia de cicloheximida al 0.1%, formación de biopelícula, fermentación y asimilación de carbohidratos. Además, el uso de medios diferenciales o selectivos, como es el caso del CHROMagar *Candida* y el agar BIGGY, pueden auxiliar en la identificación final (20, 21, 22).

1.4 Susceptibilidad antimicótica de especies del género *Candida*.

La información relacionada con el tratamiento específico en casos de mastitis micótica causadas por las especies del género *Candida* es escasa. Algunos autores han utilizado diversos tratamientos de forma experimental, ya sea por vía intramamaria y vía oral.

Se han utilizado tratamientos por infusión intramamaria como la natamicina, la cual se ha usado a 20 ml de solución al 2.5% y 10ml a 5% una vez al día durante tres días, sin embargo, se presentó irritación considerable en la urbe y no se obtuvieron resultados concluyentes. Se ha usado miconazol en una concentración de 50 a 100mg durante cuatro días con 45g de tiabendazol vía oral por tres días, este tratamiento combinado logró ser efectivo en el 78% de los casos. Se ha usado nistatina vía intramamaria usando una concentración de 500mil unidades internacionales y clotrimazol de 100 a 200mg una vez al día durante cuatro días siendo más efectiva la nistatina. Se ha usado clotrimazol vía intramamaria de 100 a 200mg por cuarto una vez al día durante cuatro días con resultados satisfactorios. En un caso donde se hizo el diagnóstico de una mastitis moderada y una severa producida por *C. krusei* y *C. rugosa* respectivamente, se usaron por vía intramamaria 200 mg de miconazol dos veces al día sin resultados favorables. (23, 24, 25, 26, 27)

Por lo anterior, es necesario realizar más estudios orientados al tratamiento contra las mastitis micóticas causadas por este agente y ofrecer al Médico Veterinario alternativas de tratamiento.

1.5 Sustancias con actividad antimicótica

Algunos estudios han utilizado de forma experimental sustancias que no se encuentran clasificadas propiamente como antimicóticos. Sin embargo, han sido utilizadas para el tratamiento de la mastitis micótica causada por diversas especies del género *Candida*. Algunos ejemplos son: (hacer en forma de listado)

Lactoferrina al 10% por infusión intramamaria a dosis de 0.438 mg/ml con resultados positivos. Yodopovidona al 3% por infusión intramamaria a dosis de 10ml una vez al día durante cinco días con bajas tasas de éxito. Se han usado también soluciones de extractos de plantas como el ajo y aloe vera entre otros con potencial antimicótico, sin embargo, se requiere mayor investigación acerca de estos compuestos. Recientemente se ha estudiado el uso de nanopartículas del extracto metanólico de las partes aéreas de la planta lavanda (*Lavandula coronopifolia*), como una alternativa nanotecnológica para el tratamiento de la mastitis micótica que sigue en investigación. Hasta el momento, han obtenido excelentes resultados in vitro en comparación con fármacos antimicóticos tradicionales como la anfotericina B, el ketoconazol y el fluconazol (28, 29, 30).

1.6 Fármacos antimicóticos.

Los antimicóticos son sustancias químicas utilizadas para el tratamiento de infecciones causadas por hongos. La acción que ejercen estas sustancias sobre ellos puede ser fungistáticas (inhiben el crecimiento del hongo) o fungicidas (destruyen directamente al hongo). El tipo de acción de estas sustancias depende del sitio de acción, tipo de sustancia y dosis a la que se apliquen.

Los grupos de fármacos antimicóticos actualmente aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) en los Estados Unidos son: los polienos macrólidos, los azoles,

las pirimidinas, las alilaminas, las equinocandinas y la griseofulvina (31, 32) (figura 2).

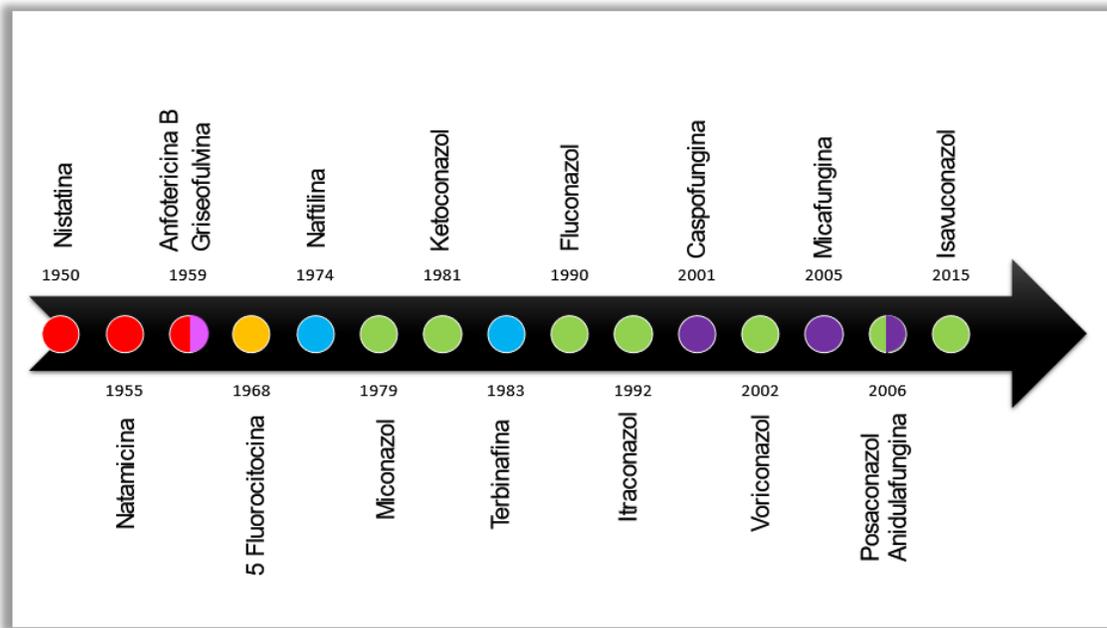


Figura 2. Línea del tiempo de aprobación de los principales fármacos antimicóticos. Los principales antimicóticos aprobados por la FDA hasta el momento son: polienos macrólidos (rojo), flucitosina (5-fluorocitosina) (anaranjado), alilaminas (azul), azoles (verde), equinocandinas (morado), griseofulvina (rosa)
 Adaptado de: Tapia C. 2005 (33), Mora M. et. al. 2017(34), Rivera, E. et. al. 2020 (35), Suberviola B. 2021 (36)

En la figura 3 se muestra un cuadro sinóptico de la clasificación de los antimicóticos a describir en el presente trabajo.

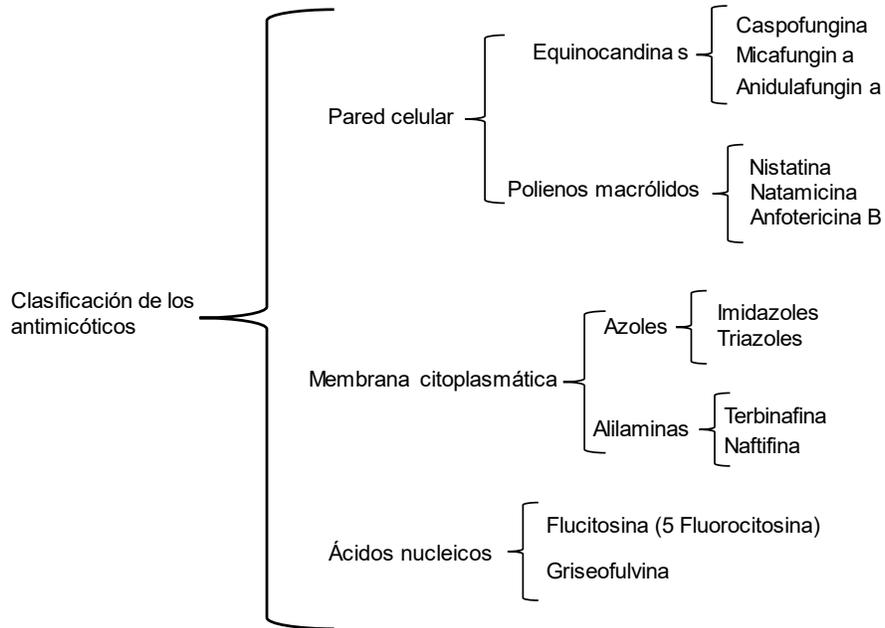


Figura 3. Clasificación de los antimicóticos de acuerdo con su sitio de acción. Se muestra la clasificación de los antimicóticos de acuerdo con el sitio de acción, grupo al que pertenecen y ejemplos.

La descripción de las sustancias antimicóticas se realizará de acuerdo con el sitio de acción que tienen sobre la célula fúngica (Figura 4).

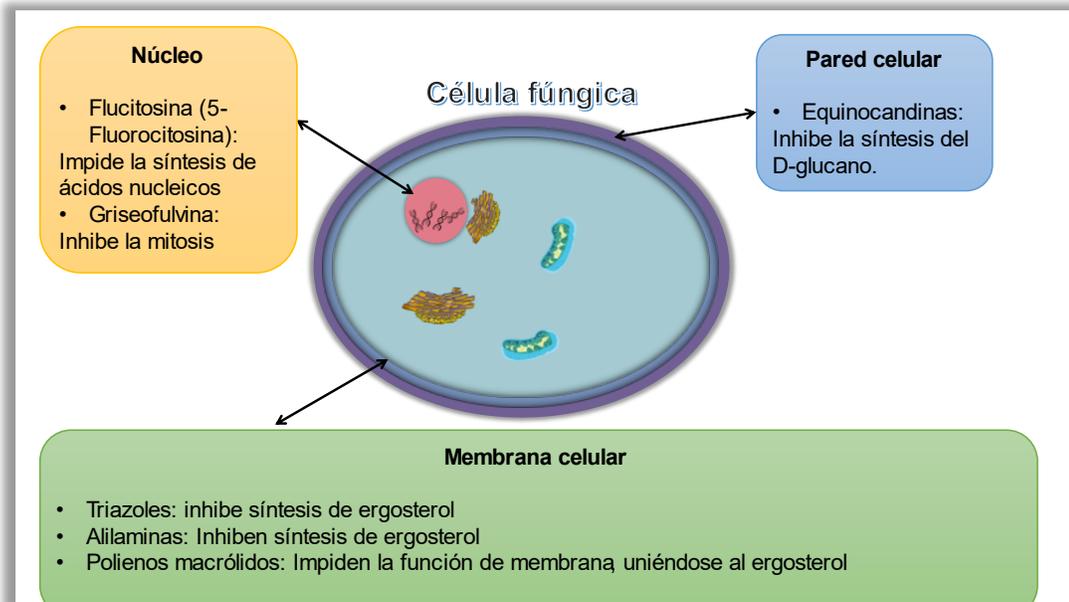


Figura 4. Sitio y mecanismo de acción de los antimicóticos en la célula fúngica. Las flechas indican el sitio de la célula en el que actúan, en cada recuadro se muestran los antimicóticos que actúan a ese nivel y su mecanismo de acción.

1.6.1 Antimicóticos que actúan a nivel de pared celular

1.6.1.1 Equinocandinas

Las tres principales equinocandinas son caspofungina (2001), micafungina (2005), y anidulafungina (2006). Las equinocandinas son derivados de los hongos *Coleophoma empedri*, *Aspergillus nidulans* y *Glarea lozoyensis* respectivamente. No se absorben por vía oral por lo que su aplicación es vía intravenosa (37, 38).

Mecanismo de acción

Las equinocandinas, inhiben la síntesis de 1-3 D-glucano, el cual forma parte del complejo enzimático de la pared fúngica. Al ser específico de la pared, no afecta a las células de los mamíferos (Figura 5) (37).

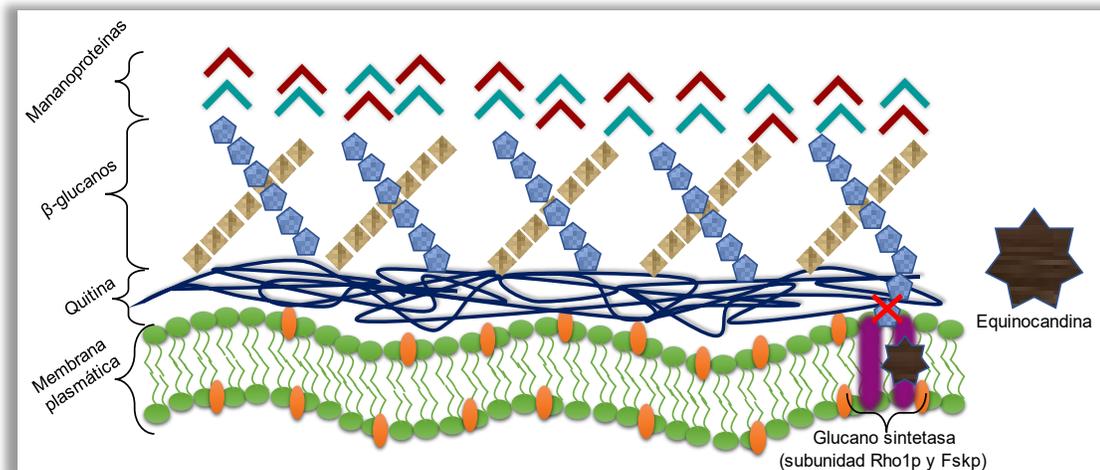


Figura 5. Mecanismo de acción de las Equinocandinas. Las equinocandinas (estrella café) inhiben la síntesis de B-glucanos, uniéndose a la subunidad Fskp de la glucano sintetasa (figuras moradas) la cual se encarga de elaborar el D-glucano principal componente de la pared celular fúngica provocando lisis y muerte celular.

Espectro de acción

Su espectro de acción incluye a varias especies del género *Candida* incluidas a aquellas naturalmente resistentes a los azoles (*C. glabrata* y *C. krusei*). Tienen excelente actividad contra *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* y *A. nidulans*. No son activos contra los mucorales, *Fusarium* spp, *Scedosporium* spp, *Trichosporon* spp y *C. neoformans* (38).

1.6.2 Antimicóticos que actúan a nivel de membrana citoplasmática

1.6.2.1 Polienos macrólidos

Este grupo de fármacos se caracteriza por tener un anillo macrocíclico de lactona. Ejemplos de estos son la anfotericina B, la nistatina y la natamicina. Entre sus características, se pueden mencionar la escasa biodisponibilidad digestiva, la baja solubilidad en agua y su elevada toxicidad, siendo actualmente la más utilizada, la anfotericina B (34).

Mecanismo de acción

Los polienos macrólidos se unen al ergosterol de la membrana citoplasmática del hongo, (con poca actividad por el colesterol de las células de mamíferos) generando poros que aumentan la permeabilidad, provocando la fuga de moléculas del citoplasma. La natamicina al procesarse pierde la micosamida la cual forma parte de la estructura de los polienos macrólidos, por lo que se une menos al ergosterol de la célula micótica volviéndose menos efectiva que la anfotericina B y la nistatina las cuales al no perder la micosamida tienen mayor afinidad al ergosterol y por ende mayor capacidad de formar poros en la membrana. y pueden aumentar la producción de ROS (metabolitos reactivos de oxígeno) que al acumularse causan daño en otras moléculas, como el ADN, los lípidos y las proteínas (Figura 6) (34, 35).

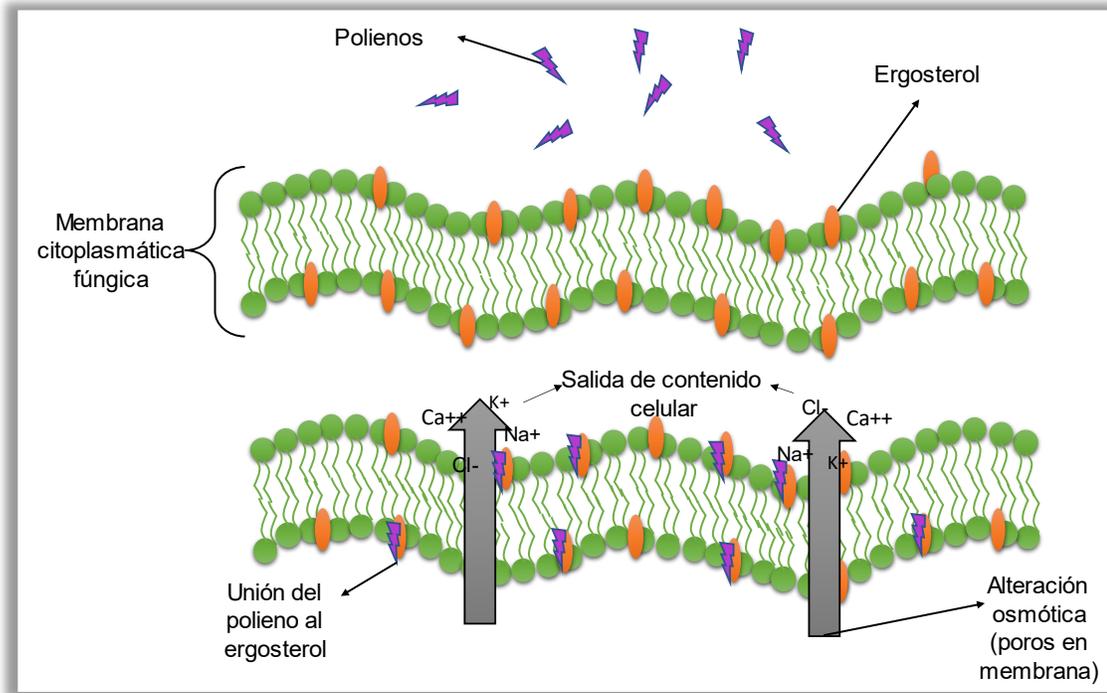


Figura 6. Mecanismo de acción de los polienos macrólidos. El polieno se une al ergosterol de la membrana citoplasmática provocando alteración osmótica en la membrana.

Nistatina

La nistatina, es considerada un antimicótico de origen natural, producida por *Streptomyces noursei*. Su espectro de acción incluye a especies del género *Candida* y no tiene actividad contra dermatofitos. Es empleada en forma de ungüentos o soluciones para infecciones superficiales, también puede utilizarse por vía oral a partir de compuestos lipídicos. Generalmente es un fármaco bien tolerado, su absorción a nivel gastrointestinal y de piel es mínima, aunque a dosis altas puede generar náuseas. Está indicada para tratar candidiasis mucocutáneas, por vía oral se usa para tratar infecciones gastrointestinales y evitar la extensión de la infección a la zona perianal o diseminación hematogena en pacientes inmunodeficientes (35).

Natamicina

Es un antimicótico producido por *Streptomyces natalensis*, su principal uso es como agente conservador en productos de leche fermentada y de cárnicos. En menor medida es utilizado como tratamiento tópico de la queratitis micótica por hongos filamentosos como *Fusarium spp*, *Aeromonium spp*. y *Aspergillus spp*. Se encuentra disponible en solución o crema de uso oftálmico al 5% (35).

Anfotericina B

La anfotericina B, se deriva de *Streptomyces nodosus*. Se aprobó por la FDA (Food and Drugs Administration) en 1959 para tratar micosis sistémicas. Tiene baja biodisponibilidad por vía oral debido a su baja solubilidad en agua. Se puede administrar vía intravenosa (vía principal), intratecal, intraarticular, intravesical y en sitios quirúrgicos. Es un fármaco muy antiguo que se sigue usando por su amplio espectro de actividad.

Este antimicótico es activo contra infecciones fúngicas sistémicas graves. Por sus efectos secundarios se ha limitado su uso como tratamiento de elección. Como efectos secundarios se han reportado náuseas, vómitos, escalofríos, fiebre, hiper o hipotensión e hipoxia, además de generar nefrotoxicidad por la vasoconstricción renal y reducción de la tasa de filtración glomerular.

La fórmula original de la Anfotericina B contenía desoxicolato de sodio, que provocaba la presentación de los efectos tóxicos. Para que la anfotericina B fuera menos tóxica, se reformuló con algunos lípidos y actualmente existen tres formulaciones lipídicas. Las formulaciones lipídicas de Anfotericina B suelen ser menos nefrotóxicas, se distribuyen mejor y son más solubles en agua. Las dos que existen comercialmente son la Anfotericina B liposomal y el complejo lipídico de Anfotericina B (36, 39).

Espectro de actividad

Este antimicótico es útil para infecciones provocadas por: *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatiditis*, y *Cryptococcus neoformans*. Sin embargo, se ha encontrado resistencia en algunas cepas de *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *Aspergillus terreus*, *Scedoporium apiospermum*, *S. prolificans*, *Fusarium spp.* y *Trichosporon spp.* (34, 35).

1.6.2.2 Azoles

Son un grupo muy amplio de antifúngicos con gran importancia para el tratamiento de micosis, tienen una estructura química básica, teniendo en común un núcleo de imidazol y su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de esteroides de la membrana citoplasmática del hongo. Los azoles se clasifican en imidazoles o triazoles, de acuerdo con el número de átomos de nitrógeno unidos al anillo de azol (dos átomos para los imidazoles y tres para los triazoles). Los primeros azoles comercializados en 1969, fueron el clotrimazol y el miconazol como alternativas a la griseofulvina y la nistatina, que eran utilizadas para el tratamiento de infecciones cutáneas y mucocutáneas por dermatofitos y *Candida spp.* (40, 41)

El primer azol usado vía intravenosa fue el miconazol en 1979. Se dejó de utilizar por su elevada toxicidad, sin embargo, funcionó como base para el desarrollo de los tres fármacos azoles más importantes, el ketoconazol, el fluconazol y el itraconazol. (40, 41).

Mecanismo de acción

Los imidazoles y triazoles comparten el mismo mecanismo de acción. Inhiben la enzima fúngica 14 α -esteroidesmetilasa del citocromo P-450 involucrada en la síntesis de ergosterol, por lo que impiden la unión del ergosterol alterando la estructura y función de la membrana celular (Figura 7).

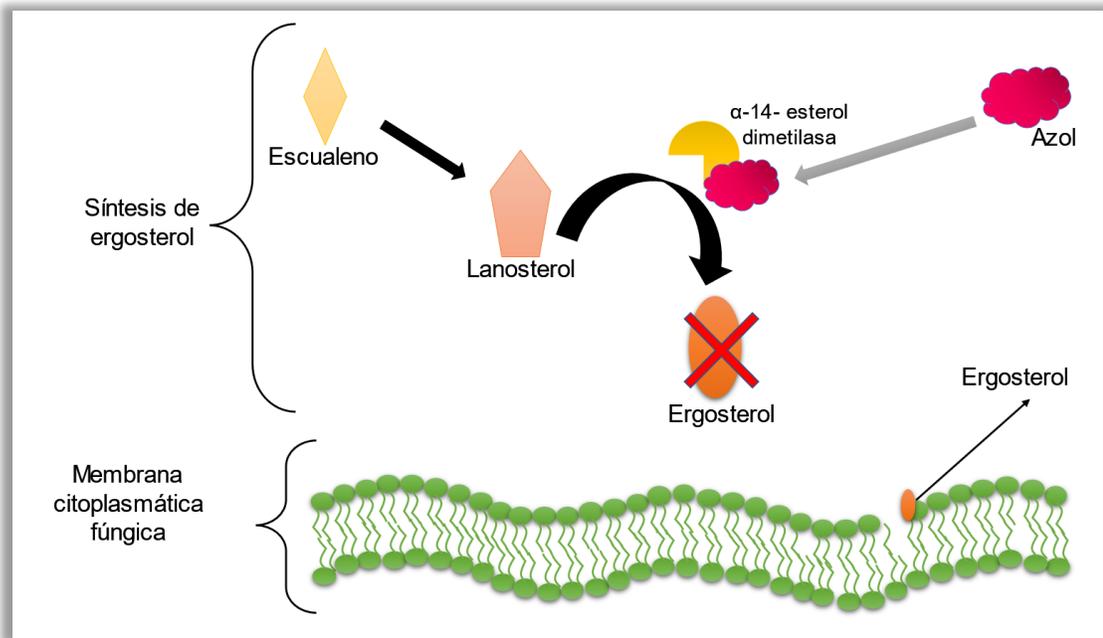


Figura 7. Mecanismo de acción de los azoles. El azol evita la conversión del lanosterol (pentágono rosa) a ergosterol (óvalo anaranjado) al inhibir a la α -14-esterol dimetilasa, provocando la alteración de la estructura y función de la célula.

1.6.2.2.1 Imidazoles

Los imidazoles son fármacos muy tóxicos cuando se usan por vía sistémica por lo que actualmente se utilizan para infecciones fúngicas cutáneas y mucocutáneas. Los principales azoles tópicos utilizados son el ketoconazol, el clotrimazol y el miconazol. Otros ejemplos de imidazoles tópicos incluyen a: econazol, bifonazol, tioconazol, sertaconazol, omoconazol, flutrimazol, oxiconazol, terconazol y, el más recientemente incorporado, eberconazol. Todos tienen una eficacia similar, diferenciándose por la duración de su efecto.

Ketoconazol: es el imidazol tópico de referencia, tiene actividad contra dermatofitos y especies del género *Candida*. Se usa en concentraciones al 2% en cremas, geles, polvos y óvulos. En la actualidad su mayor uso es en el tratamiento de dermatitis seborreica en forma de gel-champú.

Clotrimazol: Su espectro de actividad es contra dermatofitos, *Malassezia* y especies del género *Candida*, teniendo una eficacia variable, actualmente se sigue usando en tratamiento de tiña del pie.

Miconazol: Su espectro de actividad incluye a dermatofitos, *Malassezia* spp. y especies del género *Candida*, tiene cierta actividad antibacteriana contra bacterias grampositivas. Se emplea en cremas en concentraciones al 2% teniendo como efectos adversos causar irritación (42, 43).

1.6.2.2.3 Triazoles

La primera generación de triazoles incluye el fluconazol (1990) y al itraconazol (1992), su espectro de actividad incluye a especies del género *Candida*, reconocidos por su eficacia general, su eficiencia, seguridad y facilidad en administración (oral e intravenosa).

Son eficaces contra la mayoría de las especies del género *Candida* y contra *Cryptococcus* spp, en menor medida contra *Histoplasma* spp, *Blastomyces* spp, *Coccidioides* spp. Carecen de actividad contra hongos filamentosos y en consecuencia se empezaron a formular los triazoles de segunda generación con un mayor espectro de actividad (34, 40).

El primer triazol de segunda generación en estar disponible fue el voriconazol, el cual fue aprobado en 2002, el voriconazol tiene una estructura similar al fluconazol, con modificaciones para ser efectivo contra *Aspergillus fumigatus*.

El posaconazol fue aprobado en el 2006, tiene una estructura similar al itraconazol, sus modificaciones lo hacen efectivo contra especies de *Candida* incluidas *C. krusei* (naturalmente resistentes a azoles), *Cryptococcus* spp, *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp. y *Scedosporium* spp. (40, 41).

En 2015 se empezó a usar el último azol aprobado, el isavuconazol, el cual se administra como profármaco en suspensión. Tiene una estructura similar al voriconazol y al fluconazol, pero con modificaciones que lo hacen más potente, su

espectro de actividad abarca a especies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* y mucormicetos (44).

Respecto a los azoles de segunda generación se tiene la preocupación de una resistencia cruzada de las especies naturalmente resistentes, como es el caso de *C. krusei* y *C. glabrata* (45).

Espectro de actividad de los triazoles

El fluconazol es eficaz contra la mayoría de las especies del género *Candida* y contra *Cryptococcus spp*, en menor medida contra *Histoplasma spp*, *Blastomyces spp*, *Coccidioides spp*. El voriconazol además tiene un espectro de acción contra especies de *Candida* naturalmente resistentes al fluconazol (*C. krusei* y *C. glabrata*) (34, 40).

Entre las características genéticas que hacen de *C. glabrata*, una levadura resistente a los fármacos es la sobreexpresión de los genes CgCDR1, CgCDR2, CgNQ2, PDH1, CgPdr1, MDR1 (los cuales regulan la síntesis de la membrana celular) provocando el incremento de bombas de extrusión del antimicótico tal es el caso de los triazoles de primera generación como el fluconazol, y por lo tanto se reduce la concentración dentro de la célula. La modificación en el gen ERG11 impide que el antimicótico se una a la 14-alfa-desmetilasa al modificarse y por lo tanto no se podrá bloquear la síntesis de ergosterol (46).

Por lo que se refiere a *C. krusei*, está levadura cuenta con dos mecanismos de resistencia que le permiten ser intrínsecamente resistente a los triazoles, a las equinocandinas y una eficacia disminuida a anfotericina B y 5-fluorocitosina. El primer mecanismo es la sobreexpresión de proteínas transportadoras de la Abc1p y la Abc2p de la bomba de eflujo de ATP-binding cassette (ABC) que están codificadas para los genes ABC1 y ABC2, provocando la acumulación reducida de azoles y alteraciones en la enzima diana, la Erg11p, que codifica para el gen ERG11, que reduce la susceptibilidad a los azoles. La resistencia a los equinocandinas se debe a mutaciones en las regiones HS1 y HS2, del gen FKS1

que codifica el complejo 1,3-beta-d-glucano sintasa, la enzima esencial para síntesis de glucano (47).

1.6.2.3 Alilaminas

Las alilaminas son moléculas que constituyen una diana sintética útil. Son varias las sustancias que se sintetizan a partir de ellas, sin embargo las de importancia farmacológica son la inarizina, la flunarizina, la naftifina, la terbinafina y la zimelidina, con diferentes acciones farmacológicas. Las alilaminas que actúan como antimicóticos son la naftifina y la terbinafina que se usan para el tratamiento del pie de atleta (*Tinea pedis*), la tiña inguinal (*Tinea cruris*) y la tiña del cuerpo (*Tinea corporis*).

La naftifina fue sintetizada a través de la sustitución catalítica directa de alcoholes alílicos, la terbinafina es la mejora de la naftifina descubierta en 1983. La terbinafina es el antifúngico recetado con más frecuencia para el tratamiento de la onicomicosis en América del Norte y Europa. Es altamente queratinofílica y lipofílica, se usa vía sistémica y tópica. Aunque se sabe que tiene actividad contra hongos como *Aspergillus spp*, *C. neoformans*, *Blastomyces spp*. e *Histoplasma capsulatum*, su principal actividad es contra hongos dermatofitos (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum spp*. y *Trichophyton spp.*) (48, 49).

Mecanismo de acción de la terbinafina y la naftifina

La terbinafina inhibe el crecimiento de hongos al interrumpir la biosíntesis de esteroides, anula la formación de esterol inhibiendo la enzima escualeno epoxidasa por medio de la enzima catalítica que convierte el escualeno en 2,3-oxidoescualeno (precursor del ergosterol). La deficiencia de ergosterol resulta en menor integridad de la pared celular, deterioro en el crecimiento y muerte celular (Figura 8) (48).

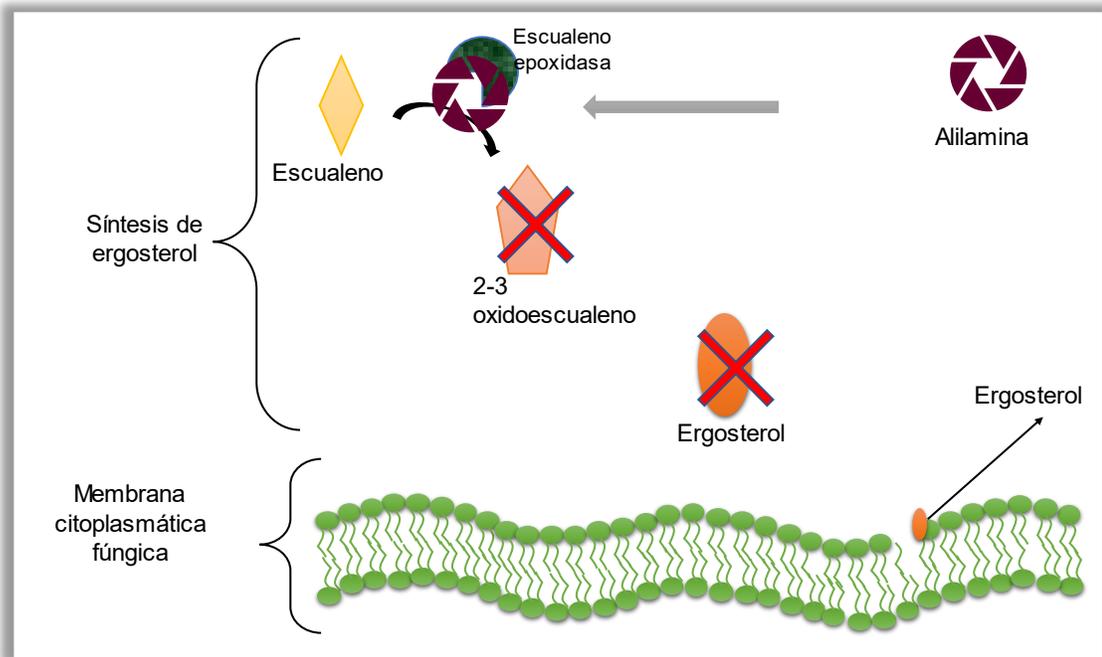


Figura 8. Mecanismo de acción de las alilaminas (terbinafina y naftifina). Las alilaminas evita la conversión del escualeno a 2-3 oxidoescualeno (precursor del ergosterol) inhibiendo a la enzima escualeno epoxidasa encargada de convertirla. Provoca la alteración y función de la membrana al no tener ergosterol.

1.6.3 Antimicóticos que actúan a nivel de ácidos nucleicos

1.6.3.1 Flucitosina (5-Fluorocitosina)

La flucitosina (5-fluorocitosina) es una pirimidina fluorada. Se sintetizó por primera vez en 1957 pensado como un agente antitumoral y aprobándose para su uso como antifúngico en 1968 (33).

Mecanismo de acción

Es un fármaco fungistático que ingresa a la célula fúngica por la enzima de la membrana llamada citosina permeasa, es un profármaco, es decir, para su activación, el compuesto necesita ser metabolizado a través de la vía de recuperación de pirimidina, una vez que entra se convierte en 5-fluorouracilo por desaminación y se producen fosforilaciones lo cual lo convierte en fluorouridina

aberrante la cual se incorpora a la cadena de ARN provocando la producción de ARN aberrante. Afecta también la síntesis de ADN al inhibir a la enzima que permite que uridina pase a timidina (Figura 9) (34).

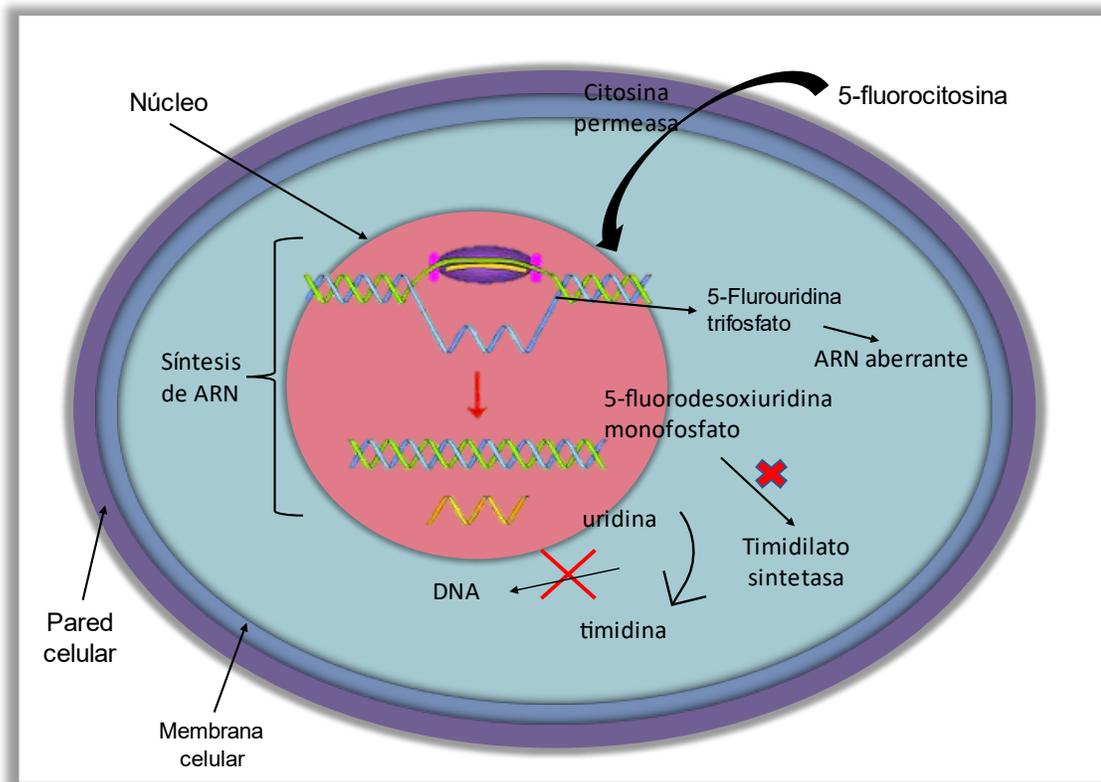


Figura 9. Mecanismo de acción de la 5-fluorocitosina. La 5 fluorocitosina entra a la célula por medio de la citosina permeasa, sufre modificaciones hasta llegar al núcleo y provoca ARN aberrante mediante la molécula llamada 5-fluorouridina trifosfato. La molécula 5-fluorodesoxiuridina inhibe a la timidilato sintetasa la cual convierte la uridina en timidina, evitando la formación de DNA

Espectro de actividad.

La 5-fluorocitosina, es activa contra hongos levaduriformes como *Candida* spp, *Cryptococcus* spp y algunos hongos dematiáceos e inactiva contra hongos filamentosos.

No debe usarse en monoterapia debido a que presenta resistencia secundaria. El hongo fácilmente puede mutar, tal como ocurre en la mutación de la citosina permeasa impidiendo la entrada de la 5 fluorocitosina. A pesar de ello se sigue usando para potenciar la actividad de otros antimicóticos como es el caso de la

anfotericina B. Al combinarlos la sinergia que presentan estos dos antimicóticos, permite que se utilicen menores dosis y así disminuir sus efectos tóxicos (33, 50).

1.6.3.2 Griseofulvina

En un producto natural que se descubrió y aisló por primera vez en 1939 a partir de *Penicillium griseofulvum*, pero puede aislarse también a partir de otros hongos como *Xylaria flabelliformis*, *Abieticola koreana* y *Stachybotrys levispora*, se aprobó como medicamento en 1959. Tiene una gran variedad de usos, en la agricultura se usa para prevenir la colonización e infección por hongos a cultivos, en medicina se usa para tratamientos por dermatofitos en humanos y animales; no obstante, tiene efectos secundarios graves como fotosensibilización llegando a provocar porfiria, por lo cual ha caído en desuso. En investigación de cáncer la griseofulvina demostró tener efectos inhibitorios en la división de células cancerosas (51).

Mecanismo de acción

La griseofulvina ingresa a la célula mediante procesos de transporte dependientes de energía. Se une a los microtúbulos fúngicos e interfiere en la función de los microtúbulos lo cual inhibe la mitosis. Inhibe la mitosis en metafase, suprimiendo la dinámica de los microtúbulos del huso (MT) actuando directamente en el extremo positivo para aumentar la estabilidad y suprimir la tasa de acortamiento en los extremos positivos del MT (Figura 10) (51).

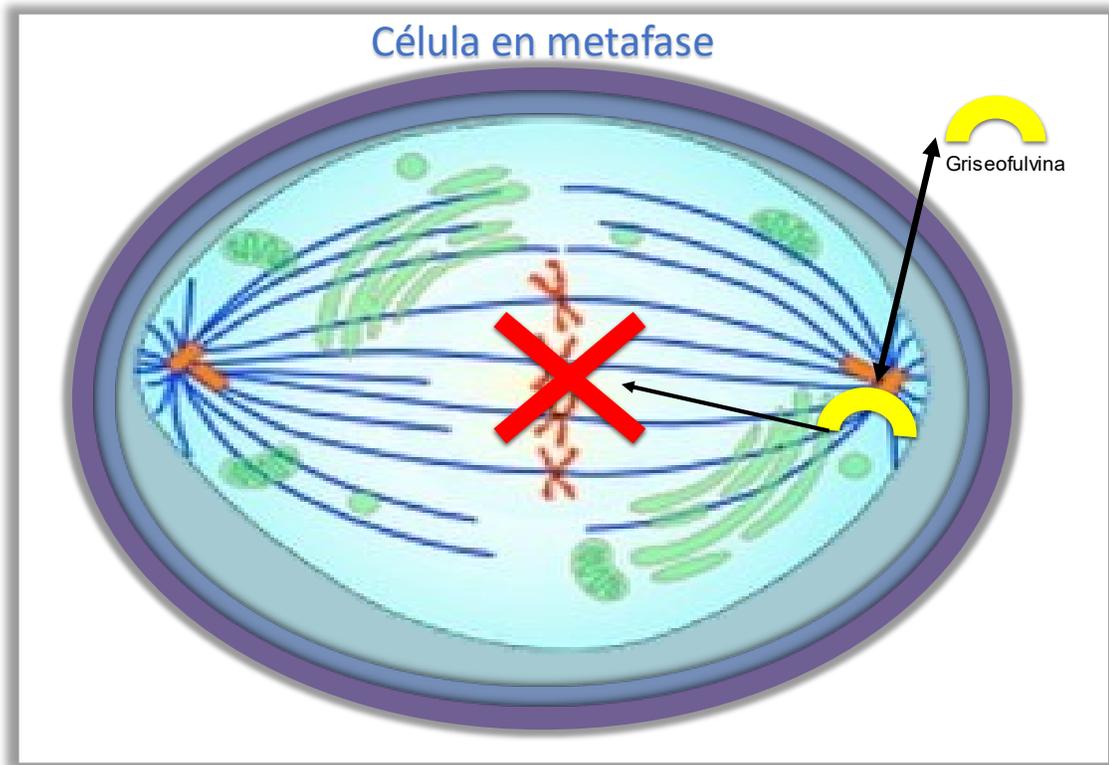


Figura 10. Mecanismo de acción de la griseofulvina. La griseofulvina al ingresar a la célula fúngica se une a los microtúbulos suprimiendo la dinámica de estos en la metafase

Espectro de acción

Es el fármaco de elección frente a dermatofitos (*Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*), es inactivo contra levaduras, filamentosos y hongos dimórficos (52).

1.7 Pruebas de susceptibilidad antimicótica

Las pruebas de susceptibilidad antifúngica son una herramienta creciente en los laboratorios de microbiología clínica, debido a la necesidad de tener una referencia para una adecuada terapia antifúngica y predecir el éxito del antifúngico a utilizar.

Hasta el momento existen dos estándares internacionales para evaluar la susceptibilidad antimicótica:

a) Estándar americano. En 1968, en Estados Unidos de Norteamérica (EUA) se creó el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico denominado NCCLS por sus siglas en inglés, hoy conocido como el Instituto de Estándares para el Laboratorio Clínico (CLSI), con el objetivo de tener un control de calidad y estandarización de pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos. En 1985 se inició el proceso para la elaboración del documento M-27 “Método de referencia para pruebas de susceptibilidad antifúngica por dilución en caldo para levaduras”. (53)

1.7.1 Dilución en caldo para levaduras.

Es el primer método desarrollado para pruebas de susceptibilidad de levaduras e históricamente ha sido la técnica más usada. Se utilizan tubos de ensaye, con medio líquido de RPMI con glutamina sin bicarbonato enriquecido con glucosa realizando diluciones dobles seriadas del fármaco y una concentración predeterminada del inóculo del microorganismo de prueba. (53)

1.7.2 Microdilución en caldo para levaduras.

Es un método que se rige bajo las mismas condiciones que el método de microdilución en caldo, que se ha adaptado mejor al uso general en el laboratorio, al requerir menos material y espacio para su implementación (53).

b) Estándar europeo. En Europa se creó el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos EUCAST por sus siglas en inglés para estandarizar aspectos técnicos de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* y establecer puntos de corte. En 1997 se formó el subcomité de pruebas de susceptibilidad antifúngica y en 2008 publicaron su primer documento donde se estandarizaron las pruebas de susceptibilidad para hongos filamentosos y levaduriformes. (53)

2. Hipótesis

Las especies del género *Candida* aisladas de la leche de bovinos y caprinos clínicamente sanos y con mastitis subclínica y clínica, presentan distintos patrones de susceptibilidad antimicótica.

3. Objetivo

Evaluar la susceptibilidad antimicótica de especies del género *Candida* obtenidas de leche de bovinos y caprinos, mediante el método de microdilución en placa, para conocer el patrón de susceptibilidad y la posible correlación con el estado sanitario

4. Material y métodos.

4.1 Obtención de aislados de especies del género *Candida*.

De un estudio previo, a partir de leche de cabras clínicamente sanas, se obtuvieron 171 aislados de especies del género *Candida*, correspondientes a: 67 de *C. guilliermondii*, 56 de *C. kefyr*, 40 de *C. famata* y 8 *Candida spp.* (15) (cuadro 1).

En otro estudio se identificaron 98 aislados levaduriformes obtenidos a partir de muestras de leche de vacas, 41 con mastitis subclínica, 32 clínicamente sanas y 25 con mastitis clínica (54). (Cuadro 1).

Cuadro 1. Origen de las especies del género *Candida* utilizadas en el estudio.

Especie del género <i>Candida</i>	Estado sanitario de la glándula mamaria		
	Sanos	Mastitis subclínica	Mastitis clínica
Aislados provenientes de leche de cabra			
<i>C. guilliermondii</i>	67	0	0
<i>C. kefir</i>	56	0	0
<i>C. famata</i>	40	0	0
<i>Candida spp.</i>	8	0	0
Total	171	0	0
Aislados provenientes de leche de vaca			
Por identificar	32	41	25
Total	98		

4.2 Cepas de referencia.

Las cepas de referencia utilizadas en el presente estudio fueron: *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* Instituto Pasteur, *C. guilliermondii* ATCC 04121, *C. kefir* ATCC 041219, *C. krusei* ATCC 6258, *C. lusitaniae* ATCC 34449, *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. tropicalis* ATCC 750.

4.3 Reactivación de los aislados

Los aislados levaduriformes estaban conservados en dos sistemas: a) Refrigeración a 4°C en agar dextrosa Sabouraud (SDA) y b) Congelación a -4°C en glicerol al 50%.

A los aislados conservados en refrigeración en SDA, se procedió a depositar directamente en los tubos, 2 ml de caldo extracto de levadura, peptona de caseína, dextrosa (YEPD) al 2% de glucosa. En el caso de los aislados en congelación, se tomaron 200 µl del cultivo y se transfirieron a tubos de ensaye que contenían 2 ml de caldo YEPD al 2% de glucosa. En ambos casos, las condiciones de incubación fueron a 37°C de 48 a 72 h.

4.4 Confirmación de pureza e identificación

Posterior al tiempo de incubación, se tomaron 20 µl de cada uno de los cultivos, que fueron sembrados por cultivo puro en una placa de Petri que contenía SDA adicionado con cloranfenicol (SDAc) e incubados a 37°C durante 24h.

4.4.1 Tinción de Gram

A los aislados desarrollados en agar SDAc se les realizó la tinción de Gram (anexo 8.4) para verificar la morfología y pureza del cultivo.

La observación se realizó en un microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100X).

En el caso de los cultivos obtenidos de leche de cabra, previamente identificados, con la morfología colonial y la observación con la tinción de Gram, fue suficiente para confirmar su viabilidad y pureza.

En el caso de las cepas de referencia y de los aislados obtenidos de la leche de vacas clínicamente sanas y con mastitis subclínica y clínica, se procedió con la siguiente metodología.

4.4.2 Identificación de especies del género *Candida* de los aislados de leche de vacas.

La identificación incluyó: tinción de Gram, formación de pseudohifa, desarrollo en cicloheximida al 0.1 %, asimilación y fermentación de carbohidratos, y siembra en CHROMagar *Candida* y agar Biggy.

4.4.3 Formación de pseudohifas

Las pseudohifas son estructuras alargadas que se forman a partir de la levadura, están presentes en la mayoría de las especies del género *Candida* a excepción de *C. glabrata*. Esta característica de *C. glabrata* de no formar pseudohifas se puede usar como un método de diferenciación de esta especie del resto de levaduras del género *Candida*. (55)

Un método para favorecer su desarrollo es sembrar a la levadura en agar arroz. De un cultivo de 24 a 48 h en agar SDA, se tomó una colonia y fue sembrada por estría continua al centro de una caja de Petri que contenía agar arroz, se cubrió con un cubreobjetos estéril, incubándose a 37°C durante 48h (55).

4.4.4 Sensibilidad a la cicloheximida al 0.1%

Es una prueba utilizada para diferenciar algunas de las especies del género *Candida*, ya que ciertas especies tienen la capacidad de crecer en presencia de este antibiótico y otras no pueden desarrollarse en presencia de este. Tal es el caso de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* que no se desarrollan en presencia de esta sustancia, mientras que a *C. albicans* y *C. guilliermondii* no las inhibe (56).

Se preparó una solución de cicloheximida el 0.1% en caldo YNB (Yeast Nitrogen Base). A partir de un cultivo de levaduras de 24h a 37°C, se preparó un inóculo en SSF estéril al tubo 0.5 de McFarland, del cual se transfirieron 100µl al caldo YNB, los tubos fueron incubados a 37°C durante 7 días.

Interpretación

Sensibilidad a la cicloheximida: Tubos sin turbidez

No sensibilidad a la cicloheximida: Tubos con turbidez (56).

4.4.5 Asimilación y fermentación de carbohidratos

Son pruebas bioquímicas que se basan en la fermentación o anaerobiosis (zimograma) y la utilización (oxidación) o asimilación (auxonograma) de carbohidratos (anexo 8.3)

La inoculación de los tubos para asimilación y fermentación se realizó inoculando 100 µl de una suspensión de cada aislado en SSF al tubo 0.5 de Mc Farland, la incubación fue a 37°C durante 7 días.

Interpretación de la prueba de asimilación:

Positiva: acidificación del medio, cambio de color rojo a amarillo.

- Negativa: sin acidificación del medio, sin cambio de color.

Interpretación de la prueba de fermentación

- Positiva: cambio de color rojo a amarillo y producción de gas en el tubo Durham.
- Negativa: sin cambio de color del medio ni producción de gas. (57)

4.4.6 Medios selectivos y diferenciales

Una alternativa útil en el laboratorio de Micología es el uso de medios selectivos y diferenciales que apoyan la identificación de especies del género *Candida*, ejemplos de estos medios son el CHROMagar *Candida* y el agar BIGGY.

Cultivo en CHROMagar Candida.

Es un medio de cultivo cromogénico selectivo, destinado a la identificación y/o diferenciación de especies clínicamente importantes del género *Candida*, como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata*. El medio contiene sustratos cromógenos que liberan compuestos de diferentes colores al ser degradados por enzimas específicas de cada especie (Cuadro 2) (58).

Los aislados puros fueron sembrados por estría en cajas de Petri estériles que contenían CHROMagar *Candida* e incubados a 37°C durante 24 a 48h.

Cuadro 2 Interpretación del desarrollo en medio CHROMagar de especies del género *Candida*

Especies de <i>Candida</i>	Color y textura en medio CHROMagar
<i>C. albicans</i>	Verde esmeralda
<i>C. glabrata</i>	Lila, mate
<i>C. tropicalis</i>	Azul, mate con halo
<i>C. krusei</i>	Rosa claro, rugosa
<i>C. parapsilosis</i>	Rosa claro, mate
<i>C. famata</i>	Rosa claro, mate
<i>C. guilliermondii</i>	Rosa claro, brillante
<i>C. lipolytica</i>	Blanco-rosa, rugosa
<i>C. kefyr</i>	Beige, mate
<i>C. lusitaniae</i>	Lila, mate
<i>C. zeylanoides</i>	Azul, brillante

Adaptado de Ruiz, J. et. al. 2003 (59)

Cultivo en agar BIGGY.

Es un medio para aislamiento y diferenciación de levaduras del género *Candida* que contiene sulfito de bismuto. Las colonias de levaduras desarrolladas en este medio producen colonias de color marrón a negro, en ocasiones el color se difunde al medio, debido a la reducción extracelular del sulfito de bismuto a sulfuro de bismuto (Cuadro 3). Otros componentes del agar BIGGY, es la glicina que estimula el desarrollo de las levaduras y por su alta concentración puede inhibir el desarrollo de algunas bacterias, y finalmente la dextrosa, carbohidrato que es la fuente de carbono y energía.

Los aislados puros, se sembraron por estría en cajas Petri estériles con Agar Biggy e incubados a 37°C durante 24 a 48h (60, 61).

Cuadro 3. Interpretación del desarrollo en agar BIGGY de algunas especies del género *Candida*.

Espece	Características de desarrollo
<i>C. albicans</i>	Colonias circulares lisas, color café rojizo oscuro, puede presentar superficie color metálico
<i>C. tropicalis</i>	Colonias circulares lisas, color café oscuro con ligero borde micelial, puede oscurecer el medio a las 72 h.
<i>C. krusei</i>	Colonias grandes, planas, rugosas, color café oscuro, y halo amarillo
<i>C. parapsilosis</i>	Colonias medianas, planas, color variable de café claro rojizo a café rojizo oscuro con ligero borde micelial amarillento
<i>C. kefyr</i>	Colonias grandes color café rojizo claro y ligero borde micelial
<i>C. famata</i>	Colonias medianas color café oscuro brillante
<i>C. lusitaniae</i>	No se desarrolla
Otros géneros de levaduras. P.ej. <i>Cryptococcus</i> spp.	Colonias mucoides de color blanco a crema.

Adaptado y modificado de: Neppelenbroek, H., et al. 2014 (62)

La identificación de especies del género *Candida* se realizó con base en la combinación de resultados en cada una de las pruebas realizadas y de acuerdo con los criterios descritos en los cuadros 4 y 5.

Cuadro 4. Características de especies del género *Candida* utilizadas en su identificación

Especie de <i>Candida</i>	Morfología		Medios selectivos y diferenciales		Producción de pseudohifas	Susceptibilidad cicloheximida al 0.1%
	Macroscópica	Microscópica	CHROMagar <i>Candida</i>	Agar BIGGY		
<i>C. albicans</i>	Colonias color blanco a crema, blandas y lisas a arrugadas	Blastoconidios ovales en agrupación de racimos de uvas, ovales 3.5-6 x 4-8µm	Verde esmeralda	Café oscuro con ligero borde micelar.	+	+
<i>C. famata</i>	Colonias color blanco grisáceo a amarillento, opacas a brillantes y lisas a arrugadas.	Blastoconidios esféricos 3.5-5 x 2-3.5 µm	Rosa pálido	Café rojizo oscuro brillante	V+	SD
<i>C. glabrata</i>	Colonias blancas, lisas y brillantes	Blastoconidios esféricos 2,5-4,0 x 3,0-6,0 µm	Lila	Café claro a rojizo	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	Colonias color crema a amarillentas planas, húmedas, lisas	Blastoconidios ovales a elipsoidales 1.5-4.8x2-15 µm	Lila azulado	Café rojizo	+	+
<i>C. kefyr</i>	Colonias color crema, brillantes y suaves.	Blastoconidios ovales, elongados a cilíndricos 3-11x2-6 µm	rosa	Café rojizo claro	+	+
<i>C. krusei</i>	Colonias blanquecinas, opacas y lisas, con márgenes lobulados	Blastoconidios elongados a cilíndricos 2-5x4-15 µm	Rosa a violeta rugosas	Café oscuro con halo que difunde al medio	+	-
<i>C. lusitaniae</i>	Colonias color blanco a crema, brillantes y suaves, pero pueden ser rugosas.	Blastoconidios ovales a elongados 3.5-6 x 4-8 µm	Lila a purpura grisáceo	No crece en este medio	+	-
<i>C. parapsilosis</i>	Colonias blancas, cremosas, brillantes y lisas o arrugadas	Blastoconidios ovales a elipsoidales 3-4x5-8 µm	Rosa pálido	café claro rojizo	+	-
<i>C. tropicalis</i>	Colonias color crema con un borde levemente micelial.	Blastoconidios ovales que se ubican en pseudohifas largas 3.5-7x5.5-10 µm	Azul	Café oscuro apariencia rugosa	+	+
<i>C. zeylanoides</i>	Colonias de color blanco a crema, suave, opaco	Blastoconidios ovoides a alargados que pueden	Rosa claro a morado	Café medio	+	+

		estar solos o en pares 2.5-7x4-10 µm				
<i>C. bombi</i>	Colonias suaves de color crema, suaves y opacas	Blastoconidios ovoides en pares o grupos, 2-4x4-6 µm	SD	SD	+	-
<i>C. brumptii</i>	Colonias color grisáceas a color crema, suaves a arrugadas	Blastoconidios ovoides a cilíndricos 1.5-4.5x4-12 µm	SD	SD	+	+
<i>C. cantarellii</i>	Colonias color crema arrugadas	Blastoconidios ovales cortos a elipsoidales 3-4x4-8 µm	SD	SD	+	+
<i>C. incommunis</i>	Colonias color blanco de aspecto arrugado al centro	Blastoconidios cilíndricos a elongados 1.5-2.5x6-12 µm	SD	SD	+	+
<i>C. intermedia</i>	Colonias color blanco a crema, suave ligeramente arrugada	Blastoconidios ovoides 2-4x3.6 µm	SD	SD	+	-
<i>C. lambica</i>	Colonias de color blanco a crema suaves	Blastoconidios ovoides a elípticos 1.9-6.5x4-14.4	SD	SD	+	SD
<i>C. lipolytica</i>	Colonias color crema pastosas suaves	Blastoconidios elipsoides a elongados 3-3.5 x3.3-15	SD	SD	+	SD
<i>C. norvegica</i>	Colonias color blancas suaves y brillantes	Blastoconidios redondos de 3-6 µm	SD	SD	+	V
<i>C. rugosa</i>	Colonias color blancas a crema arrugadas	Blastoconidios alargados 1.5-2.5x5x11 µm	SD	SD	+	-
<i>C. slooffiae</i>	Colonias blancas planas con margen ligeramente lobulado	Blastoconidios esféricos a elípticos 3.11.5x4.8-14 µm	SD	SD	-	SD

Nota: + positivo, - negativo, v variable, SD sin datos, Adaptado de: Kurtzman, C. et. al. 2011 (56), St-Germain & Summerbell, R, 2011 (63), López, R. et. al 2012 (64) Walsh, J. et. al 2018 (18), Arenas, R. 2020 (57)

Cuadro 5. Asimilación y fermentación de carbohidratos de especies del género *Candida*

Especie de <i>Candida</i>	Asimilación												Fermentación									
	Glu	Mal	Sac	Gal	Lac	Raf	Cel	Tre	D-Xil	L-Ara	Mel	Ino	Glu	Mal	Sac	Gal	Lac	Raf	Cel	Mel	Tre	
<i>C. albicans</i>	+	+	v	+	-	-	-	v	+	v	-	-	+	+	v	v	-	-	-	-	v	
<i>C. famata</i>	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+/w	v	-	w/-	w/-	w/-	w/-	-	w/-	s/d	s/d	w/-	
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	v	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	v	-	+	-	s/d	+	
<i>C. kefyr</i>	+	-	+	+	v	+	v	-	v	v	-	-	+	-	+	s	v	+	-	-	-	
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. lusitaniae</i>	+	+/-	+/-	v	-	-	v	+	+	-	-	-	+	v	v	v	-	-	+	-	v	
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-/s	-/s	v	-	-	-	-	-/s	
<i>C. tropicalis</i>	+	+	v	+	-	-	v	+	+	-	-	-	+	+	v	+	-	-	-	-	+/s	
<i>C. zeylanoides</i>	+	-	-	-	-	-	v	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. bombi</i>	+	-	+	-	-	+	-	v	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	v	
<i>C. brumptii</i>	+	v	-	+	-	-	-	v	v	-	-	-	v	-/s	-	-/s	-	-	s/d	-	-	
<i>C. cantarellii</i>	+	-	-	v	-	-	-	+	v	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. incommunis</i>	+	+	+	v	-	-	+	+	v	-	-	+	s	-	s/-	-	-	-	s/d	-	-	
<i>C. intermedia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	-	-	+	v	+	+/s	-	v	s/d	-	s/-	
<i>C. lambica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. lipolytica</i>	+	-	-	v	-	-	w/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. norvegica</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	v	-	-	-	+/s	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. rugosa</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. slooffiae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. utilis</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	w	s/d	-	-	
<i>C. viswanathii</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-/w	-	-	+	+	v	s	-	-	-	-	+/s	

Nota: + positivo, - negativo, s lento, w débil, v variable, +/s positivo pero lento, w/s lento y débil, w/- débil o negativo, -/s negativo o débil, s/d sin datos Donde: Glu: glucosa, Mal: maltosa, Sac: sacarosa, Gal: galactosa, Lac: latosa, Raf: rafinosa, Cel: celobiosa, Tre: trealosa, D-Xil: D-xilosa, L-Ara: L-arabinosa, Mel: melobiosa, Ino: inositol. Adaptado de: Kurtzman, C. 2011 (56), St-Germain, G 2011 (63), Arenas, R. 2020 (57)

4.5 Conservación de aislados de *Candida*

Las levaduras purificadas e identificadas fueron conservadas en:

- Refrigeración a 4°C.
- Congelación a -20°C, (Anexo 3.4) (64)

4.6 Prueba de susceptibilidad a antimicóticos.

El método de microdilución propuesto por el CLSI, es el más empleado para evaluar la efectividad antifúngica de nuevos fármacos, además de ser el método de referencia para evaluar la susceptibilidad antifúngica de hongos levaduriformes.

4.6.1 Preparación de soluciones de antimicóticos

- Las soluciones de antimicóticos, considerando las concentraciones y los disolventes para cada uno de ellos, fueron preparadas de acuerdo con lo descrito por el CLSI (Cuadro 6). Estas soluciones se almacenaron en congelación en tubos Eppendorf a un volumen de 1ml hasta su uso (65, 66).

Cuadro 6. Antimicóticos utilizados, concentraciones y disolventes recomendados

Antimicótico	Disolvente	Concentración mín. µg/ml	Concentración máx. µl/ml
5-fluorocitosina	Agua	0.125	64
Anfotericina	Dimetilsulfóxido	0.0313	16
Fluconazol	Agua	0.125	64
Itraconazol	Dimetilsulfóxido	0.0313	16
Ketoconazol	Dimetilsulfóxido	0.0313	16
Posaconazol	Dimetilsulfóxido	0.0313	16
Voriconazol	Dimetilsulfóxido	0.0313	16

Tomado de: CLSI, 2008 (66)

4.6.2 Preparación del inóculo

A partir de un cultivo de 24 h de cada uno de los aislados en SDA, se preparó un inóculo en 1 ml de SSF al 0.85% ajustando al tubo 0.5 de McFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/ml).

A partir de esta solución, se realizó una dilución 1:50 en 5ml de SSF al 0.85%, y luego una dilución 1:20 en medio líquido RPMI adicionado con 0.2% de glucosa, teniendo una concentración final del inóculo de $1-5 \times 10^3$ UFC/ml (Figura 11) (65, 66).

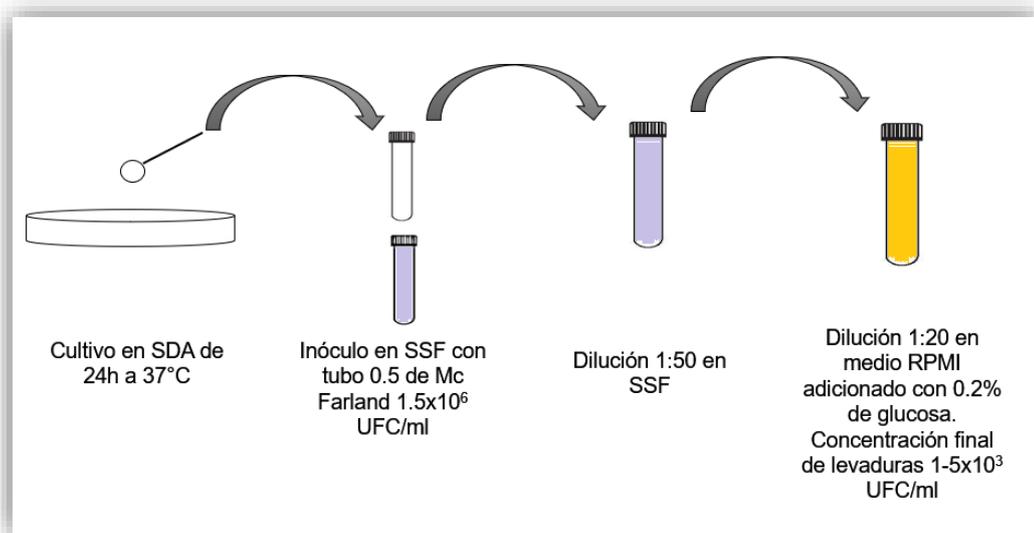


Figura 11. Preparación del inóculo de las levaduras a utilizar en el ensayo de susceptibilidad por el método de microdilución en placa.

4.6.3 Procedimiento del método de microdilución en placa.

La prueba de susceptibilidad se realizó para las cepas de referencia y todos los aislados. De acuerdo con el CLSI, las cepas de control de calidad que deben incluirse son: *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

- Cada uno de los 96 pozos de las microplacas se llenaron con 100 μ l de medio líquido RPMI adicionado con 0.2% de glucosa.
- A cada uno de los pozos de la columna 1, se les adicionó 100 μ l de la solución de antimicótico de prueba, realizándose diluciones dobles de la columna 2 a la 11. La columna 12, fue el control de desarrollo de la

levadura, por lo tanto, no se le adicionó solución de antimicótico. En la figura 12 se representa el llenado de placas.

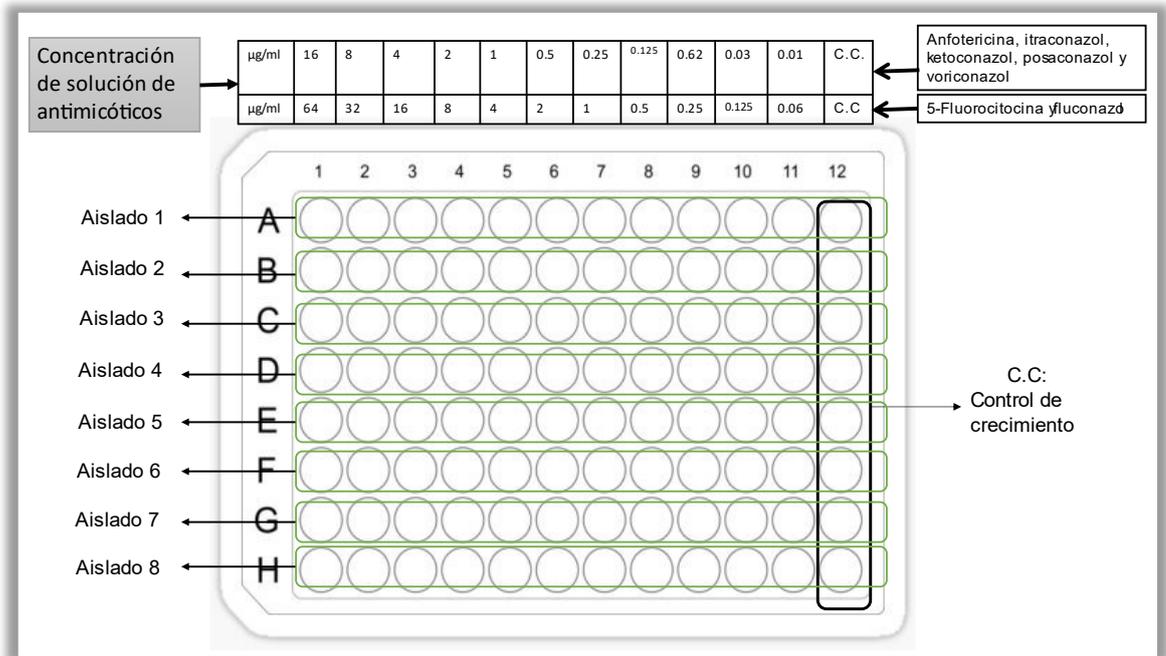


Figura 12. Representación del llenado de placas para la prueba de susceptibilidad antimicótica por el método de microdilución en placa.

- La adición del inóculo se realizó colocando 100 µl de la suspensión de levaduras ($1-5 \times 10^3$ UFC/ml) a cada uno de los pozos que correspondía a cada aislado de prueba (por ejemplo: fila A aislado 1, fila B aislado 2, fila C aislado 3, etc.). (65, 65).
- Por lo tanto, en los pozos correspondientes de las columnas 1 a la 11 contenían: 100 µl de solución de antimicótico + 100 µl del inóculo de levadura y los pozos de la columna 12 contenían 100 µl de medio RPMI + 100 µl del inóculo de levaduras. Las placas se incubaron a 37°C durante 72h.

4.6.4 Lectura de resultados

Cuadro 7. Intervalos de las CMI de los antimicóticos utilizados para las cepas de control de calidad a las 24 y 48h, obtenidos por el método de microdilución.

Intervalos de las CMI ($\mu\text{g/ml}$)				
Antimicótico	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. krusei</i> ATCC 6258	
	24h	48h	24h	48h
5-fluorocitosina	0.06-0.25	0.12-0.5	4-16	8.0-32
Anfotericina	0.25-2	0.5-4	0.5-2	1-4
Fluconazol	0.5-4	1-4	8-64	16-128
Itraconazol	0.12-0.5	0.12-0.5	0.12-1	0.25-1
Ketoconazol	0.03-0.25	0.06-0.5	0.12-1	0.25-1
Posaconazol	0.06-0.25	0.05-0.25	0.06-0.5	0.12-1
Voriconazol	0.016-0.12	0.03-0.25	0.06-0.5	0.12-1

Tomado de: CLSI 2008

La lectura de las placas se realizó de forma visual a las 24, 48 y 72 horas, observándose el desarrollo de la levadura como turbidez del medio, mientras que el resto de los pocillos permanecieron sin cambios, determinando el CMI para cada uno de los aislados de prueba. En el cuadro 7 se muestran los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas control de calidad para los antimicóticos utilizados.

La categoría que se establece de acuerdo con los puntos de corte se define como: “La concentración mínima inhibitoria utilizado para categorizar un organismo como susceptible, susceptible dependiente de dosis, intermedio o resistente” (Cuadro 8) (66).

Sensible (S): categoría definida por el punto de corte, donde los aislados con una CIM (Concentración mínima inhibitoria) es igual o inferior al punto de corte, donde la concentración generalmente es alcanzada por un agente

antimicrobiano cuando se usa a la dosis recomendada para tratar el sitio de infección, y que tiene probable eficiencia clínica (66).

Sensible Dependiente de Dosis (SDD): categoría definida por el punto de corte que implica que la susceptibilidad de un aislado depende del régimen de dosificación que se usa en el paciente. Para lograr los niveles que probablemente sean clínicamente efectivos es necesario usar niveles de dosificación por ejemplo dosis más altas, dosis más frecuentes o ambas. Lo que da como resultado una exposición más alta al fármaco que la dosis que se usó para establecer el punto de corte de los susceptibles. Se debe considerar el régimen de dosificación máximo aprobado, pues a mayor exposición se brinda una mayor probabilidad de eficacia. Para poder realizar un régimen es necesario consultar la etiqueta del medicamento para conocer las dosis recomendadas y dosis máximas (66).

Intermedio (I): categoría definida por un punto de corte que incluye a aislados con una MIC dentro del rango intermedio que se acercan a los niveles sanguíneos y tisulares generalmente alcanzables o que pueden tener tasas de respuesta más bajas que los aislados susceptibles. Nota: la categoría implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde los fármacos se concentran fisiológicamente.

Resistente (R): categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con una CIM en o por encima del punto de corte resistente no son inhibidos por las concentraciones generalmente alcanzables por el agente en esquemas de dosificación normales y/o que demuestran una CIM que caen en el rango en el que es probable que un mecanismo de resistencia microbiano específico y la eficacia clínica del fármaco contra el aislado no se ha demostrado de manera confiable en los estudios de tratamiento (66).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): es la concentración más baja a la que un agente antimicrobiano causa una reducción en el crecimiento visible de un microorganismo en una prueba de susceptibilidad de dilución en caldo o agar.

Cuadro 8. Puntos de corte en µg/ml según el CLSI

Antimicótico	Sensible	S-DD	Intermedio	Resistente
5-Fluorocitosina	≤ 4	N/A	8-16	≥ 32
Anfotericina	≤1	N/A	N/A	≥2
Fluconazol	≤ 8	16-32	N/A	≥ 64
Itraconazol	≤0.12	0.25-0.5	N/A	≥1
Ketoconazol	≤ 0.12	0.25-0.5	N/A	≥ 1
Posaconazol	≤1	2	N/A	≥4
Voriconazol	≤ 1	2	N/A	≥ 4

Tomado de: CLSI, 2008 (66) Donde: S = Sensible; S-DD = Susceptible dependiente de dosis; I = Intermedio; R = Resistente; NA= No aplica.

4.7 Análisis de información.

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicótica realizadas se registraron en tablas de Microsoft Excel para su análisis estadístico. Para el caso de las muestras de leche bovina se analizó la proporción a través de tablas cruzadas y fueron comparadas mediante la prueba de Ji-cuadrada ($P > 0.05$) cuando se utilizaron diversos antimicóticos en muestras de leche de animales sanos, subclínicos y clínicos. Para analizar las diferencias entre estos antimicóticos en estas condiciones (animales sanos, subclínicos y clínicos) se realizó una prueba de Bonferoni. Para el caso de las muestras de leche caprina se realizó el mismo procedimiento estadístico tomando en cuenta que todas las muestras de leche caprina eran clínicamente sanas.

5. Resultados

5.1 Reactivación de aislados de especies del género *Candida*.

De los 269 aislados de diversas especies del género *Candida* utilizados en el estudio, 171 provenían de la aislados de leche de cabra, de los cuales 41 fueron recuperadas de refrigeración mientras que 130 se recuperaron de congelación. Con relación a los 98 aislados de leche de vaca, se recuperaron 13 de refrigeración y 85 de congelación (Cuadro 9).

Cuadro 9. Reactivación de aislados de las diversas especies del género *Candida* obtenidos.

Especie de <i>Candida</i>	Método de conservación	
	Refrigeración	Congelación
Cabra		
<i>C. guilliermondii</i>	14	53
<i>C. kefyr</i>	19	37
<i>C. famata</i>	8	32
<i>Candida</i> spp	0	8
Vaca		
<i>Candida</i> spp	13	85

5.2 Identificación de especies del género *Candida* a partir de las leches de vacas.

Con relación a la morfología macroscópica y microscópica de las cepas de referencia, en las figuras 13 y 14 se muestran sus características en cultivo en SDA y con la tinción de Gram, respectivamente.

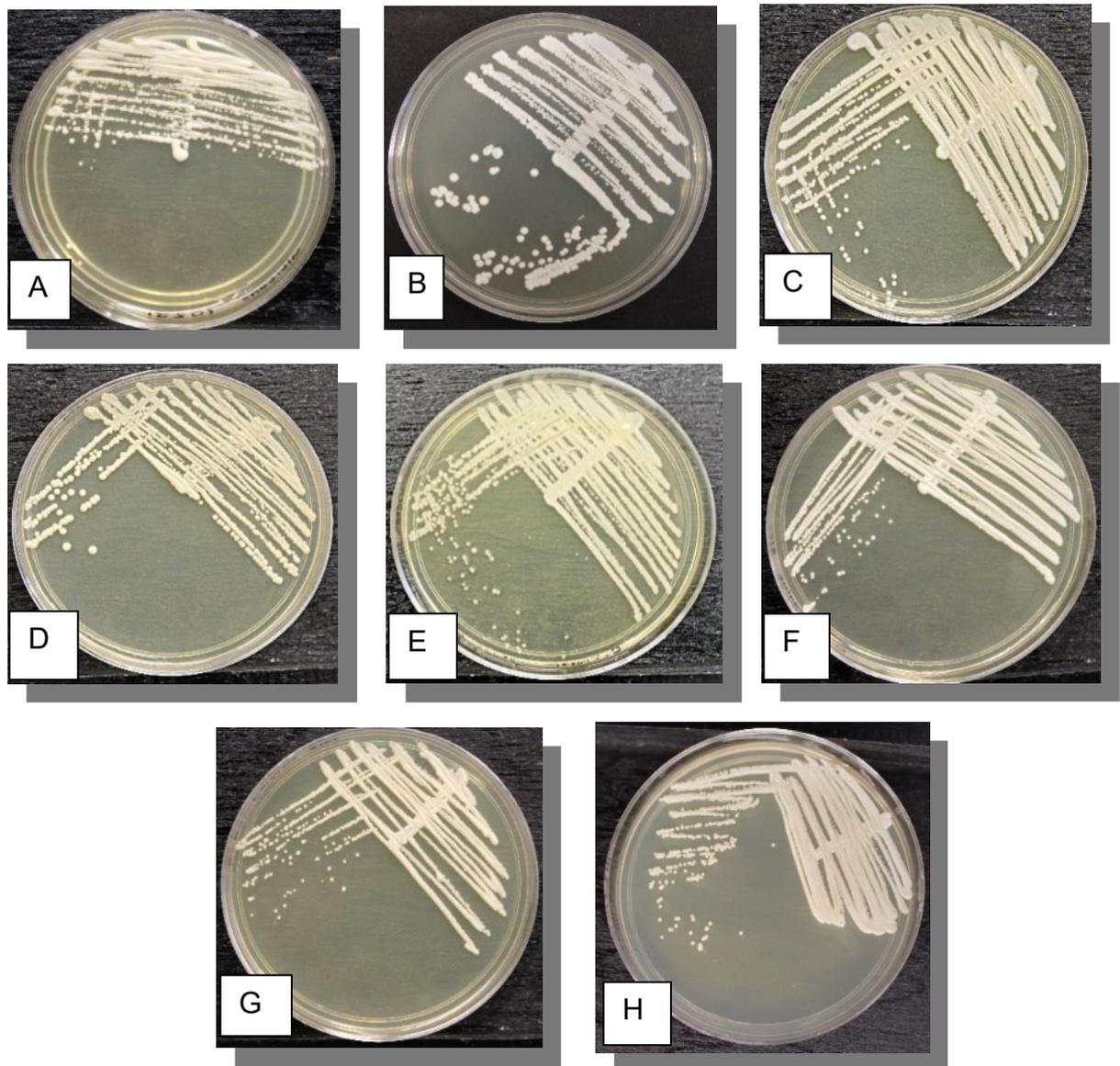


Figura 13. Morfología macroscópica de cepas de referencia del género *Candida* desarrolladas en SDA de 24 a 48h a 37°C. A) *C. albicans* ATCC 10231, colonias pequeñas, redondas, de color crema y apariencia mucoide; B) *C. glabrata* Instituto Pasteur, colonias de tamaño mediano redondas, de color blanco y apariencia cremosa; C) *C. guilliermondii* ATCC 04121 colonias pequeñas, redondas, de color crema y apariencia pastosa; D) *C. kefyr* ATCC 041219, colonias medianas, redondas, de color crema y apariencia pastosa; E) *C. krusei* ATCC 6258 colonias pequeñas, sin bordes definidos, de color crema, de apariencia seca; F) *C. lusitanae* ATCC 34449, colonias pequeñas, redondas, de color crema y apariencia mucoide; G) *C. parapsilosis* ATCC 22019 y H) *C. tropicalis* ATCC 750, colonias pequeñas, redondas, de color blanco y apariencia cremosa.

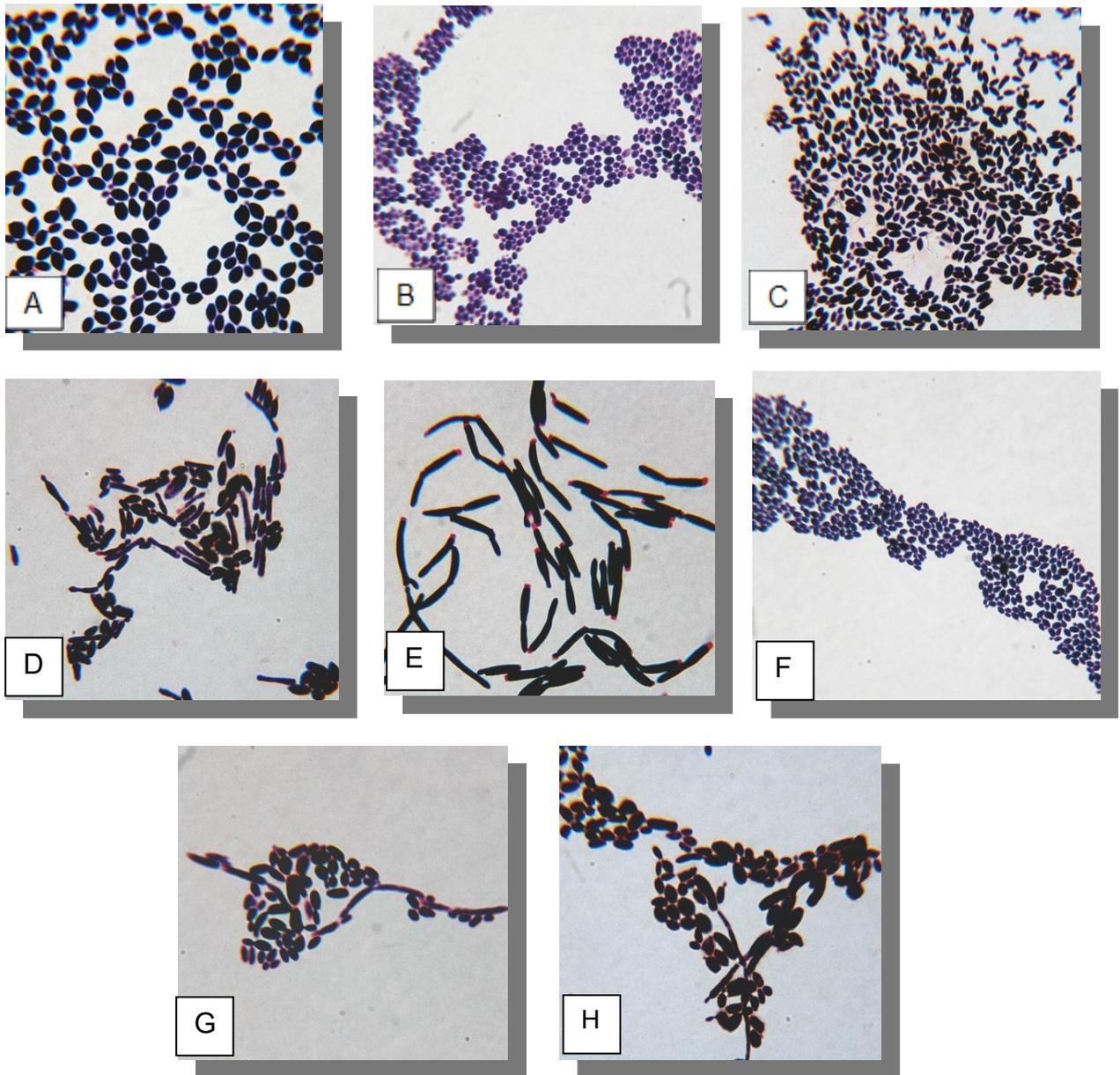


Figura 14. Morfología microscópica de cepas de referencia del género *Candida* teñidas con tinción de Gram. A) *C. albicans* ATCC 10231, blastoconidios ovalados (3.5-6x4-8 μ m); B) *C. glabrata* Instituto Pasteur, blastoconidios redondos a elipsoidales de (2.5-4x3-6 μ m); C) *C. guilliermondii* ATCC 04121, blastoconidios ovoides (1.5-4.8x2-15 μ m); D) *C. kefyr* ATCC 041219, blastoconidios ovoides(11x2-6 μ m); E) *C. krusei* ATCC 6258, blastoconidios alargados delgados (2-5x4-15 μ m); F) *C. lusitanae* ATCC 34449, blastoconidios ovoides(3.5-6x4-8 μ m); G) *C. parapsilosis* ATCC 22019, blastoconidios ovoides (3-4x5-8 μ m) y H) *C. tropicalis* ATCC 750, blastoconidios ovoides y elípticos de (3.5-7x5.5-10 μ m)

5.2.1 Formación de pseudohifas.

Para esta prueba, se utilizaron de las cepas de referencia, a *C. albicans* ATCC 10231 como control positivo para la formación de pseudohifa y a *C. glabrata* del Instituto Pasteur, como control negativo de formación de esta estructura (Figura 15).

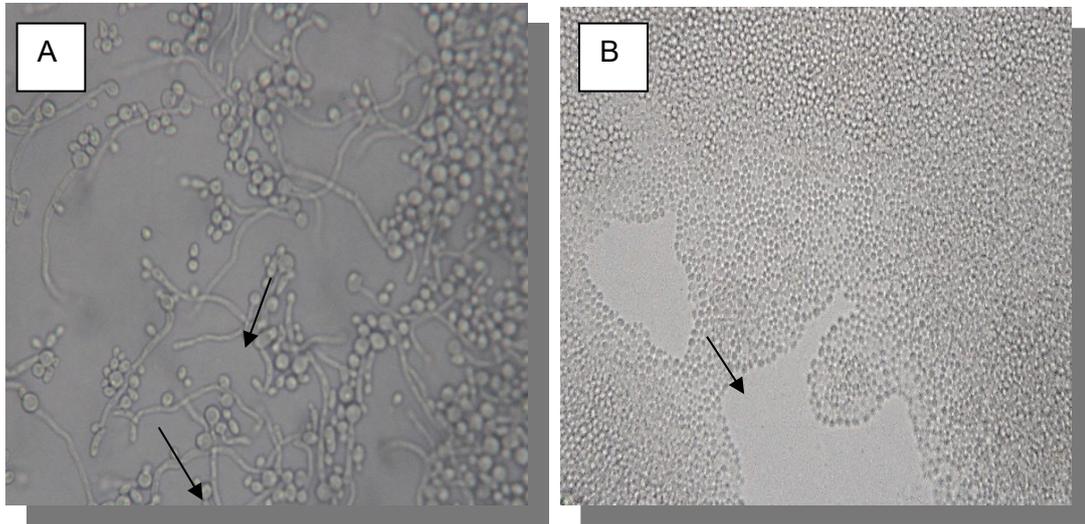


Figura 13. Formación de pseudohifas en agar arroz a 37°C durante 72 horas. A) Cultivo de *C. albicans* ATCC 10231 donde se observan blastoconidios y pseudohifas. B) Cultivo de *C. glabrata* Instituto Pasteur donde se observan solo blastoconidios.

Con relación a los 98 aislados de las muestras de leche de vaca, 30 formaron pseudohifa y 68 no mostraron formación de pseudohifa. Estos últimos aislados fueron sugerentes a *C. glabrata*, al ser la única especie del género que no produce esta estructura, aunado a la morfología colonial y microscópica.

5.2.2 Desarrollo en cicloheximida al 0.1%

La prueba se realizó a las cepas de referencia y se corroboró que *C. albicans* ATCC 10231, *C. guilliermondii* ATCC 04121 y *C. tropicalis* ATCC 750 se desarrollaron en el medio, mientras que, *C. glabrata* Instituto Pasteur, *C. kefyr* ATCC 041219, *C. krusei* ATCC 6258, *C. lusitaniae* ATCC 34449 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 no se desarrollaron en presencia de la cicloheximida al 0.1% (Figura 14).

De los 30 aislados positivos a la formación de pseudohifa, 14 se desarrollaron en cicloheximida, mientras que 16 no lo hicieron.

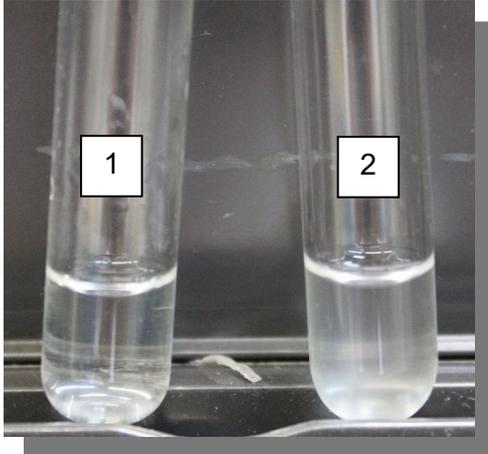


Figura 16. Prueba de susceptibilidad a cicloheximida al 0.1%. 1. *C. glabrata* Instituto Pasteur, tubo sin turbidez, prueba negativa. 2. *C. albicans* ATCC 10231 tubo con turbidez, desarrollo de la levadura, prueba positiva

5.2.3 Asimilación y fermentación de carbohidratos.

De los 30 aislados que presentaron formación de pseudohifas, 11 fueron sugerentes a *C. zeylanoides* y 7 a *C. krusei*, por su morfología macroscópica, microscópica, formación de pseudohifas y susceptibilidad a la cicloheximida al 0.1%. Los 12 aislados restantes que no se identificaron con las pruebas anteriores, se les realizó las pruebas de asimilación y fermentación de carbohidratos (Figura 17), así como el cultivo en CHROMagar Candida y Agar BIGGY

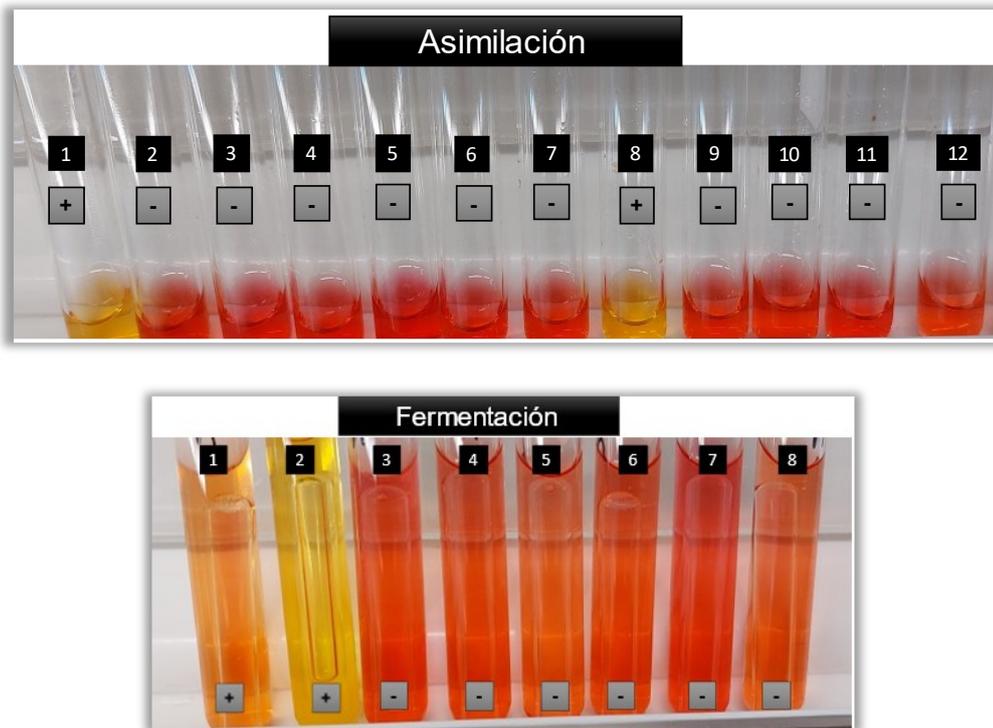


Figura 17. Asimilación y fermentación de carbohidratos de un aislado problema. Asimilación donde: 1: glucosa, 2: maltosa, 3: sacarosa, 4: galactosa, 5: lactosa, 6: rafinosa, 7: celobiosa, 8: trehalosa, 9: D-xilosa, 10: L-arabinosa, 11: melobiosa, 12: inositol. Tubos 1 y 8 positivos en color amarillo; tubos 2 al 7 y 9 al 12 negativos en color rojo. Fermentación donde: 1: glucosa, 2: maltosa, 3: sacarosa, 4: galactosa, 5: lactosa, 6 rafinosa, 7: celobiosa, 8: trehalosa. Tubos 1 y 2 positivos en color amarillo y presencia de gas en tubo Durham; tubos 3 al 8 negativos en color rojo.

5.2.4 Cultivo en CHROMagar y agar BIGGY.

El cultivo en estos medios se realizó para las cepas de referencia (Figura 18), y para los 12 aislados de vacas (Figura 19).

CHROMagar Candida



C. albicans ATCC 10231

CHROMagar: colonias color verde esmeralda.

Agar biggy: colonias color café rojizo.



C. glabrata Instituto Pasteur

CHROMagar: colonias color lila.

Agar biggy: colonias café claro.



C. guilliermondii ATCC 04121

CHROMagar: colonias de color lila azulado

Agar biggy: colonias de color café rojizo oscuro



C. kefyr ATCC 041219

CHROMagar: colonias color rosa claro

Agar Biggy: Colonias en color café rojizo claro

Agar BIGGY



CHROMagar Candida



C. krusei ATCC 6258

CHROMagar: colonias rosa claro

Agar Biggy: colonias café oscuro con halo amarillento, difunde al medio



C. lusitanae ATCC 34449

CHROMagar: colonias color lila

Agar biggy: no se desarrolla en el medio.



C. parapsilosis ATCC 22019

CHROMagar: colonias cremosa rosa claro.

Agar biggy: colonias café claro rojizo



C. tropicalis ATCC 750

CHROMagar: colonias color azul

Agar biggy: Colonias café oscuro rugosa

Agar BIGGY



Figura 18. Desarrollo de las cepas de referencia del género *Candida*, en CHROMagar Candida y agar BIGGY. Las especies de *Candida* presentan diferentes colores de acuerdo con su especie.

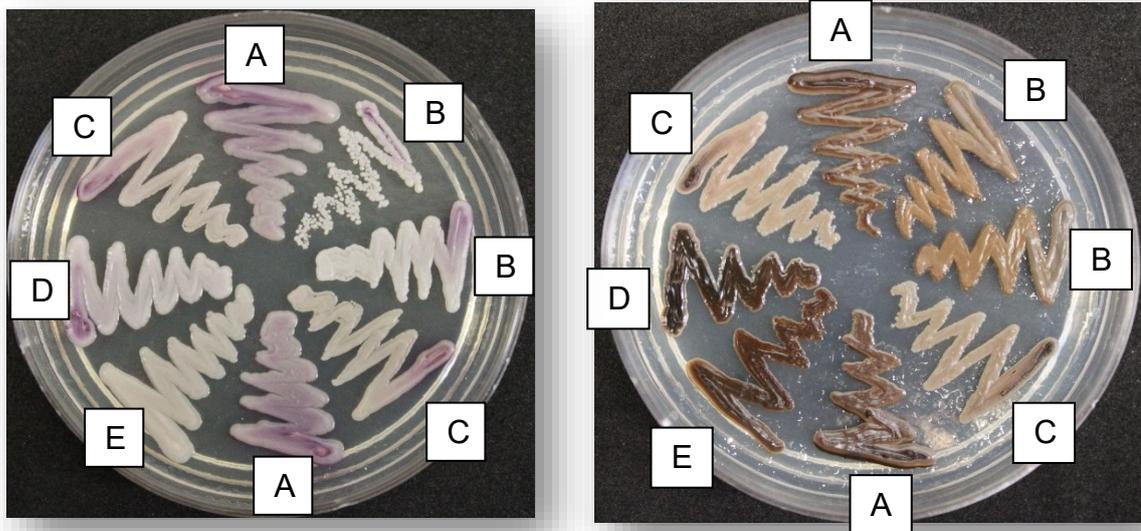


Figura 19. Ejemplo de algunos de los aislados de muestras de leche de vaca en CHROMagar Candida y agar BIGGY. CHROMagar Candida, aislados A colonias lilas, aislados B colonias lilas con blanco, aislados C colonias lilas tenue, aislados D de color blanco y lila, aislado E de color crema. Agar BIGGY, aislados A colonias café claro cremosas, aislados B colonias den color café claro, aislados C colonias en color beige, aislado 6 colonia color café oscuro y aislado E colonias café oscuro medio.

De los 98 aislados levaduriformes obtenidos de la leche de bovinos sanos y con mastitis subclínica y clínica, se identificaron 6 especies del género *Candida*, *C. glabrata* con un 69.4% (68/98), *C. zeylanoides* con un 11.22% (11/98), *C. krusei* con un 7.14% (7/98) y *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* y *C. bombi* con un 1.02% cada una (1/98) (cuadro 10).

En el caso de los 25 (25/98) aislados de vacas con mastitis clínica *C. glabrata* y *C. krusei* con un 7.14% (7/98), *C. zeylanoides* con un 5.1% (5/98) y *Candida spp* con un 4.08% (4/98) (Cuadro 10).

De los 32 (32/98) aislados de la leche de vacas sanas *C. glabrata* con un 26.53% (26/98), *C. zeylanoides* con un 3.06% (3/98) y *Candida spp* con un 3.06% (3/98) (Cuadro 10).

Con respecto a los 41 (41/98) aislados de vacas con mastitis subclínica las principales especies fueron *C. glabrata* con un 35.71% (35/98), *C. zeylanoides* con un 3.06% (3/98) y *Candida spp* con un 2.04% (2/98) (Cuadro 10).

Otras especies del género *Candida* aisladas fueron *C. parapsilosis* (subclínica), *C. lusitaniae* (clínica) y *C. bombi* (clínica) con una frecuencia menor al 1.02% (5/98) (Cuadro 10)

Cuadro 10. Identificación de las especies del género *Candida* aisladas de la leche de vacas clínicamente sanas y con mastitis clínica y subclínica.

Especies de <i>Candida</i>	Estado sanitario de la glándula mamaria			Frecuencia de aislamiento por especie	
	Sanos	Mastitis subclínica	Mastitis clínica	n	%
<i>C. glabrata</i>	26	35	7	68	69.40
<i>C. zeylanoides</i>	3	3	5	11	11.22
<i>C. krusei</i>	0	0	7	7	7.14
<i>C. parapsilosis</i>	0	1	0	1	1.02
<i>C. lusitaniae</i>	0	0	1	1	1.02
<i>C. bombi</i>	0	0	1	1	1.02
<i>Candida</i> spp	3	2	4	9	9.18
Total	32	41	25	98	100

5.3 Pruebas de susceptibilidad a antimicóticos.

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron a las cepas de referencia (figuras 20-26) y a los 269 aislados (171 de leche de cabra y 98 de leche de vaca).

El CLSI utiliza como cepas de control de calidad a *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* 6258, que fueron utilizadas en el presente trabajo. Los resultados obtenidos fueron concordantes con los valores de referencia dados por el CLSI 2008 con lo reportado por el CLSI (Cuadro 11).

Cuadro 11. Concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas de control de calidad utilizadas.

Antimicótico	<i>C. parapsilosis</i> según el CLSI	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 obtenido	<i>C. krusei</i> según el CLSI	<i>C. krusei</i> ATCC 6258 obtenido
5- fluorocitosina	0.12-0.5	0.25	8-32	8
Anfotericina	0.5-4	2	1-4	2
Fluconazol	1-4	4	16-128	64
Itraconazol	0.12-5	4	0.25-1	1
Ketoconazol	0.06-0.25	0.125	0.12-1	1
Posaconazol	0.06-0.25	0.125	0.12-1	1
Voriconazol	0.03-0.25	0.25	0.12-1	1

Adaptado de CLSI 2008

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad de las demás cepas de referencia utilizadas en el presente estudio, *C. albicans* ATCC 10213, *C. glabrata* Instituto Pasteur, *C. guilliermondii* ATCC 04121, *C. kefyr* ATCC 041219, *C. krusei* ATCC 6258, *C. lusitaniae* ATCC 34449, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 750, se presentan en el cuadro 12.

Cuadro 12. Resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicótica de las cepas de referencia

Cepas de referencia	5FC			Anf B		Itraconazol			Ketoconazol			Fluconazol			Posaconazol			Voriconazol		
	S	I	R	S	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SD D	R	S	SD D	R
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	X	-	-	X	-	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X
<i>C. guilliermondii</i> ATCC 04121	X	-	-	X	-	-	-	X	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-
<i>C. glabrata</i> Instituto Pasteur	X	-	-	X	-	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X
<i>C. kefyr</i> ATCC 041219	X	-	-	X	-	-	-	X	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	X	-	-	X	-	-
<i>C. lusitaniae</i> ATCC 34449	X	-	-	X	-	-	-	X	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	X	-	-	-	X	-	-	X	X	-	-	-	X	-	X	-	-	X	-	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	X	-	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X

Donde: Anf B = Anfotericina B; S= sensible; SDD= sensible dependiente de dosis; I= intermedio; R= resistente.

La lectura final de las microplacas se realizó a las 72h, en todas las placas la columna 12 es el control de desarrollo de cada uno de los aislados, los pozos con desarrollo se ven con turbidez, los pozos sin desarrollo se ven transparentes.

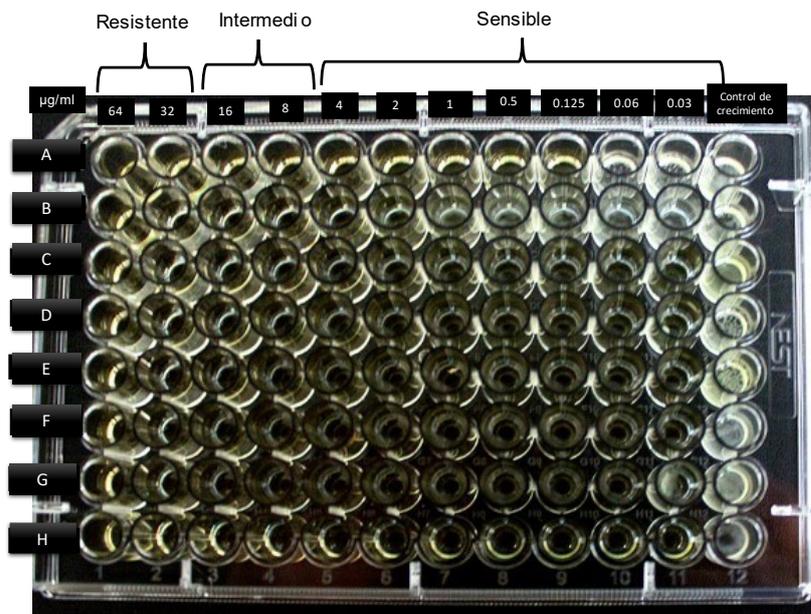


Figura 20. Prueba de susceptibilidad antimicótica a la 5- fluorocitosina de las cepas de referencia. *C.parapsilosis* ATCC 22019 (fila A) desarrollo de 0.06 a 0.03 µg; *C. krusei* ATCC 6258 (Fila B) desarrollo de 1 a 0.03 µg; *C. guilliermondii* ATCC 04121 (Fila C) sin desarrollo; *C. kefyr* ATCC 041219 (Fila D) sin desarrollo; *C. glabrata* Instituto Pasteur (Fila E) sin desarrollo; *C. lusitaniae* ATCC 34449 (Fila F) sin desarrollo; *C. albicans* ATCC 10231 (Fila G) desarrollo en 0.03 µg; *C. tropicalis* ATCC 750 (Fila H) sin desarrollo. Columna 12 control de desarrollo.

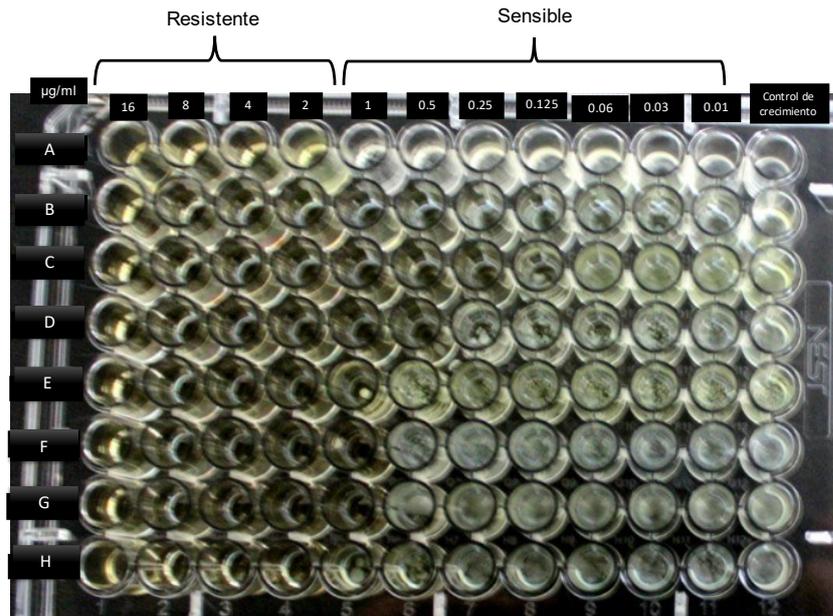


Figura 21 Prueba de susceptibilidad antimicótica a anfotericina B de cepas de referencia: aislado 1 *C. parapsilosis* ATCC 22019 con desarrollo de 1 a 0.01 µg, aislado 2 *C. krusei* ATCC 6258 con desarrollo de 2 a 0.01 µg, aislado 3 *C. guilliermondii* ATCC 04121 con desarrollo de 0.125 a 0.01 µg, aislado 4 *C. kefyr* ATCC 041219 con desarrollo de 0.25 a 0.01 µg, aislado 5 *C. glabrata* Instituto Pasteur con desarrollo de 1 a 0.01 µg, aislado 6 *C. lusitaniae* ATCC 34449 con desarrollo de 0.5 a 0.01 µg, aislado 7 *C. albicans* ATCC 10231 con desarrollo de 0.5 a 0.01 µg, aislado 8 *C. tropicalis* ATCC 750 con desarrollo de 1 a 0.01 µg. La columna 12 es el control de desarrollo.

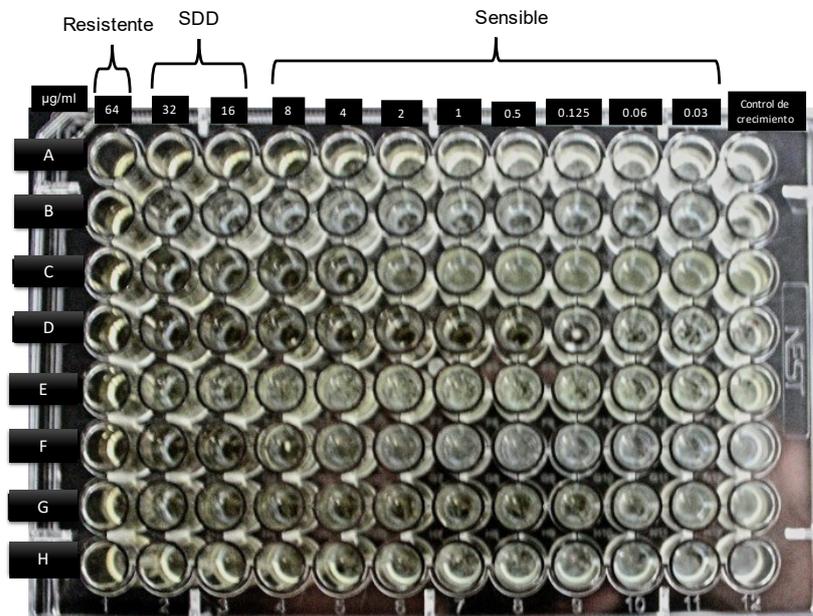


Figura 22 Prueba de susceptibilidad antimicótica a fluconazol de cepas de referencia: aislado 1 *C. parapsilosis* ATCC 22019 con desarrollo de 4 a 0.03 µg, aislado 2 *C. krusei* ATCC 6258 con desarrollo de 16 a 0.03 µg, aislado 3 *C. guilliermondii* ATCC 04121 con desarrollo de 4 a 0.03 µg, aislado 4 *C. kefyr* ATCC 041219 con desarrollo de 0.125 a 0.03 µg, aislado 5 *C. glabrata* Instituto Pasteur con desarrollo de 32 a 0.03 µg, aislado 6 *C. lusitaniae* ATCC 34449 con desarrollo de 4 a 0.03 µg, aislado 7 *C. albicans* ATCC 10231 con desarrollo de 32 a 0.03 µg, aislado 8 *C. tropicalis* ATCC 750 con desarrollo de 64 a 0.03 µg. La columna 12 es el control de desarrollo.

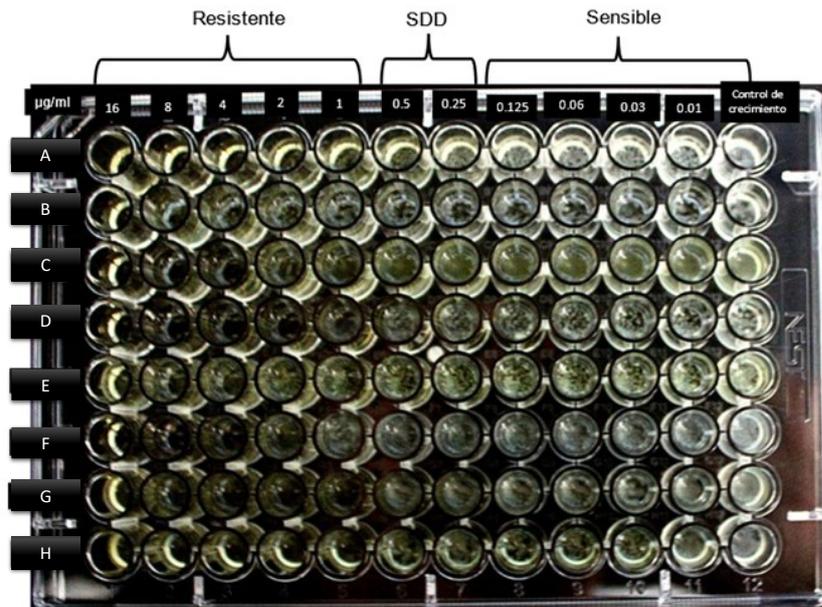


Figura 23 Prueba de susceptibilidad antimicótica a itraconazol de cepas de referencia: aislado 1 *C. parapsilosis* ATCC 22019 con desarrollo de 2 a 0.01 µg, aislado 2 *C. krusei* ATCC 6258 con desarrollo de 8 a 0.01 µg, aislado 3 *C. guilliermondii* ATCC 04121 con desarrollo de 2 a 0.01 µg, aislado 4 *C. kefyr* ATCC 041219 con desarrollo de 1 a 0.01 µg, aislado 5 *C. glabrata* Instituto Pasteur con desarrollo de 8 a 0.01 µg, aislado 6 *C. lusitaniae* ATCC 34449 con desarrollo de 2 a 0.01 µg, aislado 7 *C. albicans* ATCC 10231 con desarrollo de 0.5 a 0.01 µg, aislado 8 *C. tropicalis* ATCC 750 con desarrollo de 0.5 a 0.01 µg. La columna 12 es el control de desarrollo.

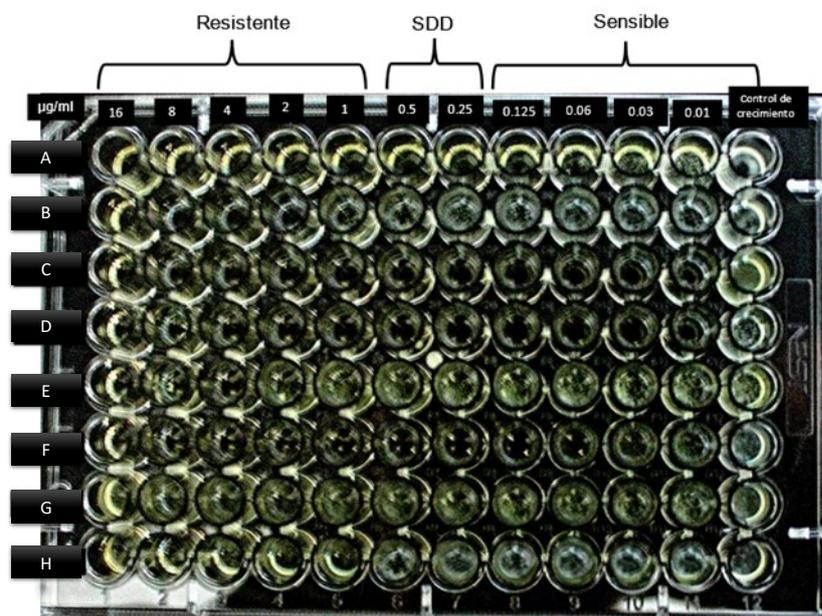


Figura 24 Prueba de susceptibilidad antimicótica a ketoconazol de cepas de referencia: aislado 1 *C. parapsilosis* ATCC 22019 con desarrollo de 0.03 a 0.01 µg, aislado 2 *C. krusei* ATCC 6258 con desarrollo de 1 a 0.01 µg, aislado 3 *C. guilliermondii* ATCC 04121 sin desarrollo, aislado 4 *C. kefyr* ATCC 041219 sin desarrollo, aislado 5 *C. glabrata* Instituto Pasteur con desarrollo de 2 a 0.01 µg, aislado 6 *C. lusitaniae* ATCC 34449 con desarrollo de 0.03 a 0.01 µg, aislado 7 *C. albicans* ATCC 10231 con desarrollo de 8 a 0.01, aislado 8 *C. tropicalis* ATCC 750 con desarrollo de 0.5 a 0.01 µg. La columna 12 es el control de desarrollo.

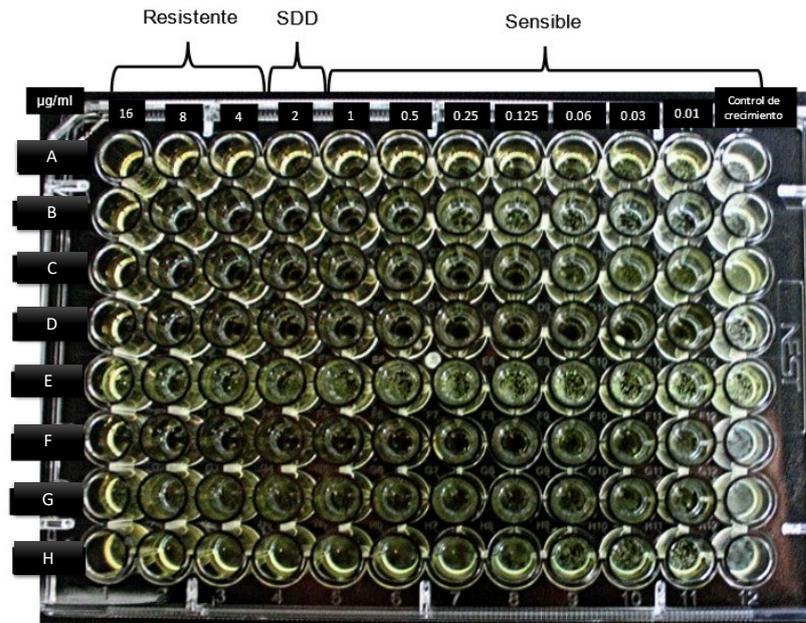


Figura 25 Prueba de susceptibilidad antimicótica a posaconazol de cepas de referencia aislado 1 *C. parapsilosis* ATCC 22019 con desarrollo de 0.06 a 0.01 µg, aislado 2 *C. krusei* ATCC 6258 con desarrollo de 0.25 a 0.01 µg, aislado 3 *C. guilliermondii* ATCC 04121 con desarrollo de 0.06 a 0.01 µg, aislado 4 *C. kefyi* ATCC 041219 sin desarrollo, aislado 5 *C. glabrata* Instituto Pasteur con desarrollo de 16 a 0.01 µg, aislado 6 *C. lusitaniae* ATCC 34449 con desarrollo de 0.06 a 0.01 µg, aislado 7 *C. albicans* ATCC 10231 con desarrollo de 16 a 0.01, aislado 8 *C. tropicalis* ATCC 750 con desarrollo de 8 a 0.01 µg. La columna 12 es el control de desarrollo.

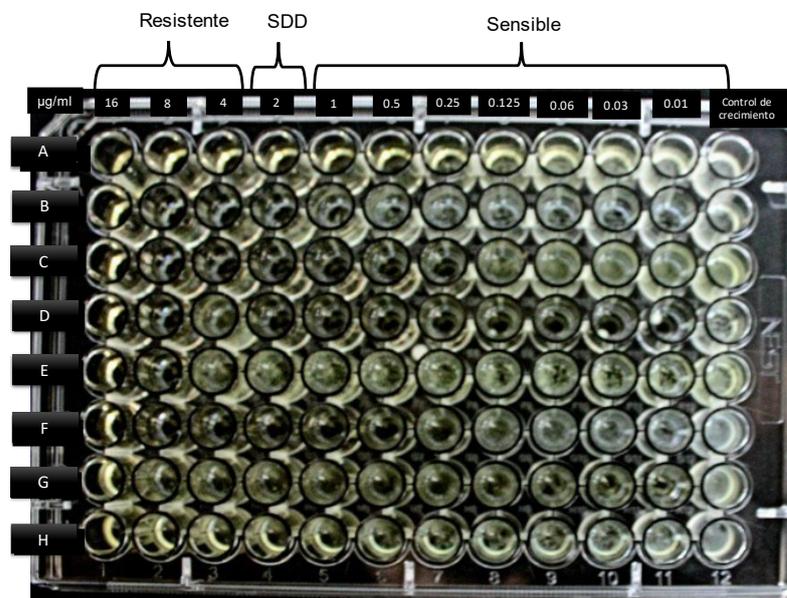


Figura 26 Prueba de susceptibilidad antimicótica a voriconazol de cepas de referencia aislado 1 *C. parapsilosis* ATCC 22019 con desarrollo de 0.25 a 0.01 µg, aislado 2 *C. krusei* ATCC 6258 con desarrollo de 0.5 a 0.01 µg, aislado 3 *C. guilliermondii* ATCC 04121 con desarrollo de 0.125 a 0.01 µg, aislado 4 *C. kefyi* ATCC 041219 sin desarrollo, aislado 5 *C. glabrata* Instituto Pasteur con desarrollo de 4 a 0.01 µg, aislado 6 *C. lusitaniae* ATCC 34449 con desarrollo de 0.125 a 0.01 µg, aislado 7 *C. albicans* ATCC 10231 con desarrollo de 16 a 0.01, aislado 8 *C. tropicalis* ATCC 750 con desarrollo de 8 a 0.01 µg. La columna 12 es el control de desarrollo.

Con relación a las pruebas de susceptibilidad de los aislados provenientes de la leche de cabras clínicamente sanas, se encontró que:

- a) De los 67 aislados de *C. guilliermondii*, todos fueron sensibles a la 5-fluorocitosina. El 100% (67/67) fueron resistentes al itraconazol, el 67.16% (45/67) resistentes a la anfotericina B, 25.37 (17/67) a ketoconazol, 19.4% (13/67) a voriconazol, 14.93% (10/67) a fluconazol, y 14.93% (10/67) al posaconazol y (Cuadro 13) (Figuras 27A-27G).
- b) De los 56 aislados de *C. kefyr*, todos fueron sensibles a 5 fluorocitosina y a posaconazol, mientras que presentaron una resistencia del 66.07% (37/56) a anfotericina B, 17.86% (10/56) a fluconazol, 7.14% (4/56) a voriconazol, 5.36% (3/56) a ketoconazol y 3.57% (2/56) a itraconazol (Cuadro 13),
- c) De los 40 aislados de *C. famata*, todos fueron sensibles a 5-fluorocitosina, ketoconazol, posaconazol y voriconazol. Se observó resistencia del 47.5% (19/40) a itraconazol, 42.5% (17/40) a anfotericina B y 15% (6/40) a fluconazol y (Cuadro 13).
- d) De los 8 aislados de *Candida spp.* fueron sensibles a 5-fluorocitosina, fluconazol, ketoconazol y posaconazol, siendo resistentes a anfotericina B y solo el 12.5% (1/8) a voriconazol (Cuadro 13).

Cuadro 13. Patrones de susceptibilidad de las especies del género *Candida* obtenidos de la leche de cabras clínicamente sanas

Especies de <i>Candida</i>	ANTIMICÓTICO																				
	5FC			Anf B		Flu			Itra			Keto			Posa			Vori			
	S	I	R	S	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	
<i>C. kefyr</i> n=56	56 (100)	-	-	19 (33.93)	37 (66.07)	23 (41.07)	23 (41.07)	10 (17.86)	-	54 (96.43)	2 (3.57)	26 (46.43)	27 (48.21)	3 (5.36)	47 (83.93)	9 (16.07)	-	51 (91.07)	1 (1.79)	4 (7.14)	
<i>C. guilliermondii</i> n=67	67 (100)	-	-	22 (44.78)	45 (67.16)	30 (44.78)	27 (40.30)	10 (14.93)	-	-	67 (100)	24 (35.82)	26 (38.81)	17 (25.37)	50 (74.63)	7 (10.45)	10 (14.93)	54 (80.60)	-	13 (19.40)	
<i>C. famata</i> n=40	40 (100)	-	-	23 (57.50)	17 (42.50)	24 (60)	10 (25)	6 (15)	-	21 (52.5)	19 (47.5)	30 (75)	10 (25)	-	39 (97.5)	1 (2.5)	-	39 (97.5)	1 (2.5)	-	
<i>Candida spp.</i> n=8	8 (100)	-	-	-	8 (100)	6 (75)	2 (25)	-	-	-	8 (100)	8 (100)	-	-	8 (100)	-	-	7 (87.5)	-	1 (12.5)	

Donde: 5FC= 5 fluorocitosina; Anf B = Anfotericina B; Flu = Fluconazol; Itra= Itraconazol; Keto= Ketoconazol; Posa= Posaconazol; Vori= Voriconazol; S= sensible, I= intermedio, SDD= sensible dependiente de dosis; R= resistente.

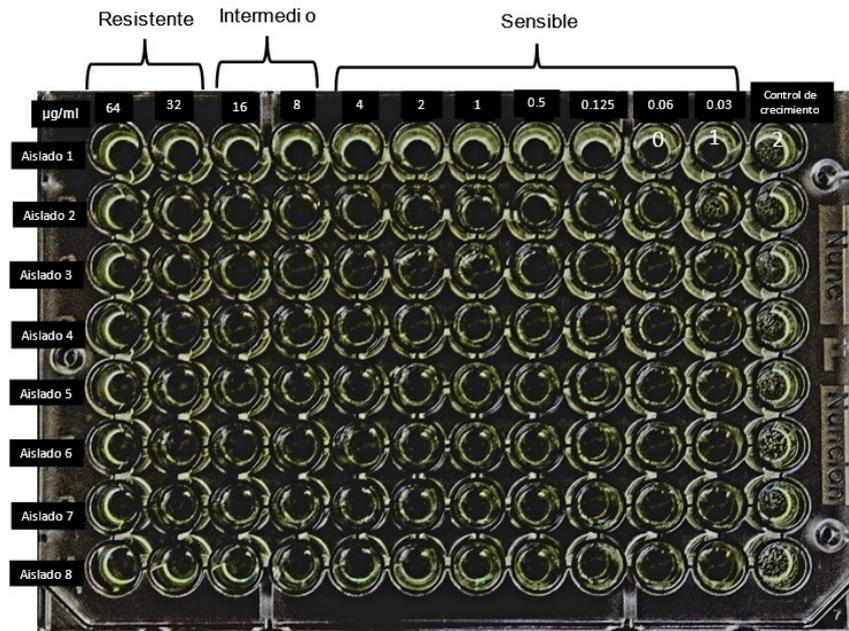


Figura 27 A: Prueba de susceptibilidad a 5 fluorocitosina. Aislados de *C. guilliermondii* obtenidos de leche cabras sanas. Los aislados 1 y 3 al 8 no tuvieron desarrollo, el aislado 2 tuvo un desarrollo a 0.03 µg. La columna 12 es el control de desarrollo.

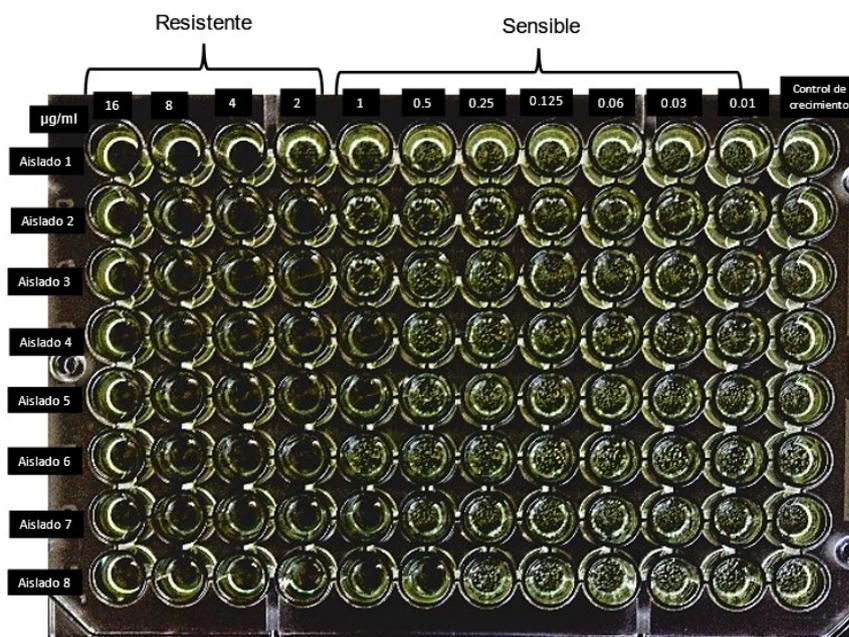


Figura 27 B: Prueba de susceptibilidad a anfotericina B. Aislados de *C. guilliermondii* obtenidos de leche cabras sanas. Aislado 1 con desarrollo de 2 a 0.01 µg, aislados 2, 3 y 6 con desarrollo de 1 a 0.1 µg, aislados 4, 5 y 7 con desarrollo de 0.5 a 0.01, aislado 8 con desarrollo de 0.25 a 0.01. La columna 12 es el control de desarrollo.

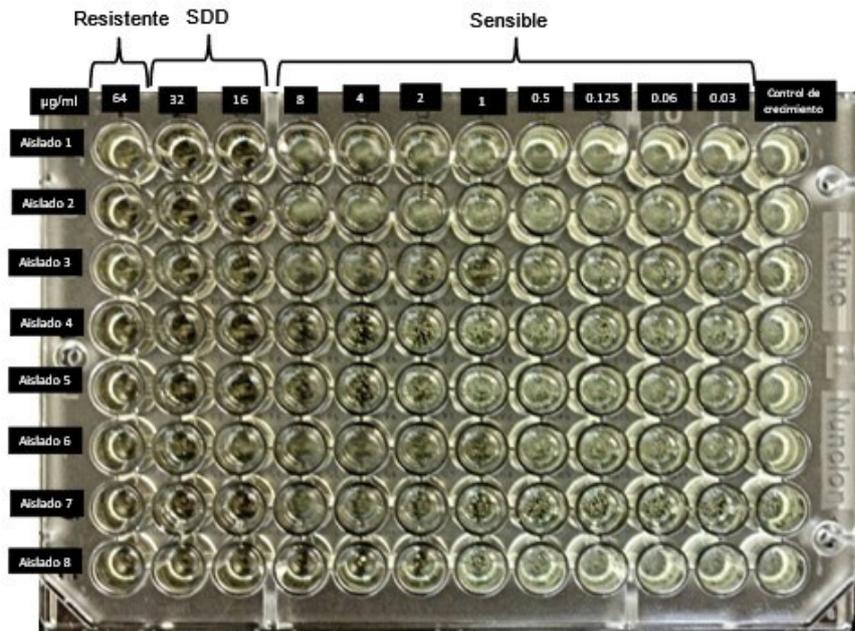


Figura 27 C: Prueba de susceptibilidad a Fluconazol. Aislados de *C. guilliermondii* obtenidos de leche cabras sanas. aislados 1 al 5 y 7 al 8 con desarrollo de 8 a 0.03 µg, aislado 6 con desarrollo de 16 a 0.03 µg. La columna 12 es el control de desarrollo.

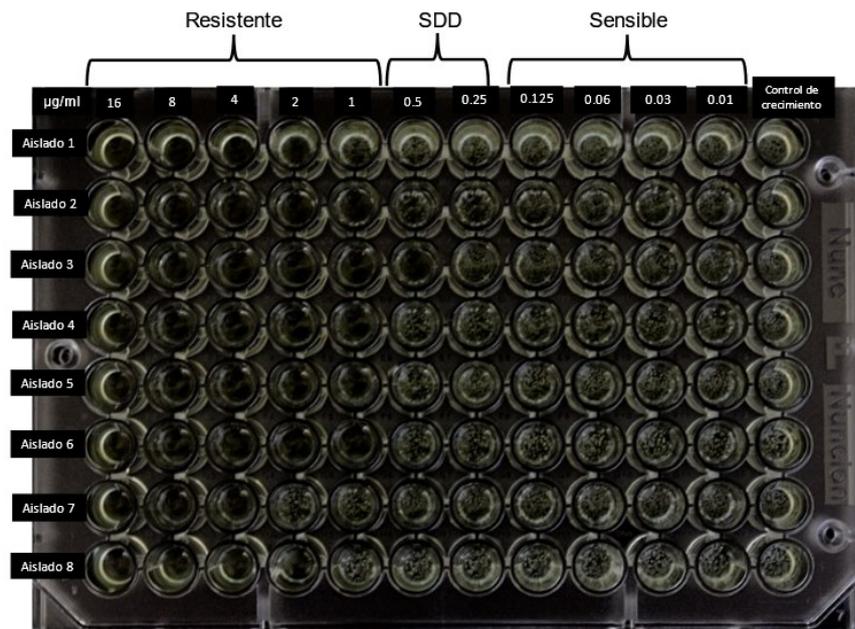


Figura 27 D. Prueba de susceptibilidad a Itraconazol. Aislados de *C. guilliermondii* obtenidos de leche cabras sanas. Los aislados 1 y 8 tienen un desarrollo de 1 a 0.01 µg, los aislados 2, 4, 5 y 6 tienen un desarrollo de 0.5 a 0.01 µg, el aislado 3 tiene un desarrollo de 0.25 a 0.01 µg, el aislado 7 tiene un desarrollo de 2 a 0.01 µg. La columna 12 es el control de desarrollo.

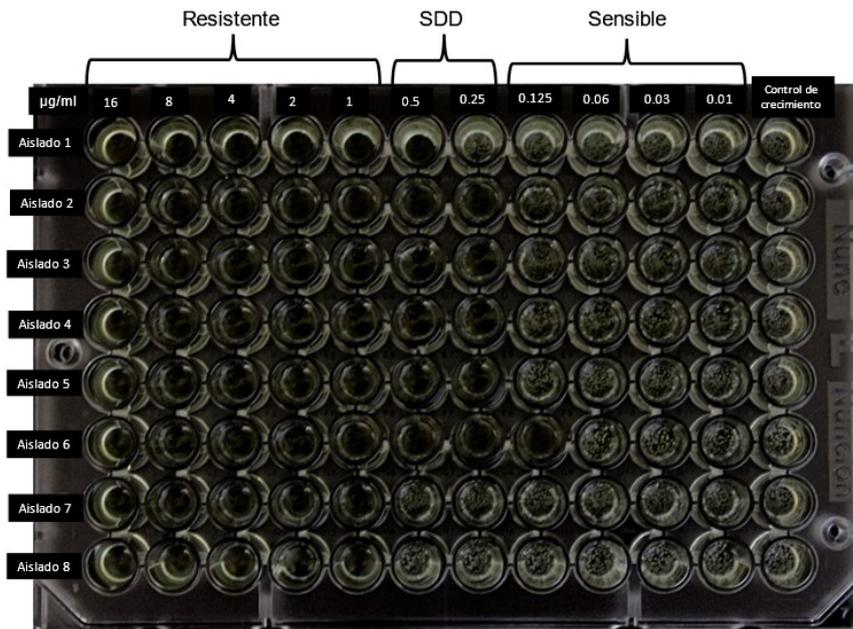


Figura 27 E Prueba de susceptibilidad a ketoconazol. Aislados de *C. guilliermondii* obtenidos de leche cabras sanas. El aislado 1 tiene un desarrollo de 0.25 a 0.01 µg, los aislados 2 al 5 tienen un desarrollo de 0.125 a 0.01 µg, el aislado 6 tiene un desarrollo de 0.06 a 0.01, los aislados 7 y 8 tienen un desarrollo de 0.5 a 0.01 µg La columna 12 es el control de desarrollo.

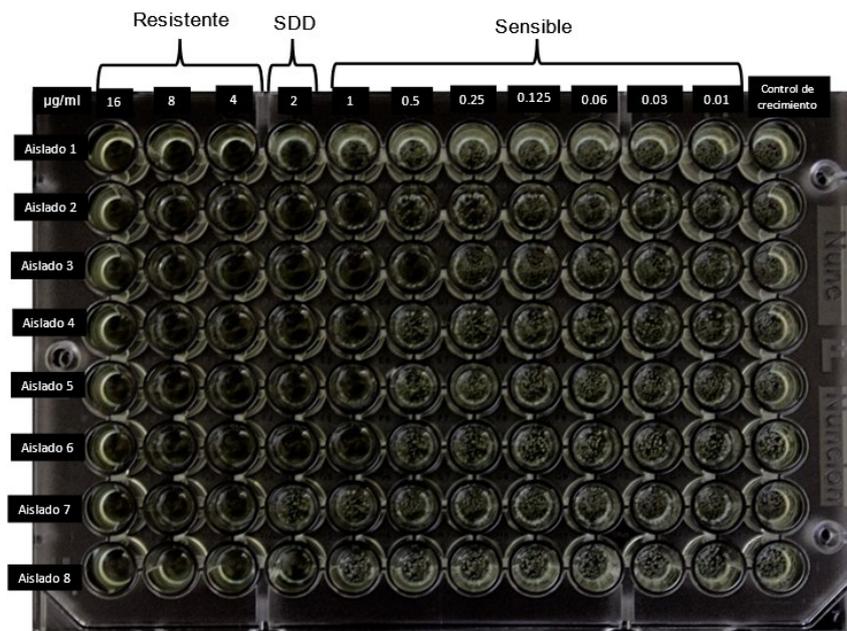


Figura 27 F Prueba de susceptibilidad a Posaconazol. Aislados de *C. guilliermondii* obtenidos de leche cabras sanas. Los aislados 1 y 8 tiene desarrollo de 1 a 0.01 µg, los aislados 2, 4, 5 y 6 tienen desarrollo de 0.5 a 0.01 µg, el aislado 3 tiene desarrollo de 0.25 a 0.01 µg, el aislado 7 tiene desarrollo de 2 a 0.01 µg. La columna 12 es el control de desarrollo.

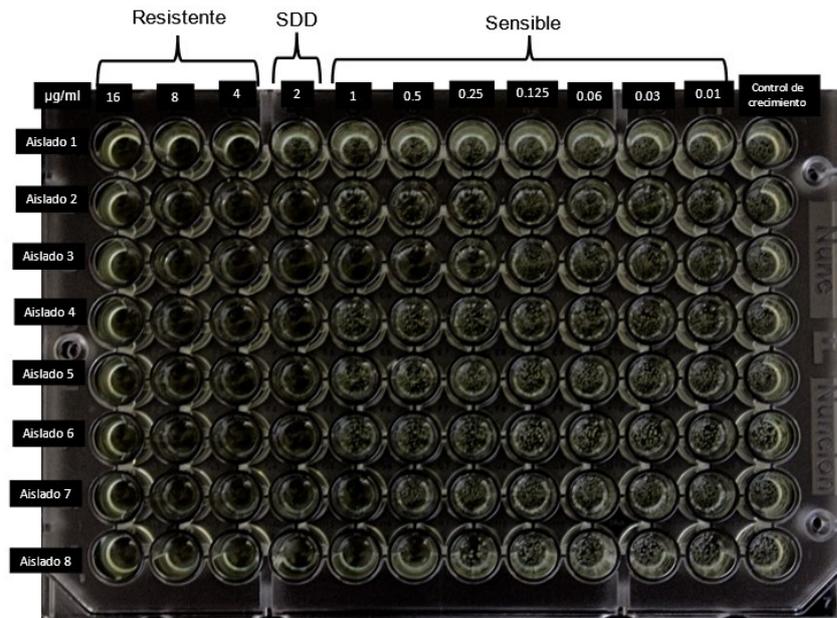


Figura 27 G Pruebas de susceptibilidad a voriconazol. Aislados de *C. guilliermondii* obtenidos de leche cabras sanas, el aislado 2 tiene un desarrollo de 2 a 0.01 µg, los aislados 2, 4, 5, 6 tienen un desarrollo de 1 a 0.01 µg, el aislado 3 tiene un desarrollo de 0.125 a 0.01 µg, el aislado 7 tiene un desarrollo de 0.5 a 0.01 y el aislado 8 tiene un desarrollo de 0.25 a 0.01 µg. La columna 12 es el control de desarrollo.

Con respecto a los 26 aislados provenientes de glándulas mamarias sanas de vaca.

- a) Los 26 aislados de *C. glabrata* fueron sensibles a 5-fluorocitosina y a anfotericina B, siendo todos los aislados resistentes a fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol y voriconazol (cuadro 14) (Figuras 28A-28G).
- b) De los 3 aislados de *C. zeylanoides* fueron sensibles a 5-fluorocitosina y resistentes a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y posaconazol. En el caso del voriconazol presentaron una resistencia del 66.67% (2/3) (cuadro 14).
- c) Los 3 aislados identificados como *Candida spp* fueron sensibles a 5-fluorocitosina, posaconazol y voriconazol, siendo resistentes a la a la anfotericina B e itraconazol y con un 33.33% (1/3) para fluconazol y ketoconazol, respetivamente (cuadro 14).

De los aislados provenientes de glándulas mamarias provenientes de vacas con mastitis subclínica, se obtuvo:

- a) De los 35 aislados de *C. glabrata*, todos fueron sensibles a 5-fluorocitosina y a anfotericina B, presentando una resistencia del 100% (35/35) a fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol y voriconazol (cuadro 14).
- b) Los 3 aislados de *C. zeylanoides* fueron sensibles a 5-fluorocitosina y posaconazol, siendo el 100% (3/3) resistentes a anfotericina B, fluconazol, itraconazol y ketoconazol y del 66.67% (2/3) para el voriconazol (cuadro 14).
- c) Los 2 aislados de *Candida spp* (2) fueron sensibles a 5-fluorocitosina, posaconazol y voriconazol, y resistentes para anfotericina b, fluconazol, itraconazol y ketoconazol (cuadro 14).
- d) El aislado de *C. parapsilosis* fue sensible a 5-fluorocitosina, fluconazol, posaconazol y voriconazol y resistente a anfotericina B, itraconazol y ketoconazol (cuadro 14).

Con respecto a los aislados provenientes de glándulas mamarias de vacas con mastitis clínica, se observó que:

- a) Los 7 aislados de *C. glabrata* fueron sensibles a 5-fluorocitosina y a anfotericina B, y presentaron una resistencia del 100% (7/7) para ketoconazol, posaconazol y voriconazol y del 85.71% (6/7) para fluconazol e itraconazol, respetivamente (cuadro 14).
- b) Los 7 aislados de *C. krusei* fueron sensibles a 5-fluorocitosina, y se observó una resistencia del 100% (7/7) para fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol y voriconazol y del 85.71% (6/7) para anfotericina B, y (cuadro 14).
- c) De los 5 aislados de *C. zeylanoides*, todos fueron sensibles a 5-fluorocitosina y posaconazol, con una resistencia del 100% (5/5) para anfotericina B, fluconazol, itraconazol y ketoconazol y del 60% (3/5) para voriconazol (Cuadro 14).
- d) Los 4 aislados de *Candida spp* fueron sensibles a 5-fluorocitosina y voriconazol, presentando una resistencia del 100% (4/4) a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, y del 50% (2/4) a ketoconazol y del 25% (1/4) a posaconazol (cuadro 14).
- e) El aislado de *C. bombi* fue sensible a 5-fluorocitosina y fluconazol y resistente a anfotericina B, itraconazol, ketoconazol, posaconazol y voriconazol (cuadro 14).
- f) El aislado de *C. lusitaniae* fue sensible a 5-fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol, y solo resistente a ketoconazol (cuadro 14).

Cuadro 14. Patrones de susceptibilidad de las especies del género *Candida* obtenidos de la leche de vacas clínicamente sanas y con mastitis subclínica y clínica.

Especie de <i>Candida</i>	n	5FC			Anfotericina B		Fluconazol			Itraconazol			Ketoconazol			Posaconazol			Voriconazol			
		-	S	I	R	S	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R
<i>C. glabrata</i> Sanas	26 (100)	26 (100)	-	-	26 (100)	-	-	-	26 (100)	-	1 (3.85)	25 (96.15)	-	1 (3.85)	25 (96.15)	-	-	26 (100)	-	-	26 (100)	
<i>C. glabrata</i> Subclínicas	35 (100)	35 (100)	-	-	35 (100)	-	-	-	35 (100)	-	-	35 (100)	-	-	35 (100)	-	-	35 (100)	-	-	35 (100)	
<i>C. glabrata</i> Clínicas	7 (100)	7 (100)	-	-	7 (100)	-	-	1 (14.29)	6 (85.71)	-	1 (14.29)	6 (85.71)	-	-	7 (100)	-	-	7 (100)	-	-	7 (100)	
<i>C. zeylanoides</i> Sanas	3 (100)	1 (33.33)	2 (66.67)	-	-	3 (100)	-	-	3 (100)	-	-	3 (100)	-	-	3 (100)	3 (100)	-	-	-	-	1 (33.33)	2 (66.67)
<i>C. zeylanoides</i> Subclínicas	3 (100)	-	3 (100)	-	-	3 (100)	-	-	3 (100)	-	-	3 (100)	-	-	3 (100)	3 (100)	-	-	-	-	1 (33.33)	2 (66.67)
<i>C. zeylanoides</i> Clínicas	5 (100)	-	5 (100)	-	-	5 (100)	-	-	5 (100)	-	-	5 (100)	-	-	5 (100)	5 (100)	-	-	-	-	2 (40)	3 (60)
<i>C. krusei</i> Clínicas	7 (100)	7 (100)	-	-	1 (14.29)	6 (85.71)	-	-	7 (100)	-	-	7 (100)	-	-	7 (100)	-	-	7 (100)	-	-	7 (100)	
<i>C. bombi</i> Clínica	1 (100)	1 (100)	-	-	-	1 (100)	-	1 (100)	-	-	-	1 (100)	-	-	1 (100)	-	-	1 (100)	-	-	1 (100)	
<i>C. lusitanae</i> Clínica	1 (100)	1 (100)	-	-	1 (100)	-	1 (100)	-	-	-	1 (100)	-	-	1 (100)	1 (100)	-	-	1 (100)	-	-	1 (100)	
<i>C. parapsilosis</i> Subclínica	1 (100)	1 (100)	-	-	-	1 (100)	-	1 (100)	-	-	-	1 (100)	-	-	1 (100)	1 (100)	-	-	-	-	1 (100)	
<i>Candida</i> spp. Sanas	3 (100)	2 (66.67)	1 (33.33)	-	-	3 (100)	-	2 (66.67)	1 (33.33)	-	-	3 (100)	1 (33.33)	1 (33.33)	1 (33.33)	3 (100)	-	-	-	2 (66.67)	1 (33.33)	
<i>Candida</i> spp. Subclínicas	2 (100)	2 (100)	-	-	-	2 (100)	-	-	2 (100)	-	-	2 (100)	-	-	2 (100)	2 (100)	-	-	-	1 (50)	1 (50)	
<i>Candida</i> spp. Clínicas	4 (100)	4 (100)	-	-	-	4 (100)	-	-	4 (100)	-	-	4 (100)	1 (25)	1 (25)	2 (50)	3 (75)	-	1 (25)	-	3 (75)	1 (25)	

Donde: S: sensible, I: intermedio, SDD: sensible dependiente de dosis y R: resistente

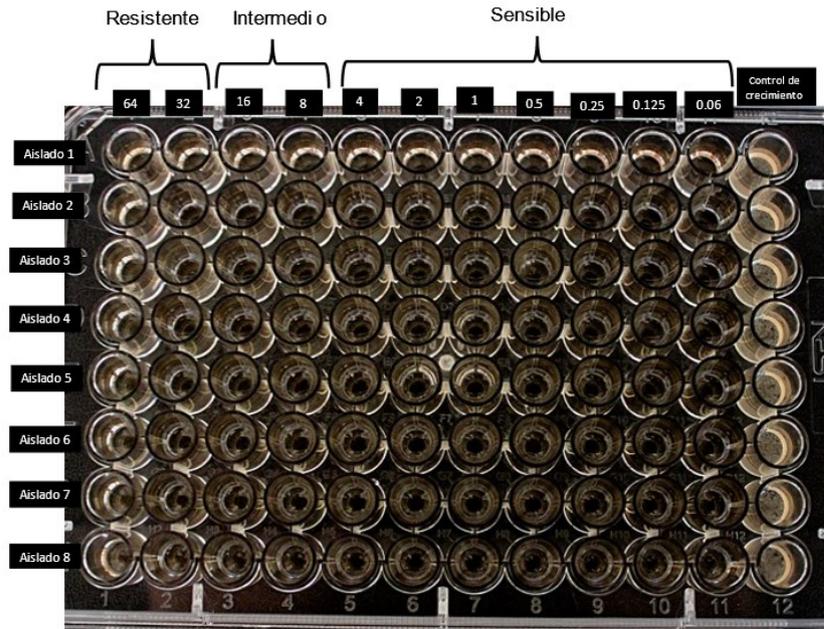


Figura 28 A: pruebas de susceptibilidad a 5 Fluorocitosina. Aislados de *C. glabrata* obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios. Ningún aislado se desarrollo en presencia de este antimicótico. La columna 12 es el control de desarrollo.

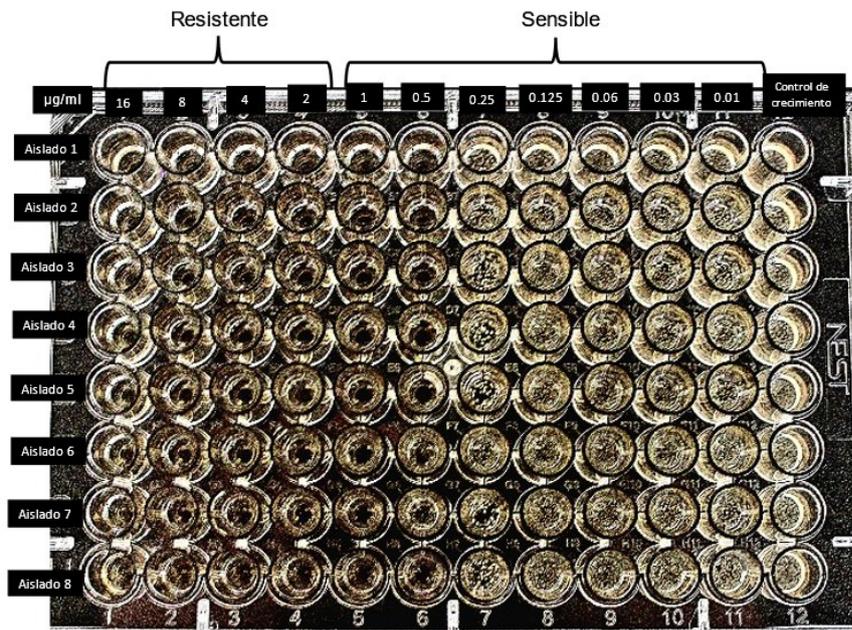


Figura 28 B. Prueba de susceptibilidad a anfotericina B. Aislados de *C. glabrata* obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios. Los aislados 1 al 5 tienen un desarrollo de 0.25 a 0.01 μg , los aislados 6 al 8 tienen un desarrollo de 0.5 a 0.01 μg . La columna 12 es el control de desarrollo.

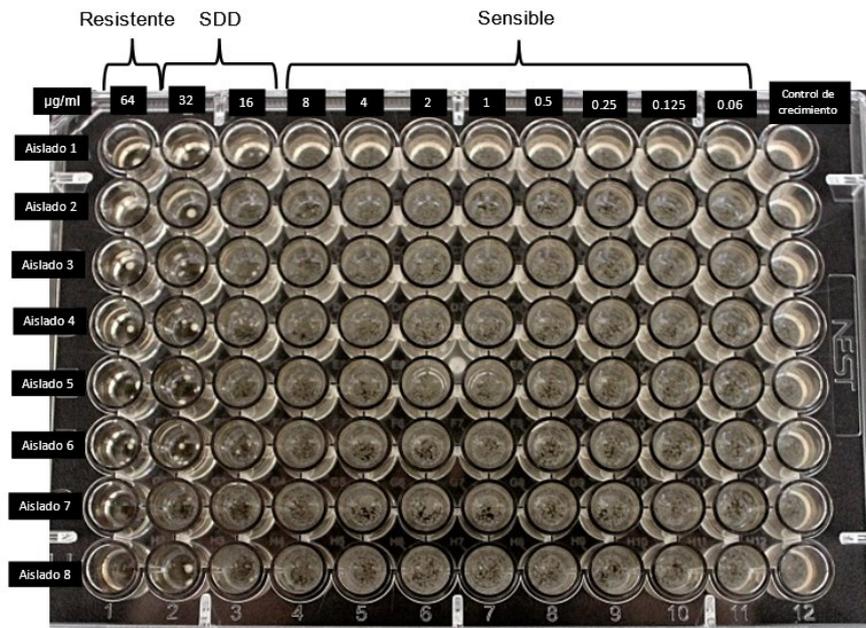


Figura 28 C. Prueba de susceptibilidad a Fluconazol. Aislados de *C. glabrata* obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios, Los aislados 1 y 3 al 7 tienen un desarrollo de 64 a 0.03 µg, los aislados 2 y 8 tienen un desarrollo de 32 a 0.03 µg. La columna 12 es el control de desarrollo

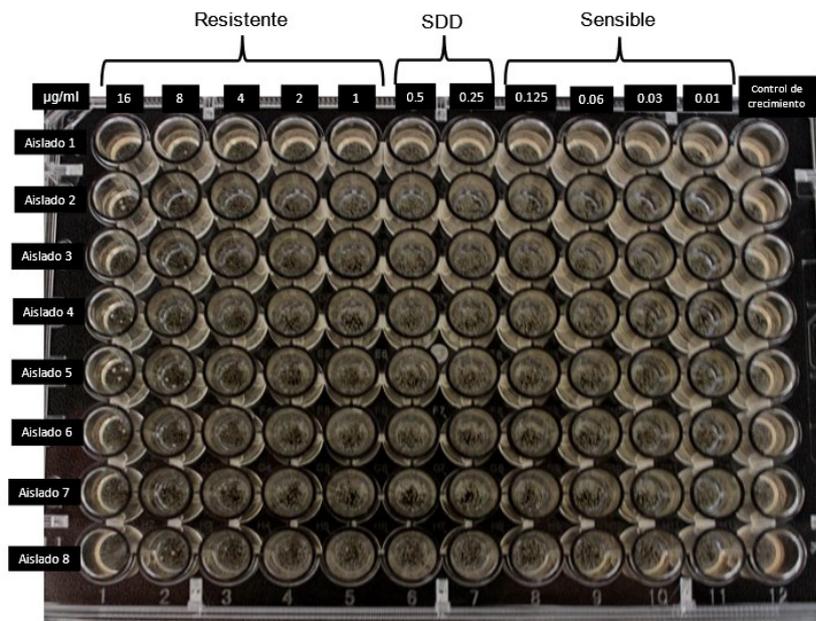


Figura 28 D. Prueba de susceptibilidad a itraconazol. Aislados de *C. glabrata* obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios. Los aislados 1 al 8 tienen un desarrollo de 16 a 0.01 µg. La columna 12 es el control de desarrollo.

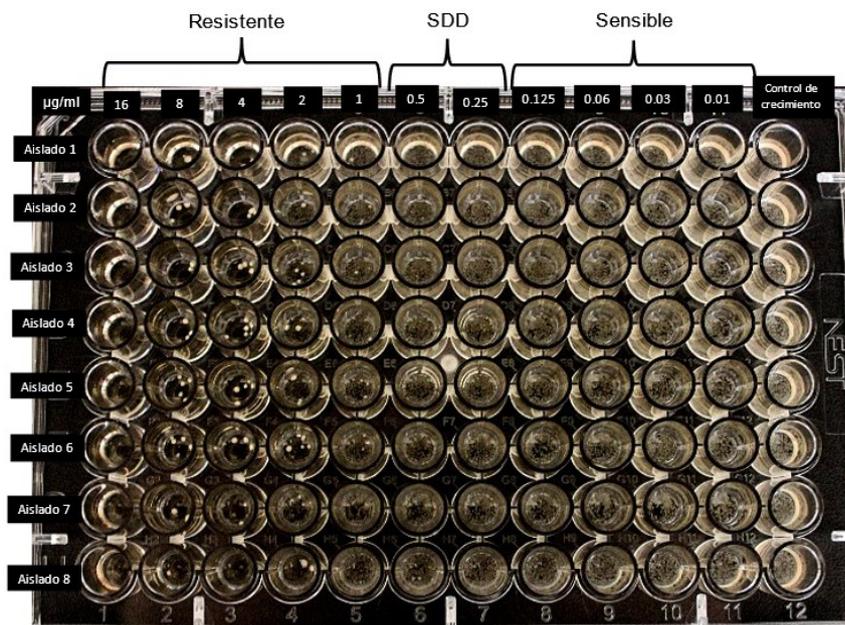


Figura 28 E. Prueba de susceptibilidad a ketoconazol. Aislados de *C. glabrata* obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios. Los aislados 1 al 8 tienen un desarrollo de 8 a 0.01 μg . La columna 12 es el control de desarrollo.

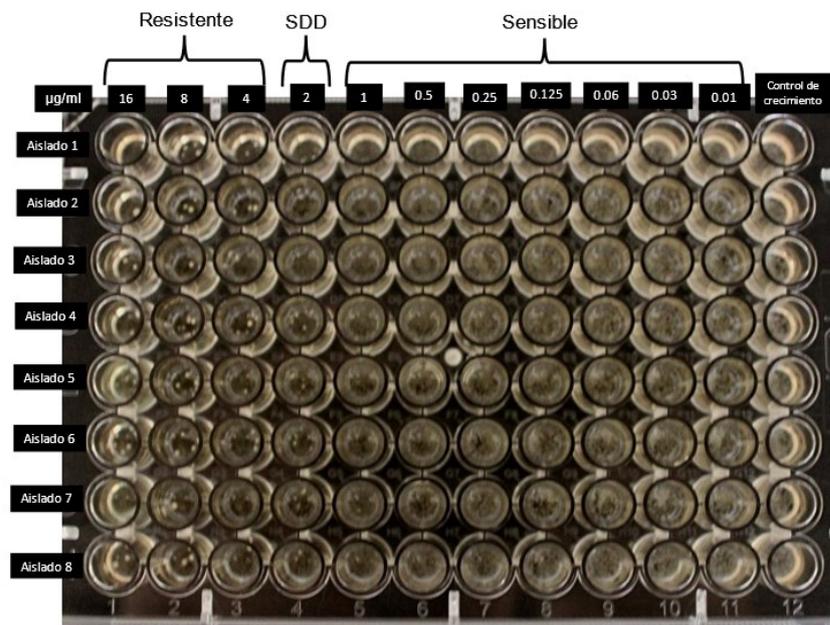


Figura 28 F. Prueba de susceptibilidad a posaconazol. Aislados de *C. glabrata* obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios. Los aislados 1 al 8 tienen un desarrollo de 16 a 0.01 μg . La columna 12 es el control de desarrollo.

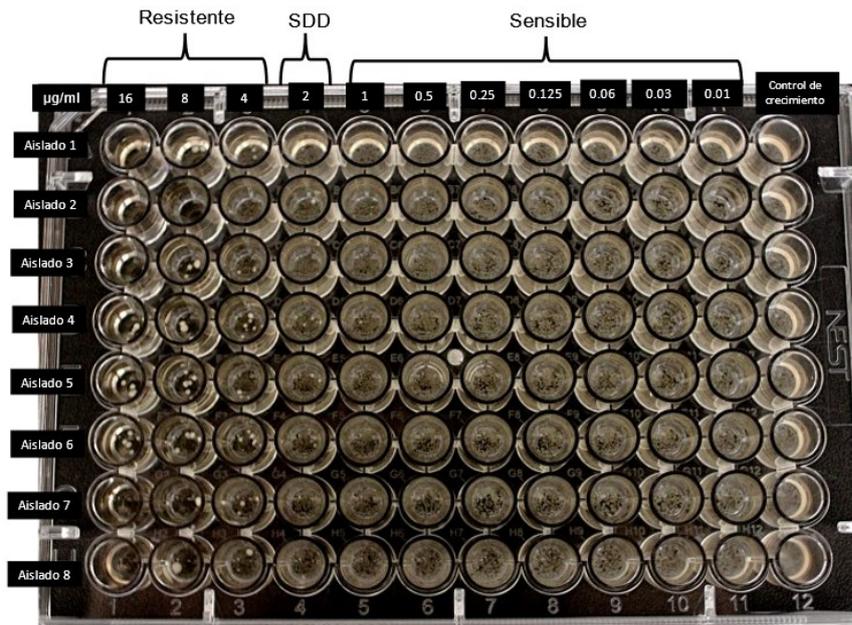


Figura 28 G. Prueba de susceptibilidad a voriconazol. Aislados de *C. glabrata* obtenidos de leche de vacas con diferentes estados sanitarios. Los aislados 1 al 8 tienen un desarrollo de 16 a 0.01 µg. La columna 12 es el control de desarrollo.

El análisis estadístico por la prueba de Bonferroni se realizó a los resultados de las pruebas a los aislados provenientes de leche de vaca y cabra, para analizar la posible relación de los resultados de las pruebas de susceptibilidad con el estado clínico. De acuerdo con la prueba de Ji cuadrada se obtuvo una $p= 0.194$, no observándose diferencia de los resultados de susceptibilidad con el estado sanitario (estado clínico). Con lo que se concluye el resultado de la susceptibilidad no depende del estado sanitario (estado clínico)

Por lo anterior, y considerando solo la identificación bioquímica y los patrones de susceptibilidad de los aislados provenientes de las leches de cabras y vacas, se encontró que:

a) De la leche de cabras

De los 67 aislados de *C. guilliermondii*, 14.93% (10/67) fueron resistentes a fluconazol y a posaconazol, 19.4% (13/67) fueron resistentes a voriconazol, 25.37% (17/67) fueron resistentes a ketoconazol, 67.16% (45/67) fueron resistentes a anfotericina B y el 100% (67/67) fueron resistentes a itraconazol (Figura 29).

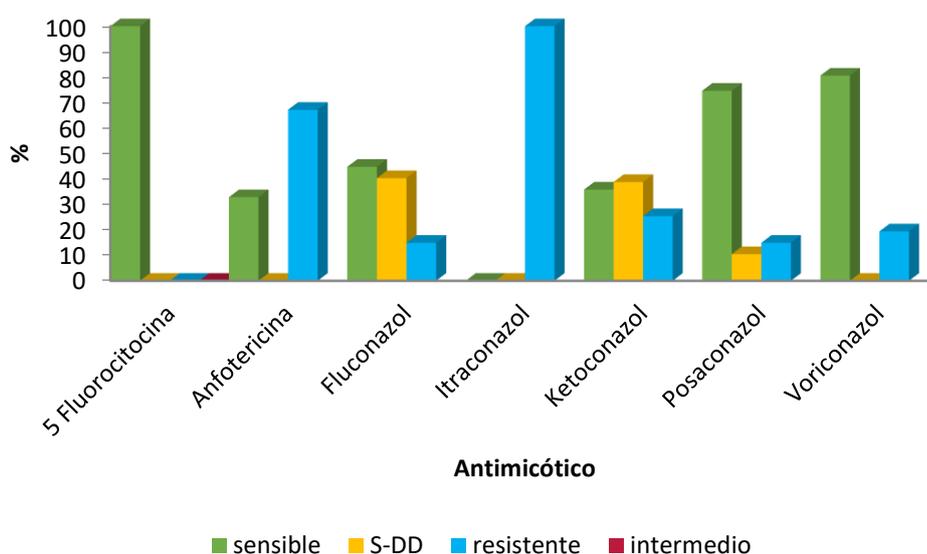


Figura 29. Patrón de susceptibilidad de aislados de *C. guilliermondii* provenientes de leche de cabras (n=67) a 5 Fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, voriconazol.

De los 56 aislados de *C. kefyr*, 5.36% (3/56) fueron resistentes a ketoconazol, 7.14% (4/56) fueron resistentes a voriconazol, 17.86% (10/56) fueron resistentes a fluconazol, 66.07% (37/56) fueron resistentes a anfotericina B y el 96.43% (54/56) fueron resistentes a itraconazol (Figura 30).

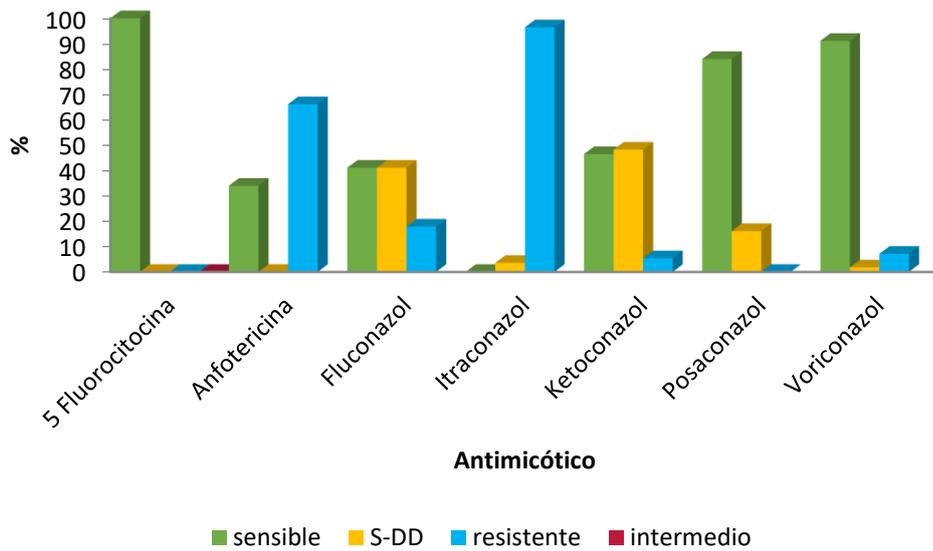


Figura 30. Patrón de susceptibilidad de aislados de *C. kefyr* provenientes de leche de cabras (n=56) a 5 Fluorocitosina, anfotericina, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, voriconazol.

De los 40 aislados de *C. famata*, 15% (6/40) fueron resistentes a fluconazol, 42.5% (17/40) fueron resistentes a anfotericina b y 47.5% (19/40) fueron resistentes a itraconazol (Figura 31).

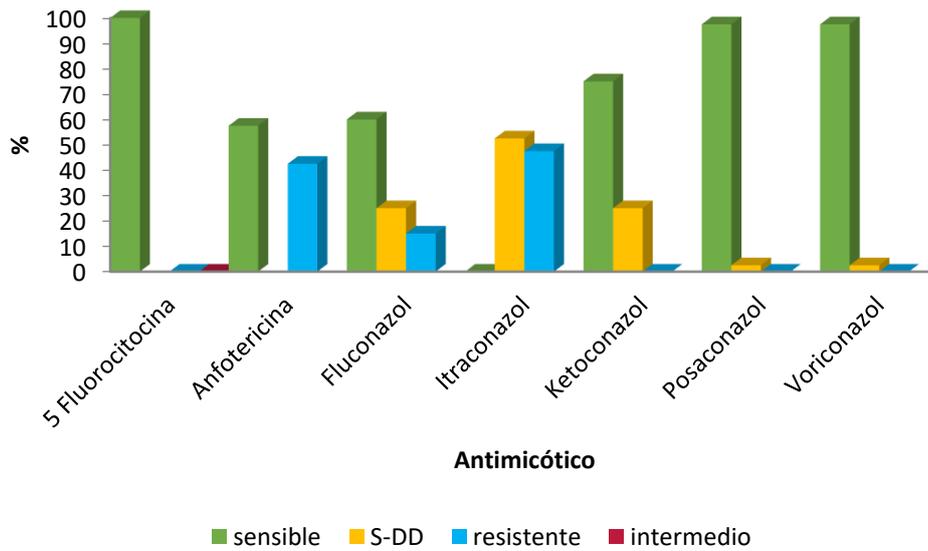


Figura 31. Patrón de susceptibilidad de aislados de *C. famata* provenientes de leche de cabras (n=40) a 5 Fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, voriconazol.

De los 8 aislados de *Candida spp.*, 12.5% (1/8) fueron resistentes a voriconazol y 100% (8/8) fueron resistentes a anfotericina B y a itraconazol (Figura 32)

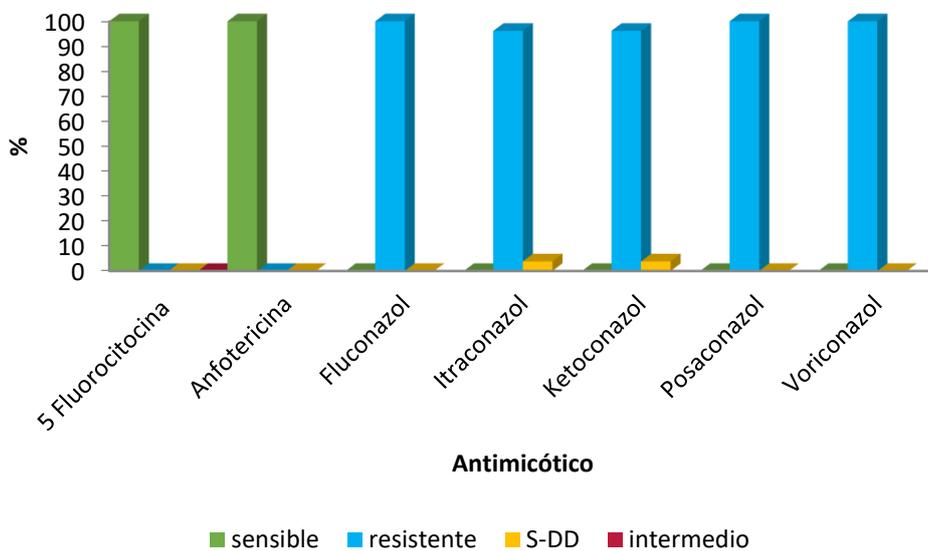


Figura 32. Patrón de susceptibilidad de aislados de *Candida spp.* provenientes de leche de cabras (n=8) a 5 Fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, voriconazol.

b) De la leche de bovinos

De los 68 aislados de *C. glabrata*, el 100% (68/68) fueron susceptibles a 5-fluorocitosina, el 100% (68/68) fueron susceptibles a anfotericina B, el 100% (68/68) fueron resistentes a posaconazol y a voriconazol, el 98.53% (67/68) a fluconazol y ketoconazol y el 97.06% (66/68) a itraconazol (Figura 33).

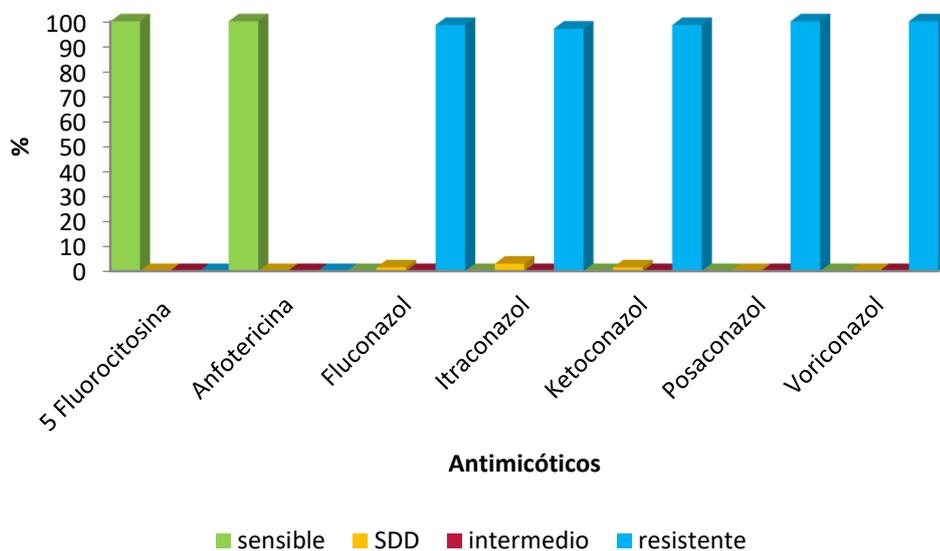


Figura 33. Patrón de susceptibilidad de aislados de *C. glabrata* provenientes de leche de vacas (n=68) a 5 Fluorocitosina, anfotericina, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, voriconazol.

De los 11 aislados de *C. zeylanoides*, el 100% (11/11) fueron resistentes a anfotericina B, fluconazol, itraconazol y ketoconazol, mientras que el 63.64% (7/11) fueron resistentes a voriconazol y el 90.91 (10/11) fueron susceptibles a 5 fluorocitosina (Figura 34).

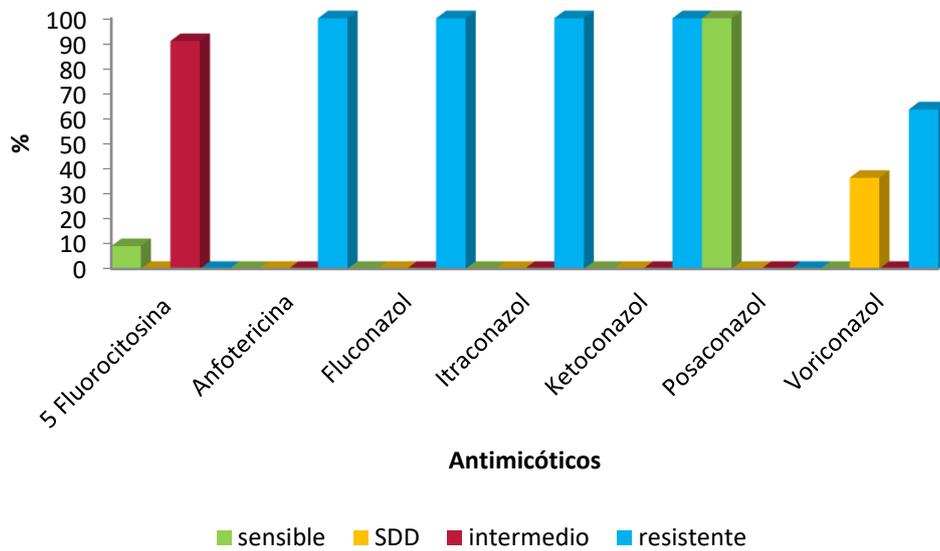


Figura 34. Patrón de susceptibilidad de aislados de *C. zeylanoides* provenientes de leche de vacas con mastitis subclínica (n=11) a 5 Fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, voriconazol.

Con relación a los 7 aislados de *C. krusei*, el 100% (7/7) fueron susceptibles a 5 fluorocitosina, el 100% (7/7) fueron resistentes a fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol y voriconazol, mientras que el 85.71% (6/7) lo fueron a anfotericina B (Figura 35).

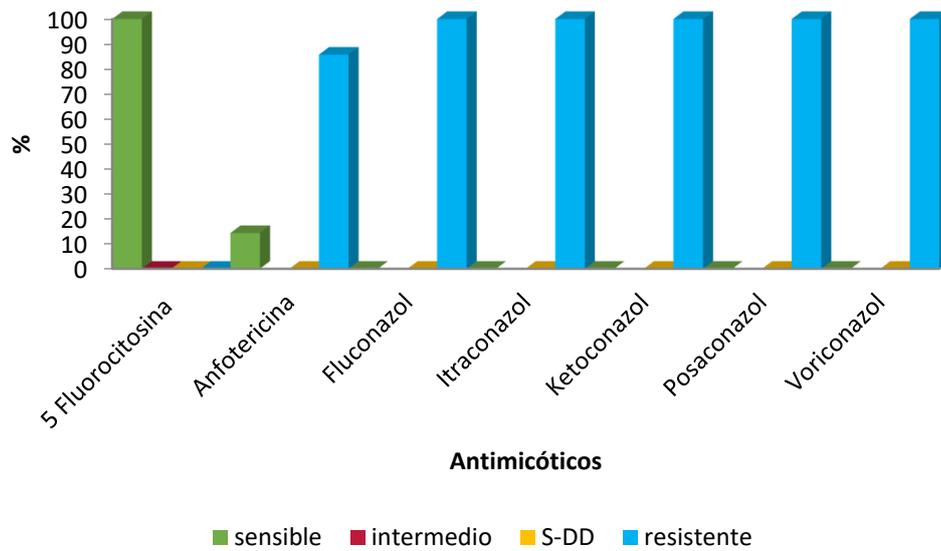


Figura 35. Patrón de susceptibilidad de aislados de *C. krusei* provenientes de leche de vacas (n=7) a 5 Fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, voriconazol.

Con relación a los 9 aislados de *Candida* spp, el 100% fueron resistentes a anfotericina B e itraconazol, el 55.56% (5/9) a ketoconazol y el 11.11% (1/9) a fluconazol y Posaconazol. El 88.88% (8/9) fueron susceptibles a 5 fluorocitosina. (Figura 36).

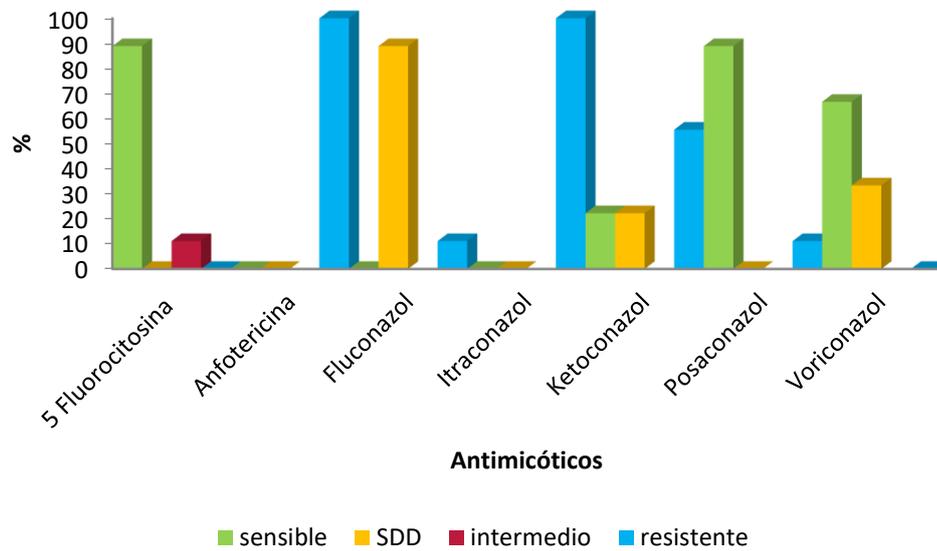


Figura 34. Patrón de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp. provenientes de leche de vaca (n=9) a 5 Fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, voriconazol.

6. Discusión

En el presente estudio se encontró que la presencia de especies del género *Candida* es diversa en la leche de cabras y vacas con diferentes estados sanitarios. En el caso de los aislados obtenidos de la leche de cabras, las especies del género *Candida* predominantes fueron *C. guilliermondii*, *C. kefyr* y *C. famata*, mientras que en los aislados provenientes de la leche de vacas fueron *C. glabrata*, *C. zeylanoides* y *C. krusei*.

Con relación a los aislados obtenidos en la leche de cabras clínicamente sanas, como se mencionó, las especies predominantes del género *Candida* fueron *C. guilliermondii*, *C. kefyr* y *C. famata*. Al respecto, y de los escasos estudios en esta especie animal, se encuentra el realizado por Hassan y col. en 2018 (67), quienes reportaron la presencia de *C. albicans* en un 25%, seguido por *C. guilliermondii* y *C. kefyr* con un 7,5% cada una y *C. famata* con un 5%, en la leche de cabras con mastitis subclínica. Las últimas tres especies, coinciden con lo encontrado en el presente estudio. Es factible que estas especies se encuentren en animales clínicamente sanos y que, en caso de algún factor predisponente en el animal, puedan fungir como patógenos oportunistas. En el caso de *C. albicans*, aun cuando es una especie patógena, en los últimos años, se ha observado el incremento de otras especies no albicans como causantes de mastitis tanto subclínica como clínica.

Los escasos estudios en cabras con mastitis y el aislamiento de levaduras del género *Candida* pueden deberse al manejo de esta especie animal, que tiene un ciclo de producción menor al de las vacas, cuando las cabras presentan problemas de mastitis, es común que se descarten del rebaño por su baja producción y para evitar ser fuente de infección para los animales sanos teniendo de esta forma menor probabilidad de ser objeto de estudio.

En el presente estudio se aisló *C. glabrata* de la leche de vacas sanas y con mastitis subclínica y clínica, situación que difiere con los reportado por Segundo y col., en 2011 (15) ya que reportan la presencia de *C. glabrata* solo en vacas sanas y con mastitis clínica. Al respecto, los autores mencionan que tal vez la ausencia de *C. glabrata* en vacas con mastitis subclínica podría deberse a la competencia por sustrato con las bacterias implicadas en la mastitis subclínica, así como a la presencia de metabolitos que producen algunas bacterias e

impiden el desarrollo de las levaduras. Sin embargo, el aislamiento de *C. glabrata* en este estudio a partir de animales clínicamente sanos, podrían sugerir que esta levadura, esté desarrollando mecanismos de resistencia que sean efectivos contra los metabolitos producidos por las bacterias, lo cual deberá ser analizado.

Por lo que se refiere a *C. krusei*, en este estudio fue la especie más aislada en los casos de mastitis clínica, confirmando los estudios en 2010 de Seker, E. y col., en Turquía (68), el de Erbas G. y col., en 2017 (69) en Brasil y de Du, J y col., en 2018 en China (70), quienes reportaron a la misma especie aislada de casos de mastitis clínica en vacas.

En el estudio realizado por Segundo y col., en México en 2011 (15) aislaron a *C. krusei* tanto de vacas con mastitis como vacas sanas, en el presente estudio todos los aislados de *C. krusei* provienen de vacas con mastitis clínica, sugiriendo su presencia como patógeno oportunista.

Por otro lado, se ha reportado a *C. krusei* en ensilado y madera en descomposición, siendo probable que los casos de mastitis clínica por esta especie se deban a la contaminación de la glándula mamaria, al estar en contacto con estos dos sustratos (71).

En general, los estudios sobre el aislamiento de especies del género *Candida* presentes en la leche de rumiantes en su mayoría se han realizado en áreas con clima tropical (71), en México existen varias regiones con este tipo de clima, lo cual favorece el hecho de encontrar este género micótico en el presente estudio. Es por ello por lo que convendría realizar estudios por regiones para saber que especies de *Candida* se encuentra en cada región.

El papel del médico veterinario en el tratamiento de mastitis micóticas es fundamental, ya que son ellos quienes deben contar con el conocimiento para la selección y el uso adecuado de medicamentos. Es de gran importancia el diagnóstico correcto acerca de los agentes etiológicos involucrados, y evitar el uso indiscriminado de antimicóticos, ya que pueden ser un factor predisponente para la presentación de mastitis micótica.

Por lo que se refiere al tratamiento de las mastitis micóticas, el Médico Veterinario es el profesional responsable de implementar el tratamiento y/o las

medidas de prevención en un sistema de producción pecuaria, por lo que es necesario que considere que los procesos de mastitis no son solo ocasionados por bacterias. Como se ha observado en este estudio, las levaduras también pueden estar presentes en este tipo de casos, y de ahí la importancia del diagnóstico preciso para la elección del tratamiento correcto.

Sin embargo, el realizar un diagnóstico y tratamientos adecuados a nivel de campo puede resultar complicado, ya que en la mayoría de los casos es difícil el acceso a los laboratorios, que, además, en el ámbito veterinario son escasos. En muchos casos el médico se ve comprometido a dar un tratamiento y el médico debe implementar un tratamiento sin tener la certeza del agente infeccioso involucrado, incurriendo frecuentemente en el uso inadecuado de antibacterianos favoreciendo los casos de mastitis micótica por levaduras, en particular de especies del género *Candida*. Dada esta situación conviene hacer más investigación, por ejemplo, en hacer pruebas rápidas fáciles de realizar en campo, la creación de antimicóticos específicos para los hongos causantes de mastitis.

Por otro lado, cuando es posible realizar el diagnóstico y se confirma que la mastitis es causada por levaduras del género *Candida*, el médico veterinario cuenta con opciones farmacológicas limitadas. En el caso particular de las mastitis micóticas, se están realizando estudios experimentales con sustancias con actividad antimicótica (31) para encontrar un tratamiento específico que además pueda ser utilizado a nivel de campo.

Para coadyuvar en la búsqueda de tratamientos efectivos en estos procesos infecciosos causados por especies del género *Candida*, es primordial conocer el comportamiento de estos microorganismos hacia los antimicóticos existentes.

En ese sentido, en el presente estudio se evaluó la susceptibilidad antimicótica de aislados de especies del género *Candida* de la leche de cabras sanas y de vacas con distintos estados clínicos. Con relación a los aislados provenientes de la leche de cabras, las especies más predominantes fueron *C. guilliermondii*, *C. kefyr* y *C. famata*, y presentaron una mayor susceptibilidad a la 5-fluorocitosina, seguida de voriconazol y posaconazol. Estos resultados, sugieren que los azoles de segunda generación (voriconazol, Posaconazol) a la fecha son más efectivos

que los azoles de primera generación (itraconazol, ketoconazol y fluconazol). Es conveniente mencionar que no fue posible encontrar un estudio semejante relacionado con la susceptibilidad antimicótica en aislados de leche de cabras y que valdría la pena realizar más investigación relacionada con el tema.

Por lo que se refiere a los aislados de *C. glabrata* en leche de vacas, el 100% de estos fueron susceptibles a 5 fluorocitosina y a anfotericina B y en la misma proporción fueron resistentes a los azoles utilizados. En el estudio realizado por Erbas, G. y col., en 2017 en Turquía (72) tuvieron resultados diferentes respecto a 5 fluorocitosina donde sus aislados de *C. glabrata* tuvieron una resistencia del 100%. Sin embargo, coincidieron en este estudio con respecto a la susceptibilidad a ketoconazol y anfotericina B. Este contraste podría atribuirse a distintos factores relacionados tal vez a la presencia de subespecies diferentes, las cuales a pesar de ser de la misma especie presenten características distintas a nivel molecular que las hagan más o menos susceptibles a los diferentes antimicóticos, también podría estar relacionadas a mutaciones dependientes de cada región.

En el caso de *C. krusei* y de acuerdo con este y otros estudios, es la especie predominante en casos de mastitis clínica en vacas. Los resultados obtenidos con relación a la susceptibilidad antimicótica de *C. krusei* y *C. glabrata*, confirman su resistencia intrínseca a los azoles de primera generación, y se observó resistencia a los azoles de segunda generación, lo que coinciden con lo reportado por Sonmes M. y col., en 2017 (72) y Du, J. y col., en 2018 (70). Es posible que la resistencia observada a los azoles de segunda generación, se deba a la similitud en la estructura de estos azoles con los de primera generación, y por ende una resistencia cruzada, tal como lo sugirió Lorenzo P y col., en 2015 (46). Por lo que es muy conveniente y necesario realizar estudios de los genes implicados en la resistencia de *C. krusei* y *C. glabrata* a posaconazol y voriconazol, siendo muy posible la necesidad de generar nuevos antimicóticos a los cuales sea sensible estos microorganismos.

Asimismo, todos los aislados de *C. krusei* de este estudio fueron sensibles a 5-fluorocitosina y anfotericina B, situación que difiere de lo reportado por Jun tu y col., en 2018, quienes encontraron que el 100% de sus aislados fueron

resistentes a 5 fluorocitosina, al igual que el estudio de Moravkova M y col., en 2021 (73) en República Checa. Esta discrepancia puede deberse a distintos factores, como, por ejemplo, la situación geográfica, el clima, la salud de los animales y el manejo zootécnico, así como la presencia de subespecies o mutaciones que les hayan concedido características distintas.

En el presente trabajo, todos los aislados de estudio presentaron susceptibilidad a la 5-fluorocitosina, probablemente porque estos microorganismos no han estado en presencia de este antimicótico, ya que no es un fármaco utilizado de manera común en el ámbito veterinario.

Entre las razones por las que se utilizan poco los antimicóticos son: el costo del medicamento, el número de animales por hato, la duración del tratamiento, la vía de administración, el tiempo de retiro, y la toxicidad de los antimicóticos.

Es necesario conocer el comportamiento de las levaduras encontradas tanto en la leche de animales clínicamente sanos, como con mastitis subclínica y clínica frente a los antimicóticos, y eventualmente desarrollar pruebas que le proporcionen al productor y al médico veterinario opciones de tratamiento confiables y económicas, disminuyendo las pérdidas económicas por la baja producción de leche y calidad de esta, salvaguardando la salud y el bienestar animal.

La relevancia de este estudio es la contribución en la investigación de la susceptibilidad antifúngica en aislados de origen animal, ya que la información generada en México y a nivel mundial es nula o escasa, siendo un área poco explorada en la medicina veterinaria.

7. Conclusiones.

- Con la metodología tradicional se logró identificar el 90% de los aislados pertenecientes a diversas especies del género *Candida*.
- Las especies aisladas con mayor frecuencia a partir de la leche de cabras clínicamente sanas fueron *C. guilliermondii*, *C. kefyr* y *C. famata*.
- *C. krusei* es la principal especie aislada de la leche de vacas con mastitis clínica mientras que *C. glabrata* y *C. zeylanoides* son aisladas con mayor frecuencia de la leche de vacas sanas o con mastitis subclínica.
- *C. krusei* y *C. glabrata* están presentando resistencia natural a los azoles de segunda generación.
- No existe correlación dados los resultados estadísticos del método de Bonferroni aplicado a los resultados, entre el estado sanitario de la glándula mamaria de los animales con el patrón de susceptibilidad a antimicóticos.

8. Anexos

8.1 Medios de cultivo.

8.1.1 Caldo YEPD al 2% de glucosa (extracto de levadura, peptona de caseína y dextrosa)

Es un medio líquido que se utiliza para mantener y propagar levaduras en procedimientos de microbiología, contiene peptona como fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, extracto de levadura la cual proporciona vitaminas del complejo B que estimulan el crecimiento de las levaduras y la dextrosa como fuente de carbohidratos.

Composición	
Reactivo	Cantidad
Peptona de caseína	20 g
Extracto de levadura	10 g
Dextrosa	20 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

Por cada litro de agua destilada se agregan 20g de peptona de caseína, 20g de dextrosa y 10g de extracto de levadura. Se mezclan los reactivos con el agua destilada y se esteriliza en autoclave a 121°C, 15lb de presión durante 20 minutos.

8.1.2 Agar Dextrosa Sabouraud adicionado con cloranfenicol (SDAc)

Es un medio con peptona suplementado con dextrosa para favorecer el crecimiento de hongos patógenos y no patógenos. Las peptonas son fuentes de factores de crecimiento nitrogenados, la dextrosa proporciona una fuente de energía para el crecimiento de microorganismos, el cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro.

El SDA tiene un bajo pH (de 5,6 aproximadamente) que favorece el crecimiento de hongos, en especial los dermatofitos, con efecto ligeramente inhibitorio para las bacterias contaminantes en muestras clínicas.

Componentes	
Reactivo	Cantidad
Dextrosa	40g
Agar bacteriológico	15g
Digerido péptico de tejido animal (peptonas)	10g
Cloranfenicol	0.05g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

En 1000 ml de agua destilada suspender 65g de SDA. Poner a calentar agitando constantemente hasta hervir. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15lb de presión durante 20 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente hasta llegar a los 45 a 50°C agregar 0.05g de cloranfenicol y agitar. Servir en cajas Petri estériles.

8.1.3 Agar arroz

El extracto de arroz proporciona la única fuente de nutrientes que junto con las condiciones de cultivo deficientes de oxígeno (al colocar el cubreobjetos sobre el inóculo) crea un entorno deficiente que induce la generación de formas morfológicas específicas (pseudohifas).

Componentes	
Reactivo	Cantidad
Granos de arroz	20 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

En 1000 ml de agua destilada poner 20g de arroz, hervir durante 30 minutos. Con un embudo y una gasa filtrar el medio. Al hervir durante 30 minutos se

evapora una parte del agua por lo que se debe aforar para obtener el volumen inicial. Se añaden 15g de agar bacteriológico y poner a calentar agitando constantemente hasta hervir. Se esteriliza el medio en autoclave a 121°C a 15lb de presión durante 20 minutos. Se deja enfriar a temperatura ambiente hasta llegar a los 45 a 50°C se sirve en cajas de Petri.

8.1.4 Cicloheximida al 0.1% en caldo YNB (Yeast Nitrogen Base)

La base de nitrógeno para levaduras es un medio de crecimiento que se utiliza para el cultivo de levaduras. Este caldo rico en nutrientes contiene nitrógeno, vitaminas, oligoelementos y sales. La cicloheximida es una sustancia que se utiliza en medios diversos para el aislamiento de hongos patógenos para inhibir determinados hongos no patógenos, como los mohos y levaduras saprofitas.

Preparación

De un cultivo de 24h de desarrollo, se prepara un inóculo en 5ml de SSF al 0.85% ajustando con el tubo 0.5 de McFarland. Se toman 0.5ml y se inoculan en 2ml de una solución con 0.1% de cicloheximida. Se incuba a 30°C y se realiza la lectura a partir de las 24h y hasta 7 días.

8.1.5 CHROMagar Candida.

Es un medio cromógeno para el aislamiento y diferenciación de las principales especies de *Candida* clínicamente significativas como *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. La peptona suministra los nutrientes necesarios para su crecimiento. La mezcla cromogénica consiste en sustratos artificiales (cromógenos) los cuales por la degradación específica de enzimas liberan diferentes compuestos con color, que permite la diferenciación de las especies de *Candida*. El cloranfenicol inhibe la mayoría de las bacterias contaminantes.

Componentes	
Reactivo	Cantidad
Agar	15g

Peptona	3g
Dextrosa	10.2g
Mezcla cromogénica	22g
Cloranfenicol	0.5g
Agua destilada	1000ml

Preparación

En un litro de agua destilada se disuelven 40g del medio, se calienta de 90 a 100 °C agitando constantemente hasta el primer hervor. Se deja enfriar a 45 a 50 °C y se sirve en cajas de Petri estériles. No se esteriliza en autoclave.

8.1.6 Agar BIGGY

Por sus siglas en inglés (Bismuth Glucose Glycine Yeast) es un medio de diferenciación y aislamiento para levaduras del género *Candida*, también es conocido como Agar Nickerson quien desarrolló la fórmula mediante estudios sobre la reducción de sulfito característico de este género.

El extracto de levadura del medio proporciona los nutrientes esenciales para el crecimiento (nitrógeno, vitaminas y aminoácidos), la glicina estimula el crecimiento que además por su alta concentración inhibe el crecimiento de algunos grupos bacterianos, la dextrosa es la fuente de carbono y energía, el citrato de amonio, el bismuto y el sulfito de sodio, inhiben el crecimiento bacteriano. Las especies de *Candida*, mediante un proceso de reducción del sustrato, reducen la sal de bismuto en bismuto y el sulfito a sulfuro, estos al combinarse crean un precipitado de colores café a negro que pigmenta a las colonias y que en ocasiones difunde al medio.

Componentes	
Reactivo	Cantidad
Citrato de amonio y bismuto	5g

Sulfito de sodio	3g
Dextrosa	10g
Glicina	10g
Extracto de levadura	1g
Agar bacteriológico	16g
Agua destilada	1000ml

Preparación

Por cada litro de agua destilada se suspenden 45g, se calienta agitando constantemente y hervir durante 1 minuto. Servir en cajas de Petri estériles al llegar a una temperatura de 45 a 50°C. No se esteriliza en autoclave.

8.2 Tinciones

8.2.1 Tinción de Gram

Es la tinción de elección para diferenciar bacterias Gram positivas de bacterias Gram negativas, las primeras retienen la tinción azul violeta y las segundas se decoloran y se pintan con safranina. La retención del color es debida a la estructura de la pared de las bacterias Gram positivas, las cuales están compuestas por peptidoglucanos y polímeros impermeables que hacen que resista la decoloración, en cambio las bacterias Gram negativas están compuestas por una pared más delgada de peptidoglucanos y lipoproteínas que se puede deshacer con la coloración. Con la tinción de Gram también pueden detectarse hongos levaduriformes, como es el caso del género *Candida*, que reacción tintorial como Gram positivo por los componentes de su pared celular, que en su mayoría son glucanas y mananas.

Solución de cristal violeta	
Reactivo	Cantidad
Solución A	
Cristal violeta	2g
Alcohol etílico	30ml
Solución B	
Oxalato de amonio	0.8g
Agua destilada	20ml

Preparación

Se diluye la solución A al 10% en agua destilada y se mezcla en igual volumen de la solución B.

Solución de Lugol	
Reactivo	Cantidad
Yodo	1g
Yoduro de potasio	2g
Agua destilada	200ml

Solución de contraste: safranina	
Reactivo	Cantidad
Safranina	0.20g
Agua destilada	200ml

8.3 Soluciones y reactivos diversos.

8.3.1 Solución salina fisiológica (SSF)

Componentes	
Reactivos	Cantidad
Cloruro de sodio	8.5g
Agua destilada	1000ml

Preparación

Agregar el cloruro de sodio en agua destilada y mezclar hasta disolver, alicuotar si es necesario y esterilizar en autoclave a 121°C, durante 20 min a 15lb de presión.

8.3.2 Glicerol al 50%

Solución que ayuda a mantener las cepas para crioconservación debido a que el glicerol tiene propiedades crioprotectores reduciendo al mínimo el contenido de agua intracelular, evita la vitrificación y protege las macromoléculas en el ambiente interno de la célula.

Composición	
Reactivo	Cantidad
Glicerol	50ml
Agua destilada	50ml

Preparación

Se mezclan ambos componentes en un recipiente y se agita hasta obtener una mezcla lo más homogénea posible. Se esteriliza en autoclave a 121°C a 15lb de presión durante 20 minutos.

solución de carbohidratos.

De los carbohidratos a utilizar (glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, lactosa, rafinosa, celobiosa, trealosa, D-xilosa, L- arabinosa, melobiosa e inositol) se prepararon soluciones al 10%, los cuales fueron esterilizados por filtración.

Asimilación de carbohidratos, se prepararon tubos de ensaye de 13 x 100 mm, con 900 µl de caldo rojo de fenol, y se le adicionaron 100 µl de cada uno de los carbohidratos de prueba.

Fermentación de carbohidratos, fueron preparados tubos de ensaye de 13 x 100 mm con 4.5 ml de caldo rojo de fenol y un tubo invertido (tubo de Durham), y se les adicionaron 0.5 ml de cada uno de los carbohidratos de prueba. (18

8.4. Técnicas.

Tinción de Gram.

En un portaobjetos nuevo y desengrasado, se realizó un frotis fijo el cual se tiñó con la tinción de Gram. El frotis se cubrió con el colorante primario (cristal violeta) y se dejó actuar durante 30 segundos, luego se lavó con agua destilada, se retiró el exceso de agua y se cubrió con la solución emoliente (yodo lugol) y dejándose actuar durante 30 segundos, se lavó con agua destilada y se retiró el exceso, se aplicó la solución decolorante (alcohol-acetona) de 3 a 6 segundos y se lavó con agua destilada, se retiró el exceso y se adicionó el colorante secundario (safranina) y se dejó actuar durante 30 segundos, se lavó y se dejó secar a temperatura ambiente.

Conservación de levaduras.

- Refrigeración

Es un método de conservación a corto plazo. Se sembró por estría cada aislado en tubos de ensaye con SDA inclinado, se incubaron a 37°C durante 24 a 48h, se sellaron y almacenaron en refrigeración a 4°C siendo este un método que permite su viabilidad varios meses.

- Congelación.

Es un método de conservación a largo plazo, cada cultivo fue resembrado por estría continua en tubos de ensaye que contenían SDA inclinado, se incubaron a 37°C durante 24 a 48h. Transcurrido este tiempo se agregó al tubo 1ml de glicerol estéril al 50%, el cual se mezcló con las levaduras, esta suspensión se refrigeró a 4°C durante 24h, y posteriormente se almacenaron en congelación a -20°C, siendo este un método que permite la viabilidad de las levaduras por al menos 5 años (62).

9. Referencias.

1. Cámara Nacional de Industriales de la Leche CANILEC. El libro blanco de la leche y los productos lácteos. México (Ciudad de México): Litho Offser imprenta. 2011.
2. Vargas-Bello-Pérez E, Márquez-Hernández RI, Hernández-Castellano LE. Bioactive peptides from milk: animal determinants and their implications in human health. *J Dairy Res.* 2019 May;86(2):136-144. doi: 10.1017/S0022029919000384. Epub 2019 Jun 3. PMID: 31156082.
3. Casia dos Santos R, Marin JM. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia.* 2005 Feb;159(2):251-3. doi: 10.1007/s11046-004-2229-2. PMID: 15770451.
4. Zaror L, Valenzuela K, Kruze, J. Mastitis bovina por *Prototheca zopfii*: primer aislamiento en Chile. *Arch Med Vet [Internet].* 2011. [citado el 19 de enero de 2023]; 43 (2): 173-176. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2011000200010&script=sci_arttext&tlng=pt
5. Ruegg PL. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci.* 2017 Dec;100(12):10381-10397. doi: 10.3168/jds.2017-13023. PMID: 29153171.
6. Dworecka-Kaszak B, Krutkiewicz A, Szopa D, Kleczkowski M, Biegańska M. High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *ScientificWorldJournal.* 2012; 2012:196347. doi: 10.1100/2012/196347. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22619625; PMCID: PMC3349122.
7. Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. Probiotics History. *J Clin Gastroenterol.* 2016; 50: S116-S119. doi: 10.1097/MCG.0000000000000697. PMID: 27741152
8. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca SIAP. Avance por producto, leche de caprino y leche de bovino. [internet] México; 2021 [citado el 28 de noviembre de 2022], Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecAvanceProd.jsp

9. Castañeda-Vázquez H, Wolter W, Castañeda-Vázquez MA. La mastitis bovina. Inmunología y enfermedades infecciosas en vacuno: manual gráfico. [Internet]. 1ra ed. Servet: 2019. [citado el 29 de noviembre de 2022]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Patricia-Cervantes/publication/350442770_Calidad_de_la_Leche_importancia_de_las_celulas_somaticas/links/605fa71792851cd8ce6fba59/Calidad-de-la-Leche-importancia-de-las-celulas-somaticas.pdf
10. Ashraf A, Imran M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. Anim Health Res Rev. 2020 Jun;21(1):36-49. doi: 10.1017/S1466252319000094. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32051050.
11. Bedolla CC, Ponce de León MER. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. REDVET. [Internet]. 2008. [citado el 2 de diciembre de 2022]; 9 (4): 1-26. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408.html>.
12. Yanuartono Y, Nururrozi A, Indarjulianto S, Raharjo S, Purnamaningsih H. Mycotic Mastitis in Ruminants. J Ilmu-Ilmu Peternakan [Internet] 2019. [citado el 19 de enero de 2023]; 29 (2): 109-130. Disponible en: <https://jiip.ub.ac.id/index.php/jiip/article/view/481>
13. Segundo-Zaragoza C, Cervantes-Olivares RA, Ducoing-Watty AE, De la Peña-Moctezuma A, Villa Tanaca LV. Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. Rev Iberoam Micol. 2011 Apr-Jun;28(2):79-82. doi: 10.1016/j.riam.2011.01.002. Epub 2011 Feb 22. PMID: 21349344.
14. İlhan Z, Ekin İH, Koltas S, Gulaydın O, Öztürk C, Borum A E. Occurrence of fungal agents in mastitis in dairy goats. J Anim Plant Sci [Internet] 2016 [citado el 19 de enero de 2023]; 29 (3): 4691-4700 Disponible en: https://m.elewa.org/Journals/wp-content/uploads/2016/07/5.Ziya_-3.pdf
15. Segundo-Zaragoza C, López-Ortiz I, Contreras-Caro Del Castillo DA, Domínguez-Hernández YM, Rodríguez-García JA. Characterization, enzymatic activity and biofilm formation of *Candida* species isolated from goat

- milk. Rev Iberoam Micol. 2021 Oct-Dec;38(4):175-179. doi: 10.1016/j.riam.2021.06.001. Epub 2021 Sep 10. PMID: 34511397.
16. Ryan KJ, Sherris. Microbiología médica. 7ª ed. México: McGraw Hill. 2021.
 17. Bonifaz-Trujillo A. Micología Médica Básica. 6ª ed. México: McGraw-Hill. 2020.
 18. Walsh T, Hayden R, Larone, D. Larone's medically important fungi: A guide to identification. 6th ed. Canada: ASM PRESS. 2018.
 19. Berman J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 2006 Dec;9(6):595-601. doi: 10.1016/j.mib.2006.10.007. Epub 2006 Oct 20. PMID: 17055773; PMCID: PMC3552184.
 20. Castro-Méndez C, Martín-Mazuelos E. Diagnóstico de la infección fúngica por levaduras del género *Candida*: *Candida dubliniensis*. CCS. [Internet] 2005. [citado el 20 de enero de 2023]; 1: 1-10 disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Estrella-Martin-Mazuelos/publication/264876238_DIAGNOSTICO_DE_LA_INFECCION_FUNGICA_POR_LEVADURAS_DEL_GENERO_Candida_Candida_dubliniensis/links/542e952f0cf27e39fa9627b8/DIAGNOSTICO-DE-LA-INFECCION-FUNGICA-POR-LEVADURAS-DEL-GENERO-Candida-Candida-dubliniensis.pdf
 21. Linares-Sicilia MJ, Solís-Cuesta F. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Rev Iberoam Micol [Internet] Bilbao: 2007. [citado el 16 de enero de 2023] disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/>
 22. Alfonso C, López M, Arechavala A, Perrone M del C, Guelfand L, Bianchi M; Red de Micología del Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance Candida Agar [Presumptive identification of *Candida* spp. and other clinically important yeasts: usefulness of Brilliance Candida Agar]. Rev Iberoam Micol. 2010 Jun 30;27(2):90-3. Spanish. doi: 10.1016/j.riam.2010.01.008. Epub 2010 Mar 24. PMID: 20346288.
 23. Hartmann H, Kilchsperger G. Treatment of *Candida* mastitis with natamycin. Proc World Congress on Diseases of Cattle. 1982. 2 (12): 1050-1053.
 24. VanDamme M. Use of miconazole in treatment for bovine mastitis. Veterinary Medicine Small Animal Clinician. 1983. 78 (9): 1425-1427.

25. Kltamura H, Anri A, Fuse M, Seo M, Itakura C. Chronic mastitis caused by *Candida maltosa* in a cow. *Vet Pathol* [Internet] 1990. [citado el 7 de enero de 2023] 27 (6): 465-466. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/030098589902700616>
26. Hariharan H. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 4th ed. *Can Vet J*. 2007 Jul;48(7):744. PMID: PMC1899851.
27. Roberson JR. Treatment of clinical mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2012 Jul;28(2):271-88. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.03.011. Epub 2012 Apr 28. PMID: 22664208.
28. Kawai K, Shimazaki K, Higuchi H, Nagahata H. Antibacterial activity of bovine lactoferrin hydrolysate against mastitis pathogens and its effect on superoxide production of bovine neutrophils. *Zoonoses Public Health*. 2007;54(3-4):160-4. doi: 10.1111/j.1863-2378.2007.01031.x. PMID: 17456148.
29. Orrego-Escobar E. Antimicóticos de origen vegetal y plantas medicinales: el potencial escondido de Chile. *Medwave* [Internet] 2012. [citado el 7 de enero de 2023] 12 (8): 1-2. Disponible en: <https://www.medwave.cl/perspectivas/editorial/5480.html>
30. Mohamed SH, Mahmoud E, Mona MH, Soliman, Rasha R. Abdel L, Maha MM, et. al. Green silver nanoparticles based on *Lavandula coronopifolia* aerial parts extract against mycotic mastitis in cattle. *ISBAB*. 2022. 42(102350) <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102350>
31. Huanca-Choque NI, Surco-Luna VJ. Antimicóticos. *Rev Act Clin Med* [Internet] 2012. [citado el 31 de enero de 2023]; 25 (1292). Disponible en: http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?pid=S2304-37682012001000010&script=sci_arttext&tlng=es
32. Nivoix Y, Ledoux MP, Herbrecht R. Antifungal Therapy: New and Evolving Therapies. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020 Feb;41(1):158-174. doi: 10.1055/s-0039-3400291. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32000291.
33. Tapia, C. Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos. *Medwave*, [Internet] 2005 [citado el 3 de febrero de 2023]; 5 (4). Disponible en: <https://www.medwave.cl/puestadia/cursos/3548.html>
34. Mora-Montes HM, Lopes-Bezerra LM. Current progress in medical mycology. Springer International Publishing. [Internet] 2017 [citado el 2 de enero de

- 2023]; Disponible en: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-319-64113-3.pdf>.
35. Rivera-Toledo E, Jiménez-Delgadillo AU, Manzano-Gayosso P. Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. Rev Fac Med UNAM. [Internet] 2020 [citado el 4 de febrero de 2023];63(2):7-17. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2020/un202b.pdf>
36. Suberviola B. Seguridad clínica de la anfotericina B liposomal. Revista Iberoamericana de Micología, 2021. 38 (2): 56-60. DOI: 10.1016/j.riam.2021.02.001
37. Cortés, J., Russi, J. Equinocandinas. Rev Chil Infectol [Internet] 2011. [citado el 31 de enero de 2023] 28 (6): 529-536. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182011000700004
38. Patil A, Majumdar S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. J Pharm Pharmacol. 2017 Dec;69(12):1635-1660. doi: 10.1111/jphp.12780. Epub 2017 Jul 26. PMID: 28744860.
39. Carolus H, Pierson S, Lagrou K, Van Dijck P. Amphotericin B and Other Polyenes-Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. J Fungi (Basel). 2020 Nov 27;6(4):321. doi: 10.3390/jof6040321. PMID: 33261213; PMCID: PMC7724567.
40. Andes DA., Dismukes WE. Azoles. Essentials of Clinical Mycology. New York, USA: Springer, 2011.
41. Nocua-Báez LC, Uribe-Jerez P, Tarazona-Guaranga L, Robles R, Cortés JA.. Azoles of then and now: a review. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2020 Jun [citado el 25 de diciembre de 2023]; 37(3): 219-230. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182020000300219&lng=es.
42. Caballero-Martínez F, López-Rocha A, Jurado-Moreno J. Guía de Buena Práctica Clínica en Infecciones fúngicas. [Internet] Madrid, España: Editorial International Marketing & Communication 2005 [citado el 30 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.comsegovia.com/pdf/guias/GBPC%20INFECC%20FUNGICAS.pdf>.

43. Campestre C, Locatelli M, Guglielmi P, De Luca E, Bellagamba G, Menta S, et. al. Analysis of imidazoles and triazoles in biological samples after Micro Extraction by packed sorbent. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017 Dec;32(1):1-11. doi: 10.1080/14756366.2017.1354858. PMID: 28776447; PMCID: PMC6010084.
44. Wilson DT, Dimondi VP, Johnson SW, Jones TM, Drew RH. Role of isavuconazole in the treatment of invasive fungal infections. *Ther Clin Risk Manag*. 2016 Aug 3;12:1197-206. doi: 10.2147/TCRM.S90335. PMID: 27536124; PMCID: PMC4977098.
45. Lorenzo-Fernández P, Moreno-González A, Leza-Cerro JC, Lizasoain-Hernández I, Moro-Sánchez MA, Portales-Pérez A, Velázquez Farmacología Básica y Clínica. 19ª ed. España: Editorial Médica Panamericana, 2015.
46. Cárdenas-Parra LY, Perez-Cárdenas JE. Mecanismos de resistencia a fluconazol expresados por *Candida glabrata*: una situación para considerar en la terapéutica. *Inv Enf*, 2020 22. doi: 10.11144/Javeriana.ie22.mrfe.
47. Khalifa HO, Hubka V, Watanabe A, Nagi M, Miyazaki Y, Yaguchi T, Kamei K. Prevalence of Antifungal Resistance, Genetic Basis of Acquired Azole and Echinocandin Resistance, and Genotyping of *Candida krusei* Recovered from an International Collection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022 Feb 15;66(2):e0185621. doi: 10.1128/AAC.01856-21. Epub 2021 Dec 6. PMID: 34871096; PMCID: PMC8846461.
48. Newland JG, Abdel-Rahman SM. Update on terbinafine with a focus on dermatophytoses. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2009 Apr 21;2:49-63. doi: 10.2147/ccid.s3690. PMID: 21436968; PMCID: PMC3047923.
49. Beck JF, Samblanet DC., Schmidt JA. Palladium catalyzed intermolecular hydroamination of 1-substituted allenes: an atom-economical method for the synthesis of N-allylamines. *RSC adv*, [Internet] 2013. [citado el de 1 de febrero de 2023] 3 (43): 20708-20718. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2013/ra/c3ra43870h>
50. Chang YC, Lamichhane AK, Cai H, Walter PJ, Bennett JE, Kwon-Chung KJ. Moderate levels of 5-fluorocytosine cause the emergence of high frequency resistance in cryptococci. *Nat Commun*. 2021 Jun 8;12(1):3418. doi: 10.1038/s41467-021-23745-1. PMID: 34103502; PMCID: PMC8187385.

51. Aris P, Mohamadzadeh M, Wei Y, Xia X. In Silico Molecular Dynamics of Griseofulvin and Its Derivatives Revealed Potential Therapeutic Applications for COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 21;23(13):6889. doi: 10.3390/ijms23136889. PMID: 35805893; PMCID: PMC9267096.
52. Feuilhade de Chauvin, M. Tratamientos antifúngicos en dermatología práctica. *EMC-Derma.* [Internet] 2017. [citado el 13 de febrero de 2023]; 51(4) 1-11. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S176128961787062X>
53. Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches. *Clin Microbiol Rev.* 2020 Apr 29;33(3):e00069-19. doi: 10.1128/CMR.00069-19. PMID: 32349998; PMCID: PMC7194854.
54. Castañeda-Becerril I. Caracterización micológica de levaduras en muestras de leche de bovinos clínicamente sanos y con mastitis. [Tesis de licenciatura]. México. Universidad Autónoma de México; 2021. Recuperado a partir de: <http://132.248.9.195/ptd2021/enero/0806585/Index.html>
55. Guevara-Robles M, Urcia-Ausejo F, Casquero-Cavero J. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Ministerio de salud instituto nacional de salud. Medicina & Laboratorio, serie de normas técnicas, Lima. 2007.
56. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout. *The yeast: A taxonomic study.* 5th ed. USA: Elsevier, 2011.
57. Arenas-Guzmán R, Torres-Guerrero E. *Micología Médica Ilustrada, 6ª ed.* [en línea] México: McGraw Hill 2020 [citado el 4 de enero de 2023] disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2791§ionid=234753107>.
58. Mulet-Bayona JV, Salvador-García C, Tormo-Palop N, Gimeno-Cardona C. Evaluation of a novel chromogenic medium for *Candida* spp. identification and comparison with CHROMagar™ *Candida* for the detection of *Candida auris* in surveillance samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020 Dec;98(4):115168. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115168. Epub 2020 Aug 16. PMID: 32927410.

59. Ruiz-Aragón J, García-Martos P, Puerto JL, Marín P, Saldarreaga A, Moya P. Evaluación de un nuevo medio CHROMagar Candida para la identificación presuntiva de levaduras. Rev Diagn Biol [Internet]. 2003 [citado el 25 de enero de 2023] 52 (1): 19-22. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732003000100002
60. Yücesoy M, Marol S. Performance of CHROMagar Candida and BIGGY agar for identification of yeast species. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2003 Oct 29;2:8. doi: 10.1186/1476-0711-2-8. PMID: 14613587; PMCID: PMC280667.
61. Daef E, Moharram A, Eldin SS, Elsherbiny N, Mohammed M. Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. Braz J Microbiol. 2014 May 2;45(1):255-62. doi: 10.1590/S1517-83822014005000040. PMID: 24948942; PMCID: PMC4059308.
62. Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, Campanha NH. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. Oral Dis. 2014 May;20(4):329-44. doi: 10.1111/odi.12123. Epub 2013 May 16. PMID: 23679136.
63. St-Germain G, Summerbell RC. Identify fungus. A clinical laboratory handbook 2nd ed. USA: Company Inc. Belmont, 2011.
64. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, Castañón-Olivares LR. Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. 3ª ed. México:Trillas, 2012.
65. Cantón-Lacasa E, Martín-Mazuelos E, Espinel-Ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Rev Iberoam Micol, [Internet] 2007 [citado el 20 de noviembre de 2022] Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>.
66. Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. Document M27-A3. Reference Method Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard. 3th ed. USA: CLSI, 2008.
67. Mohammed-Hassan KA, Nabhan-Yassein S. Prevalence and type of fungi in milk from goats with sub clinical mastitis. OJVR. 2018 22 (8): 669-674. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/329033449_Prevalence_and_type_of_fungi_in_milk_from_goats_with_sub_clinical_mastitis

68. Seker E. Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in Western Turkey. *Mycopathologia*. 2010 Apr;169(4):303-8. doi: 10.1007/s11046-009-9255-z. Epub 2009 Nov 17. PMID: 19921462.
69. Erbaş G, Parin U, Kirkan S, Ozavei V, Tugba H. Identification of *Candida* strains with nested PCR in bovinemastitis and determination of antifungal susceptibilities. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 2017. 41 (6): 757-763. Doi: 10.3906/vet-1704-39.
70. Du J, Wang X, Luo H, Wang Y, Liu X, Zhou X. Epidemiological investigation of non-albicans *Candida* species recovered from mycotic mastitis of cows in Yinchuan, Ningxia of China. *BMC Vet Res*. 2018 Aug 29;14(1):251. doi: 10.1186/s12917-018-1564-3. PMID: 30157847; PMCID: PMC6114702.
71. Williamson JH, di Menna ME. Fungi isolated from bovine udders and their possible sources. *N Z Vet J*. 2007 Aug;55(4):188-90. doi: 10.1080/00480169.2007.36766. PMID: 17676084.
72. Sonmez, M, Erbas, G. Isolation and identification of *Candida* spp. from mastitis cattle milk and determination of antifungal susceptibilities. *Int. J. Vet. Sci.* [Internet] 2017 [citado el 24 de febrero de 2023]; 6 (2): 104-107. Disponible en: <https://www.ijvets.com/pdf-files/Volume-6-no-2-2017/104-107.pdf>
73. Moravkova M, Huvarova V, Vlkova H, Kostovova I, Bacova R. Raw bovine milk as a reservoir of yeast with virulence factors and decreased susceptibility to antifungal agents. *Med Mycol*. 2021 Oct 4;59(10):1032-1040. doi: 10.1093/mmy/myab036. PMID: 34169983.