



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y CONSERVACION DE
LEVADURAS AISLADAS DE LECHE DE VACAS
CLINICAMENTE SANAS O CON MASTITIS CLINICA
CRONICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presenta

GABRIELA SARAHI LUNA CASTRO



Asesores:

MVZ PhD ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES

QFB MC CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA

MEXICO, D.F.

2005

m. 344250



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: Manuel, Silvia y Kevin. Por todas las trayectorias gratas y no tan gratas, por motivarme a continuar, por apoyarme incondicionalmente para que cada día en mi vida no exista el arrepentimiento.

A mis familiares: Alberto, Álvaro, Eduardo, Marisela, Martha y Saúl por su tolerancia. Ángel, Esperanza e Itzel por abrirme las puertas de su casa.

A mis asesores: al Dr. Cervantes por su paciencia. A Carolina por mostrarme un camino que antes no hubiera imaginado, una alternativa más para vivir.

A mis amigos: Alma y César, por ofrecerme su comprensión y consejos.

A mis compañeros: Andira y Jesús, por darme su confianza y un lugar en sus mentes.

A mis otros compañeros: Manuel, Joseph y Saúl por creer en mí y recordarme lo importante que es el trabajo.

A todas aquellas personas que sin importar los perjuicios me brindaron compañía y amistad.

A Mildred, Porky y Lagar por escucharme pacientemente y darme serenidad.

Muchas gracias, este enorme beneficio personal y profesional no lo podré pagar con los días que me quedan de vida... a todos ustedes les dedico este trabajo

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Gabriela Sarah Luna Castro
FECHA: 19 Mayo 2005
FIRMA: [Firma]

CONTENIDO

	Página
RESUMEN _____	1
INTRODUCCIÓN _____	2
MATERIAL Y MÉTODOS _____	9
RESULTADOS _____	12
DISCUSIÓN _____	15
CONCLUSIONES _____	20
LITERATURA CITADA _____	21
ESQUEMAS _____	27
ANEXO 1 _____	30
ANEXO 2 _____	35

RESUMEN

LUNA CASTRO, GABRIELA SARAHÍ. Aislamiento, identificación y conservación de levaduras aisladas de leche de vacas clínicamente sanas o con mastitis clínica crónica (bajo la dirección de: Roberto Arnulfo Cervantes Olivares y Carolina Segundo Zaragoza).

El presente estudio se realizó con el fin de determinar la presencia de hongos unicelulares en animales sanos y con procesos mastíticos de curso crónico. Se tomaron muestras de leche de bovinos raza Holstein Friesian. El muestreo se llevó a cabo en el Estado de México, Querétaro y DF. El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ, UNAM. Se colectaron 412 muestras; 151 de animales clínicamente sanos y 261 con mastitis clínica de curso crónico. El estado clínico de los animales se estableció mediante la prueba de California y signología clínica. Se aislaron un total de 163 cepas (39.5%), 65 (15.3%) de animales sanos y 98 (23.8 %) de animales enfermos. La identificación se realizó considerando la morfología colonial y microscópica, así como características estructurales y bioquímicas. En animales sanos, la especie que se aisló con mayor frecuencia fue *Candida glabrata* y en animales con mastitis crónica *C. krusei*. En este último grupo, también se obtuvieron aislamientos de un alga incolora, identificada como *Prototheca zopfii*. Las cepas aisladas fueron almacenadas en tres diferentes sistemas de conservación.

INTRODUCCIÓN

La producción lechera se considera prioritaria debido a que la leche es una materia prima importante por su valor alimenticio, sus subproductos y los grandes sectores que de ella dependen. En el ganado lechero existen afecciones clínicas frecuentes, lo cual se traduce en mermas económicas importantes (6, 10, 12, 55, 56). Un ejemplo de lo anterior es la mastitis (inflamación de la glándula mamaria), los costos que implica a la producción (4, 40, 44, 63) son, entre otros: leche desechada por uso de antibióticos, honorarios del veterinario, medicamentos, disminución en la producción, incremento en mano de obra, tasa de reemplazos y desechos involuntarios (6, 12, 54). Cuando se presentan problemas de mastitis, la composición de la leche cambia en forma negativa (10) modificándose la palatabilidad, estabilidad, conservación (40, 63) y rendimiento en la producción de derivados lácteos (28, 40, 43, 63).

Es importante en la salud pública por las siguientes razones: la leche bronca proveniente de animales enfermos puede transmitir microorganismos involucrados en zoonosis, por ejemplo: brucelosis, tuberculosis, listeriosis, nocardiosis y salmonelosis (4, 6, 63). También se han detectado residuos de fármacos como alcaloides, antihistamínicos y quimioterapéuticos (28, 44, 63) que pueden ocasionar hipersensibilidad en forma de dermatitis atópica, incremento de la sensibilidad hacia el consumo de antibióticos principalmente en bebés y niños, así como el desarrollo de bacterias patógenas multiresistentes.

Este padecimiento es multifactorial, sus causas involucran aspectos como:

♦ Manejo clínico y zootécnico:

Uso de infusiones intramamarias durante más de 5 días (55)

Fallas técnicas en el equipo de ordeño (10, 55)

Falta de higiene durante la ordeña (4, 5, 10, 12, 22, 25, 55)

♦ Instalaciones:

Contaminación ambiental

Humedad en instalaciones (8, 22, 54)

Corrales sobrepoblados

♦ Condición de los animales:

Niveles disminuidos de macrófagos, neutrófilos, linfocitos, IgG, IgA, IgM, lactoferrinas, lisozimas y lactoperoxidasas (5, 11, 48, 55, 63); ubres pendulosas por la destrucción de las láminas laterales de soporte (4), pérdida del sostén anterior o posterior debido a factores genéticos o niveles elevados de producción (5, 11, 29); conducto secretor con niveles bajos de queratina o alteraciones del cierre hermético en el conducto del pezón (4, 8, 40, 54)

♦ Misceláneos:

Traumatismos (40)

La clasificación de la mastitis se basa en el curso de la enfermedad, signología, pruebas diagnósticas y origen de los microorganismos involucrados (4, 10, 12, 40, 42, 43, 53, 63):

a) Subaguda.- duración de horas

b) Aguda.- de 1 - 6 días

c) Crónica.- de 7 días hasta 3 semanas (55)

d) Clínica.- infección determinada mediante la palpación de cada uno de los cuartos de la ubre evaluando su consistencia, cambio de color o presencia de coágulos en la leche, utilizando la prueba de fondo oscuro. Los cambios en la producción son visibles cuando se realiza un análisis de los registros de producción

e) Subclínica.- infección que no manifiesta cambio externo alguno, los cambios se evidencian principalmente mediante las pruebas de California (CMT), Wisconsin y conteo de células somáticas (10, 58)

En campo, la prueba comúnmente practicada es la CMT, prueba que determina la cantidad de ácido desoxirribonucléico (ADN) dependiendo principalmente del número de leucocitos existentes en la leche, mediante la consistencia de la gelificación, dada cuando reaccionan volúmenes iguales de leche y de reactivo de California (3% de alkilarilsulfonato + púrpura de bromocreasol). Estas puntuaciones tenderán a elevarse durante las 2 primeras y 2 últimas semanas de lactación, también cuando la producción ha disminuido súbitamente por alguna enfermedad (10, 29, 58)

Número de células somáticas	Calificación
0-200.000	Negativo
150.000-500.00	Indicio o traza
400.000-1.000.000	+1
800.000-5.000.000	+2
Más de 5.000.000	+3

Lectura de la CMT

f) Mastitis contagiosa o endógena: causada por microorganismos que colonizan la glándula pudiendo ser propagados durante el ordeño, por la máquina o por el ordeñador. Por ejemplo: *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma* spp (12)

g) Mastitis ambiental o exógena: causada por microorganismos que normalmente no afectan la glándula, pudiendo infectar cuando el entorno de la vaca, la ubre y los pezones permite penetración de éstos al interior (a la cisterna del pezón). Por ejemplo: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp, *Actinomyces pyogenes*, *Corynebacterium bovis*, *Prototheca* spp, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. stellatoidea*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Pichia farinosa*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Saccharomyces fragilis* (2, 12,18, 28)

El proceso mastítico de carácter micótico comienza una vez que el microorganismo penetra a la glándula, iniciando un proceso inflamatorio,

la colonización se favorece al haber poca competencia por nutrientes y espacio. Como una respuesta natural del tejido, hay un incremento de células polimorfonucleadas (PLN), eosinófilos e histiocitos (2), que le deterioran (42), reemplazándose por tejido conjuntivo de cicatrización (43). Los PLN se conjugan con los factores de coagulación bloqueando los vasos lactíferos menores e impidiendo el ordeño a fondo (40). La inflamación provocada por hongos unicelulares aún siendo a nivel de mucosas (15, 55, 61) no cede ante los tratamientos antibacterianos tradicionales (33) debido a que la pared celular levaduriforme difiere de la bacteriana en sus componentes (esteroles, celulosa y quitina).

Entre los reportes sobre mastitis micótica, se encuentran los de Costa y col., quienes en 1993, mencionan que en 22 establos de 16 distritos del estado de Sao Paulo en Brasil, de 2078 muestras de leche provenientes de vacas sanas y con mastitis subclínica y clínica, aislaron hongos en 251 muestras, de éstos el 83% correspondieron a levaduras tales como: *Cryptococcus* spp, *Rhodotorula* spp, *Candida* spp, *Trichosporon cutaneum*, *Aureobasidium pullulans* y *Pichia ohmeri* y el 17% a hongos filamentosos como *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Alternaria* spp, *Phoma* spp, *Epicoccum* spp y *Geotrichum* spp (20). En Dinamarca durante 1994 Aalbaek y col., obtuvieron de 2896 muestras provenientes de animales con mastitis subclínica y clínica, 45 aislamientos, principalmente del género *Candida* spp y del alga *Prototheca zopfii* (1). En 1996 Lagneau y col., de Bélgica, analizaron 80 muestras de leche de animales enfermos y 463 de animales sanos, con 44 y 106 aislados respectivamente. Las identificaciones micóticas en el primer grupo corresponden a: *Candida kefyr*, *C. catenulata* y *C. lambica* (recuperadas también de leche normal). Del segundo: *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *Trichosporon asahii* (36). Mientras Langoni y col., en 1998 analizaron 464 muestras de

leche mamitosa y 320 con mastitis subclínica, obteniendo 98 y 22 aislamientos, respectivamente. Identificaron *Candida albicans*, *C. krusei*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *Mucor* spp, *Cephalosporium*, *Prototheca zopfii*, *Torulopsis* spp, *Rhizopus* spp, *Cryptococcus neoformans* y *Trichosporon* spp (37). Por su parte, Gunduz y col., en 1999 en la región de Konya en Turquía, estudiaron 733 muestras de leche de vacas con mastitis clínica, identificando los géneros *Candida* spp, *Rhodotorula* spp, *Geotrichum* spp, *Trichosporon* spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Rhizopus* spp, *Coccidioides* spp, e *Histoplasma* spp (31). En Transilvania durante el año 2001 Ognean y col., colectaron muestras de 8 establos lecheros, 412 de animales sanos y 482 con mastitis, aislando *Prototheca* spp, en ambos grupos (50). En este mismo año Krukowski y col., en la región de Lublin, Polonia muestrearon 172 vacas con mastitis clínica y subclínica, obteniéndose 604 muestras, en 58 de éstas hubo aislamiento de los géneros *Candida* spp, *Rhodotorula* spp y *Trichosporon* spp (34). Durante octubre de 2002 y febrero de 2003 Marín y col., colectaron 260 muestras de vacas con mastitis, aislando 45 cepas del género *Candida* spp, las especies se identificaron como: *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. albicans* y *C. guilliermondii* (42).

Con respecto a México, Stevens en 1965 de 120 muestras de bovinos con mastitis crónica, aisló diversos géneros fúngicos, como: *Geotrichum* spp, *Aspergillus* spp, *Cephalosporium* spp, *Fusarium* spp, *Mucor* spp y *Penicillium* spp (60). Zavala en 1966 de 400 muestras de bovinos afectados con mastitis, aisló 104 cepas, siendo los de mayor frecuencia los géneros *Aspergillus* spp, *Mucor* spp, *Penicillium* spp y *Rhizopus* spp (64). Murillo en 1978 reportó en 92 muestras de animales clínicamente enfermos 24 aislamientos, identificados como: *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *Cryptococcus neoformans* y *Saccharomyces* spp. En 62 muestras de animales clínicamente sanos obtuvo 6 aislamientos; *Candida*

albicans, *C. guilliermondii*, y *Rhodotorula* spp (47). En 1988 Rojano aisló de 168 muestras de leche mamitosa, 42 cepas levaduriformes correspondientes a: *Candida guilliermondii*, *C. kefyri*, *C. albicans* y *Rhodotorula* spp (57). Así también, Félix en 1996 reportó de 148 muestras de vacas con mastitis subclínica 38 aislamientos con la identificación siguiente: *Candida guilliermondii*, *C. kefyri*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. norvegensis*; y de 63 muestras con mastitis clínica, obtuvo 63 aislamientos: *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. kefyri*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis* (26).

Por lo que se refiere a las levaduras reportadas en leche, han sido consideradas apatógenas (en su mayoría) siendo importantes en la industria alimenticia pues intervienen en procesos de fermentación que aumentan el valor gastronómico de los alimentos, se han reportado: *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* variedad *marxianus* (antes *K. fragilis*), *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* (antes *K. lactis*), *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica* var. *lipolytica*, *C. lacticondensi* (antes *Torulopsis lactis-condensi*), *C. kefyri* (13, 55) y *Saccharomyces exiguus* (2).

La conservación de microorganismos aislados se lleva a cabo en los laboratorios de enseñanza e investigación, las cepas aisladas deben mantenerse en una colección para disponer en el futuro de colonias típicas y atípicas de los hongos patógenos, así como de los oportunistas. El objetivo de mantenerlos es preservar su viabilidad sin variaciones (3, 14, 46).

Justificación.- Debido a la importancia económica y sanitaria de la mastitis en la producción lechera bovina se determinó la microbiota levaduriforme presente en leche de animales sanos así como aquella involucrada en procesos mastíticos, para obtener una posible explicación del papel de las levaduras en esta enfermedad.

Hipótesis.- En vacas clínicamente sanas las levaduras aisladas serán diferentes en cuanto a cantidad, géneros y especies respecto a las aisladas en animales afectados.

Objetivo.- Aislar, identificar y conservar levaduras obtenidas de leche de ganado vacuno clínicamente sano o con mastitis clínica crónica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron 300 vacas mayores de 24 meses raza Holstein Friesian alojadas en establos particulares de producción intensiva, en los estados de México, Querétaro y DF. El muestreo realizado fue de conveniencia, en total se obtuvieron 412 muestras: 151 de animales clínicamente sanos y 261 con mastitis clínica de curso crónico.

Colección de muestras

Se tomaron muestras de leche de un cuarto en caso de vacas sanas y de cada cuarto afectado en caso de vacas enfermas. Para verificar el estado sanitario de las vacas sanas se realizaron palpaciones a la ubre, apreciación organoléptica de la leche y prueba negativa de California, además de la historia clínica.

El muestreo se llevó a cabo antes del ordeño, lavando la ubre con jabón, secando y desinfectando la punta del pezón con una solución yodada o alcohol al 70%, volviendo a secar. Se tomaron 15 ml cuidando que la boca del recipiente no tocara al pezón (26, 43, 63). Los recipientes utilizados fueron de tapón de rosca y esterilizados previamente.

Transporte de muestras

La leche colectada se mantuvo a 4°C durante su traslado, para preservar los microorganismos y evitar procesos de fermentación (45, 63). Las muestras se transportaron al laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), UNAM, para el aislamiento, identificación y conservación de levaduras.

Aislamiento

La leche se incubó a 37°C durante 15 min para liberar los microorganismos de las partículas grasas de la leche. Se tomaron 0.5 ml de cada muestra para inocular (63) en un tubo con 4.5 ml de caldo dextrosa Sabouraud

(CDS) pH 3.5, homogeneizando e incubando a 37°C, al mismo tiempo, se tomó una asada de la leche y se realizó un frotis fijo para observarlo con tinción de Gram. Las muestras de leche se almacenaron en congelación, a -20°C.

Después de 10 días de incubación, se tomaron 50 µl de cada tubo (CDS + leche) y se sembraron con la técnica de aislamiento en cultivo puro en cajas Petri con agar dextrosa Sabouraud adicionado con cloranfenicol (SDA+C) incubando nuevamente a 37°C de 24 a 72 h (18, 26). En los casos con crecimiento, se observó la morfología colonial según los parámetros de color, consistencia, agrupación, elevación, tonalidad y olor. La morfología microscópica (afinidad tintorial, tamaño y forma) se apreció mediante la realización de frotis fijo con tinción de Gram de la (s) colonia (s) desarrolladas. Las colonias que correspondieron a levaduras se purificaron (aislamiento en cultivo puro), con el fin de evitar contaminación bacteriana o la presencia de más de dos morfologías levaduriformes. (Ver esquema 1, anexos 1 y 2)

Identificación de levaduras

La identificación micótica se estableció considerando características morfológicas y metabólicas (8, 13, 16, 18, 35, 38, 41, 49, 52, 59). Todas las pruebas se realizaron con cultivos de 48 h de desarrollo. Las características morfológicas evaluadas fueron: forma, tamaño y formación de estructuras de reproducción asexual (clamidoconidias, blastoconidias, pseudomicelios o micelios verdaderos) y formación de tubo germinal (16, 18, 38, 49, 59).

Con respecto a las características fisiológicas se evaluaron: a) crecimiento en presencia de 0.1% de ciclohexamida (35, 38), b) crecimiento a pH 1.1-1.5, c) producción de ureasa (35, 38, 49), d) asimilación y fermentación de dextrosa, sacarosa, maltosa, galactosa, trehalosa, lactosa, y rafinosa, e) asimilación de xilosa, arabinosa, celobiosa,

ramnosa, adonitol, manitol, inositol y sorbitol (8, 16, 18, 33, 38, 49, 52). (Ver esquema 2, anexos 1 y 2)

Conservación de cepas

Las cepas se pueden mantener en agar, transfiriendo periódicamente a medios frescos inclinados ya sea a temperatura ambiente (15°C a 20°C) o en refrigeración (5°C a 8°C), a estas mismas temperaturas el método de agua destilada estéril es muy práctico y eficaz. La mezcla esterilizada de agua destilada y glicerol en diferentes porcentajes se utiliza para el mantenimiento en congelación (0°C a -130°C). El aceite mineral estéril es empleado para hongos filamentosos. El congelamiento con nitrógeno líquido mantiene los microorganismos viables durante cinco años (3). La técnica más conveniente es la de liofilización, pues permite conservar hongos hasta por 30 y 40 años, sin posibilidad de contaminación. Sin embargo, el inconveniente principal de estas dos últimas técnicas es su alto costo. Al obtener un inóculo de una cepa conservada, se debe regresar a su temperatura inicial inmediatamente, para evitar un choque térmico (14).

Las cepas se conservaron en tres sistemas:

*Refrigeración (4°C) en agar dextrosa Sabouraud. El cultivo a conservar se incubó a 37°C durante 24 h, posteriormente se tomó una asada, equivalente a 250 unidades formadoras de colonias (UFC) y se sembró en un tubo con SDA

*Refrigeración (4°C) en agua destilada estéril. El cultivo a conservar se incubó a 37°C durante 24 h, posteriormente se tomaron 2 a 3 asadas (500-750 UFC) y se inoculó un tubo con 1 ml de agua destilada estéril

*Congelación (-20°C y -70°C) en agua destilada + glicerol estéril al 50%. El cultivo a conservar se incubó a 37°C durante 24 h, posteriormente se tomaron cuatro asadas (1000 UFC), inoculando una en cada tubo con 1 ml de agua destilada + glicerol al 50% estéril, dos tubos se guardaron a -20°C y dos a -70°C. (Ver esquema 3, anexos 1 y 2)

RESULTADOS

En las 261 muestras de animales enfermos, se obtuvieron 98 aislamientos (23.78 %); de los cuales, 59 (60.2%) corresponden a *Candida krusei*, 15 (15.3%) *C. glabrata*, 4 (4.08%) *C. kefyr*, 4 (4.08%) *C. norvegica*, 2 (2.04%) *C. albicans*, 2 (2.04%) *C. albicans* var. *stellatoidea*, 2 (2.04%) *C. tropicalis*, 1 (1.02%) *C. lambica*, 1 (1.02%) *C. lusitaniae*, 1 (1.02%) *C. parapsilosis* y 7 (7.14%) aislamientos de *Prototheca zopfii*.

En las muestras de animales sanos, de 65 (15.77%) aislamientos, 46 corresponden a *C. glabrata* (70.76%), 6 (9.23%) *C. viswanathii*, 5 (7.69%) *C. krusei*, 2 (3.07%) *C. intermedia*, 1 (1.53%) *C. kefyr*, 1 (1.53%) *C. norvegica*, 1 (1.53%) *C. guilliermondii*, 1 (1.53%) *C. tropicalis*, 1 (1.53%) *C. macedoniensis* y 1 (1.53%) *Rhodotorula* spp (Ver cuadro y figura 1).

En total, se conservaron 163 cepas: 156 de levaduras y 7 de algas, de éstas se recuperaron 156 de levaduras y 4 de algas. En las 156 muestras con aislamiento, 7 tuvieron el desarrollo de dos colonias de levaduras diferentes, en el resto, sólo un tipo de colonia por muestra. El crecimiento de hongos filamentosos fue del 0.97%.

Identificación	Enfermos n=261	Sanos n=151	Número de aislamiento total
	Número y Porcentaje de Aislamientos		
<i>Candida krusei</i> *	59 (60.2%)	5 (7.69%)	64
<i>Candida glabrata</i> *	15 (4.08%)	46 (70.76%)	61
<i>Candida kefyr</i> *	4 (4.08%)	1 (1.53%)	5
<i>Candida norvegica</i> *	4 (2.04%)	2 (1.53%)	6
<i>Candida albicans</i>	2 (2.04%)	NA	2
<i>Candida tropicalis</i> *	2 (2.04%)	1 (1.53%)	3
<i>Candida albicans</i> var. <i>stellatoidea</i>	2 (2.04%)	NA	2
<i>Candida lusitaniae</i>	1 (1.02%)	NA	1
<i>Candida lambica</i>	1 (1.02%)	NA	1
<i>Candida parapsilosis</i>	1 (1.02%)	NA	1
<i>Candida viswanathii</i>	NA	6 (9.23%)	6
<i>Candida intermedia</i>	NA	1 (3.07%)	1
<i>Candida guilliermondii</i>	NA	1 (1.53%)	1
<i>Candida macedoniensis</i>	NA	1 (1.53%)	1
<i>Rhodotorula spp</i>	NA	1 (1.53%)	1
<i>Prototheca zopfii</i>	7 (7.14%)	NA	7
Total de aislamientos	98 (23.78%)	65 (15.77%)	163

Cuadro 1. Frecuencia de aislamiento e identificación

NA: No aislado

* : Especies aisladas en ambos grupos de estudio

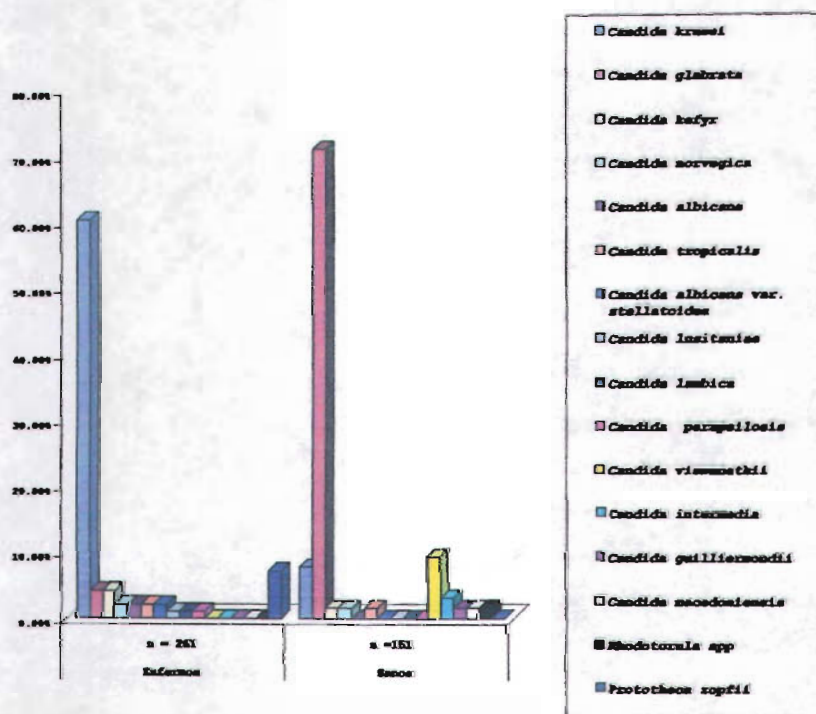


Figura 1. Comparación del porcentaje de la población levaduriforme identificada en vacas sanas y enfermas

n= número de muestras

DISCUSIÓN

Con respecto a las muestras de leche de vacas con mastitis clínica de curso crónico la levadura con mayor porcentaje de aislamiento fue *Candida krusei* (60.2%), especie que ha sido reportada por Langoni y col., en 3.02% (37), Marín y col., con 44.5% (42) y Murillo en un 3.26% (47); seguida de *C. glabrata* (15.3%), este hallazgo no ha sido documentado en bovinos, no se encontró información de aislamientos en la bibliografía consultada; otra de las especies aisladas fue *C. kefyr* (4.08%), Aalbaek y col., reportan un total de 13.33% de aislamientos (1), Félix en 18.4% y 18.5% en procesos subclínicos y crónicos, respectivamente (26), Murillo en 4.16% (47) y Rojano en 2.97% (57); *C. albicans* se aisló en menor porcentaje (2.04%), comparado con los estudios realizados por Félix quien la obtuvo en 33.3% (26), por su parte Langoni y col., la obtuvieron en 4.96% (37), Marín y col., en 8.9% (42), Murillo reportó 15.2% de aislados (47) y Rojano 4.76% (57). En la disminución de la cantidad de aislamientos de *C. albicans* (comparando este estudio con el de Félix en 1996) considerada como el principal patógeno micótico oportunista en mamíferos, las condiciones del muestreo, tiempo y temperatura de almacenamiento de las muestras así como la historia clínica de las vacas, son fundamentales para explicar esta variación. En años recientes las investigaciones en pacientes humanos con depresión del sistema inmunológico, declaran el aumento en la frecuencia de otras especies del género *Candida* spp, favorecido por los tratamientos antibacterianos prolongados y la falta de análisis de laboratorio. En la práctica de la medicina veterinaria estas condiciones son muy similares, por esta razón es muy probable que ascienda la variabilidad de especies de este género en procesos infecciosos. Referente a *C. tropicalis*, especie encontrada en 2.04%, Aalbaek y col., la reportan con 6.66% (1).

Félix con 18.5% (26) y Murillo con 15.21% (47). En el caso de *C. lambica* en el presente estudio, se encontró en 1.02%, esta especie ha sido reportada tanto en leche normal como en mamitosa (36); *C. norvegica* se presentó con 4.08%, en casos de mastitis subclínica se obtuvo en 2.7% (26); por lo que se refiere a *C. parapsilosis* aislada en 1.02%, ha sido reportada previamente por Félix en un 11.2% en vacas con mastitis clínica y en 10.5% en casos de mastitis subclínica (26), Lagneau y col., la reportan en animales sanos (36). De *C. lusitaniae* (1.02%), tampoco se tienen informes ni en mastitis bovina ni en leche normal, la información disponible es en casos de humanos inmunocomprometidos con micosis sistémicas. Acerca del género *Prototheca* spp, identificado en 7 aislamientos (1.69%) en el presente trabajo, las referencias encontradas son de Aalbaek y col., que identificaron de 45 cepas a *Prototheca zopffii* en 11.11% (1), Bexiga y col., identificaron 6 cepas de *P. zopffii* tomadas de cuatro vacas con mastitis subclínica (9), Carciofi y col., la obtuvieron en 12.79% (17), Corbellini y col., reportaron esta especie en 9%(19), Costa y col., la aislaron de dos granjas: la primera, con porcentaje de 14.95% en animales con mastitis subclínica y la segunda, con 51% en casos clínicos (21); Costa y col., en otro estudio realizado en un solo establo, a partir de 293 muestras reportaron 22.61% de aislamiento (22), Janosi y col., en los últimos 2 años han estudiado 223 casos de mastitis por *P. zopffii*, identificada en 32 granjas (32), Langoni y col., la reportan en 2.15% (37); incluso en animales sanos, Ognean y col., aislaron cepas de este género en dos granjas con porcentajes de 2.27% y 1.21% respectivamente (50).

En las muestras de animales sanos predominó *C. glabrata* (15.77%) mencionada también por Lagneau y col., (36), seguida por *C. viswanathii* con 9.23% de aislamiento, de la cual no se poseen informes en casos de mastitis bovina o leche normal, al igual que *C. intermedia*, obtenida en

3.07%. De estas dos últimas especies no está claramente descrita su patogenicidad, no se descarta que actúen secundariamente como cualquier agente oportunista. *C. krusei* se aisló en un 7.69%, Ognean y col., la reportan en un 6.9% (50), Lagneau y col., informan que forma parte de la microbiota mamaria (36). El porcentaje de aislamiento de *C. kefyr* fue de 1.53%, esta especie se ha encontrado en algunos productos lácteos, principalmente en quesos (56). A *C. tropicalis* se le identificó en 1.53%, Ognean y col., la revelaron como parte de la glándula mamaria con 20.8% (50), así como Lagneau y col., (36). Otras especies identificadas fueron *C. guilliermondii* y *Rhodotorula* spp, ambas con 1.53% de aislamiento; *C. guilliermondii* la reportó Murillo en 33.33% y a *Rhodotorula* spp en 16.66% (47). Con 1.53% de porcentaje se encontraron las especies *C. macedoniensis* y *C. norvegica*, de las cuales no hay informes de su presencia en leche de vaca.

De la conservación de las cepas, los autores consultados (3, 14, ,46) recomiendan diferentes métodos de almacenamiento, según las características del microorganismo. En el caso de las levaduras, para lograr su crecimiento satisfactorio, comúnmente se utiliza agar estéril con sustratos proteicos (por ejemplo peptona), el pH adecuado es de 5 a 7, la presión osmótica es relativamente alta debido a la presencia de sales o azúcares en el medio de cultivo, la temperatura óptima varía de 25°C, 20°C, 15°C, hasta temperaturas de refrigeración y congelación. La finalidad de estos procedimientos es asegurar la viabilidad de las cepas conservadas, su promedio de vida a temperaturas mayores de 0°C es de hasta un año ya que disminuye el metabolismo, en cambio, a temperaturas bajo cero llega incluso a los 5 años, pues las actividades bioquímicas del microorganismo se detienen. En este estudio los sistemas utilizados se eligieron por ser prácticos, rápidos y económicos. El porcentaje de viabilidad obtenido en el sistema de refrigeración fue de 96.94%. Las

cepas resembradas de éste sistema fueron recuperadas después de un año.

Los aislamientos obtenidos, revelan que en animales con mastitis clínica la especie que prevalece es *C. krusei*, este incremento se debe a las diversas condiciones geográficas donde se muestreó al ganado, tipo de alimentación (25), condiciones en la toma de muestra y metodología de aislamiento. Con relación a *C. glabrata*, especie aislada con mayor porcentaje en animales clínicamente sanos y en segundo lugar en animales con mastitis clínica, no se cuenta con datos en ganado bovino para realizar una comparación, la información acerca de su desarrollo como patógeno emergente es en la especie humana (39, 51, 61). Con relación al género *Prototheca* spp es un alga ambiental, cuyo hallazgo en leche proveniente de animales afectados clínica y subclínicamente, así como en leche normal ha ido en aumento en las últimas dos décadas, aún con estos descubrimientos no queda claro si se trata de un patógeno primario u oportunista.

En las explotaciones lecheras actuales, se conjuntan factores que predisponen a la presentación de mastitis, siendo determinante para la mastitis micótica las terapias y profilaxis antibacterianas prolongadas, independientemente del origen de las levaduras (ya sea contagioso o ambiental) o su vía de entrada.

La evaluación de la importancia clínica y epidemiológica de las levaduras involucradas en mastitis bovina, se encuentra afectada por diversas causas, entre las que se mencionan: 1) restricciones en la obtención de muestras clínicas, 2) falta de datos en la historia clínica o ausencia de la misma, 3) dificultad del control aséptico en la toma de muestras, 4) conservación y transportación adecuada de la muestra, 5) uso indiscriminado de antibacterianos, 6) falta de estudios microbiológicos de la leche en forma periódica, 7) falta de higiene en los establos y 8) ausencia de notificación ante casos de levaduras como agentes causales.

(51, 52). Por otra parte, la identificación bioquímica convencional consume un tiempo que varía de 3 hasta 21 días dependiendo del género y la especie. Debido a esto, en los últimos años se ha incrementado el uso de pruebas comerciales que permiten la identificación en periodos de tiempo más cortos. Sin embargo, estos métodos no han sustituido a la identificación convencional ya que representan problemas al momento de identificar levaduras de aislamiento poco frecuente (51, 52).

Por lo anterior, determinar si las levaduras son los agentes causales primarios, o actúan como oportunistas en problemas mastíticos, dependerá de realizar una historia clínica confiable y efectuar oportunamente análisis microbiológicos.

A nivel de campo, se requiere hacer conciencia al ganadero de la presencia de las levaduras como agentes involucrados en la mastitis y que no sólo intervienen bacterias, esto se traduce en la implementación de medidas que a largo plazo favorezcan la disminución de casos y por lo tanto reducir las pérdidas económicas registradas hasta el momento.

CONCLUSIONES

- La presencia de levaduras del género *Candida* spp en ambos grupos de estudio demuestra que estos microorganismos son parte de la microbiota en la glándula mamaria.
- *Candida krusei* fue la levadura con mayor porcentaje de aislamiento en leche proveniente de animales clínicamente afectados, mientras que *C. glabrata* se aisló en mayor porcentaje en muestras de animales sanos.
- El aislamiento de las especies identificadas como *C. viswanathii*, *C. intermedia* y *C. macedoniensis* no ha sido reseñado en otros estudios.
- El método de conservación evaluado fue adecuado para la preservación de cepas durante un año.

LITERATURA CITADA

- 1) Aalbaek B, Stenderup J, Jensen HE, Valbak J, Nylon B, Huda A. Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark. APMIS 1994 Jun; 102 (6): 451-456
- 2) Ainsworth GC, Austwick PKC. Fungal Diseases of animals. 2° ed. CAB: 1973
- 3) Arenas GR. Micología médica ilustrada. 2° ed. México: Mc Graw Hill. 2003
- 4) Ávila TS. Mastitis en ganado bovino. FMVZ UNAM. Disponible en: URL: <http://www.academicos.cualtos.udg.mx>
- 5) Ávila TS, Blanco OM. Temas selectos sobre fisiopatología de la glándula mamaria y ordeño. Memorias. Sistema de Universidad Abierta. FMVZ; 1990 junio; México (DF); 54-69
- 6) Ávila TS, Blanco OM, Romero AT. Mastitis y Producción de Leche en Trópico Húmedo. México DF: SUA-FMVZ. 1991
- 7) Bailey JW. Veterinary Handbook for Cattlemen. 4° ed. USA: Springer Publishing Company. 1973
- 8) Barnett AJ, Payne WR, Yarrow D. Yeast: Characteristics and Identification. Great Britain: Cambridge University Press. 1983
- 9) Bexiga R, Caravaco L, Vilela CL. Isolation of *Prototheca zopfii* from bovine milk. RPCV 2003: 98 (545): 33-37
- 10) Blowey R. A Veterinary Book for Dairy Farmers. Gran Bretaña: Farming Press. 1993
- 11) Blowey R, Boyd H, Eddy R, Andrews A. Bovine medicine. Diseases and Husbandry of cattle. London: Blackwell Scientific Publications. 1992
- 12) Blowey R, Edmonson P. Control de la Mastitis en Granjas de Vacuno de Leche. Zaragoza: Acribia. 1995
- 13) Bonifaz A. Micología médica básica. México DF: Méndez. 1994
- 14) Booth C. Methods in microbiology. London: Academic Press. 1974

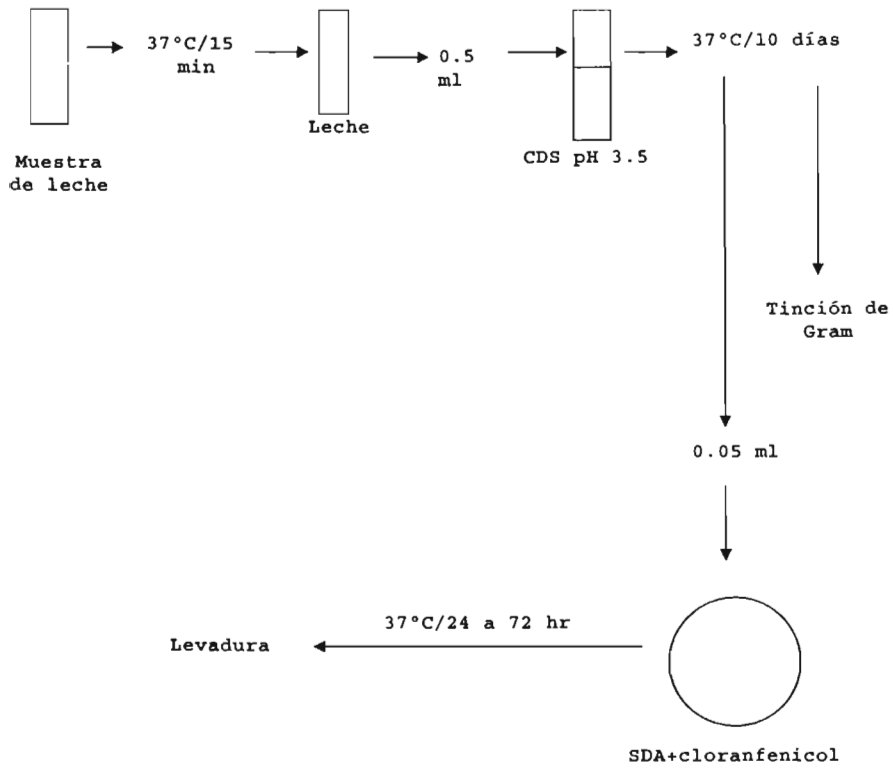
- 15) Calderone AR. *Candida* and Candidiasis. Washington: ASM Press USA. 2002
- 16) Campbell MC. The Medical Mycology Handbook. USA: John Wiley and Sons. 1980
- 17) Carciofi AC, Melville PA, Prada MS, Schalch U. *Prototheca* sp. Outbreak of bovine mastitis. Zentralbl Veterinarmed 1996; 43 (6): 321-324
- 18) Carter GR. Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Micology. 5th ed. USA: Academic Press, Inc. 1990
- 19) Corbellini LG, Driemeier D, Cruz C, Dias MM, Ferreiro L. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*: clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd. Trop Anim Health Prod 2001; 33 (6): 463-470
- 20) Costa EO, Gandra CR, Pires MF, Coutinho SD, Castilho W, Teixeira CM. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of Sao Paulo, Brazil. Mycopathologia 1993; 124: 7-13
- 21) Costa EO, Ribeiro AR, Melville PA, Prada MS, Carciofi AC, Watanabé ET. Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca*. Mycopathologia 1996; 133 (2): 85-88
- 22) Costa EO, Ribeiro AR, Watanabé ET, Pardo RB, Silva JB, Sánchez RB. An increased incidence of mastitis caused by *Prototheca* species and *Nocardia* species on a farm in Sao Paulo, Brazil. VET RES Commun 1996; 20 (3): 237-241
- 23) Difco Laboratories. Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures. 1974
- 24) Dorko EM, Zibrin E, Pilipcinec A, Jenca J, Jautavá F, Dorko J, Danko E, Svicky I. Pathogenicity of *Candida krusei* and *Candida albicans* in the tongue of rats. Acta Vet Brno 2001; 70: 173-177
- 25) Elad D, Shpigel NY, Winkler M, Klinger I, Saran A, Faingold D. Feed contamination with *Candida Krusei* as probable source of mycotic mastitis in dairy cows. J Am Med Assoc 1995; 277 (5): 620-622

- 26) Felix, JE. Aislamiento e Identificación de Especies del Género *Cándida* en Leche de Vacas con Mastitis Subclínica y Clínica de Curso Crónico (tesis de licenciatura). DF México: FMVZ UNAM. 1996
- 27) Flores BJ. Comparación de la Microbiota Levaduriforme Dominante en Lechones de 8, 25 y 40 días y la Aislada en Lechones de la Misma Edad Provenientes de Madres que Recibieron un Probiótico (Sc47) (tesis de licenciatura). DF México: FMVZ UNAM. 2002
- 28) Flores FR. Manual de mastitis bovina. México DF: DPA-FMVZ. 1988
- 29) Gibbons WJ, Catcott EJ, Smithcors JF. Bovine Medicine and Surgery. USA: American Veterinary Publications. 1970
- 30) González RN. *Prototheca*, yeast and *Bacillus* as a cause of mastitis. National Mastitis Council Annual Meeting; 1996; Tennessee (USA); 82
- 31) Gunduz, K, Ok, U. Studies on isolation and sensitivities to various antimicrobics of micotic agents causing clinical and sub-clinical mastitis in konya region. Veterinary Control and Research Institute. 1999
- 32) Janosi s, Szigeti G, Ratz F, Lauko T, Kerény J, Tenk M, Katona F, Huszenicza A, Kulcsar M, Huszenicza G. *Prototheca zopfii*. Mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. Vet Q 2001; 23 (2). 80-83
- 33) Kirk, J. Mastitis por *Prototheca*. Disponible en: URL: <http://lmvltada.com/programas/aro3.html>
- 34) Krukowski H, Tietze M, Majewski t, Rozanski P. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. Mycopathologia 2001; 150 (1): 5-7
- 35) Kurtzman CP, Fell JW. The Yeast, a Taxonomic Study. 4° ed. Amsterdam: Elsevier. 1999
- 36) Lagneau PE, Lebtani K, Swinne D. Isolation of yeast from bovine milk in Belgium. Mycopathologia 1996 ; 135 (2) : 99-102

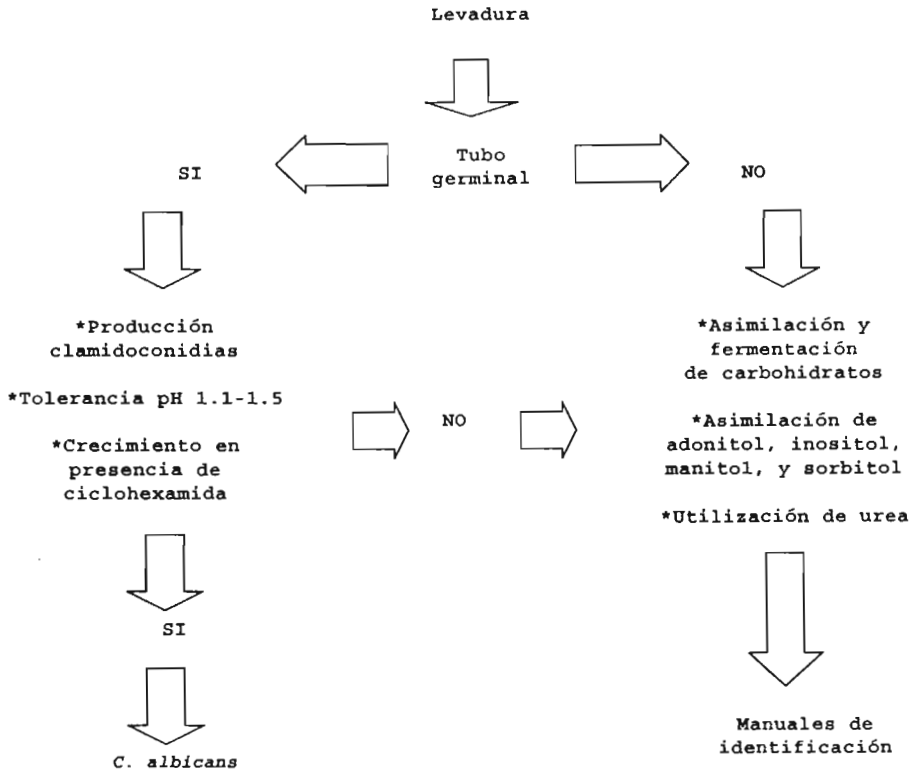
- 37) Langoni H, Domingues PF, Chi KD, Pardo RB, Silva AV, Cabral KG, Rosa C. Participación de levaduras, algas y hongos en mastitis bovina. Vet e Zoot 1998; 10: 89-98
- 38) Larone HD. Medically Important Fungi. A guide to Identification. 3° ed. USA: ASM Press. 1995
- 39) Lipperheide V, Bikandi J, García-Fernández JF, Quindós G, Pontón J. Variación en las colonias de *Candida glabrata* procedentes de pacientes con vaginitis. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Bilbao; Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Can Mises, España. 2002
- 40) Loor JJ, Jones MG, Bailey LT. Aspectos básicos sobre el desarrollo de mastitis. 2000. Disponible en: URL: [http://www.dasc.vt.edu/jones/understandingmastitis\(spanish\).htm](http://www.dasc.vt.edu/jones/understandingmastitis(spanish).htm)
- 41) López MR. Micología Médica. Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio. México: Trillas. 1995
- 42) Marín JM, de Casia dos Santos R. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. Mycopathologia 2004; 00: 1-3
- 43) Mastitis bovina. Efectos sobre la calidad de la leche y los programas de control. Disponible en: URL: http://www.revistadelproductor.com/mayo2004/mastitis_bovina.htm
- 44) Mastitis: enfermedad y transmisión. Disponible en: URL: http://www.agrobit.com/info_tecnica/ganaderia/enfermedades/GA00009.en.htm
- 45) Mastitis National Council. Procedimientos microbiológicos para la diagnosis de la infección de la ubre de los bóvidos. 1990
- 46) Medical Mycology Procedure Manual. 1996 Disponible en: URL: <http://www.doctorfungus.org/thelabor/sec10.pdf>
- 47) Murillo SE. Aislamiento e identificación de levaduras en leche de vacas clínicamente afectadas por mastitis (tesis de licenciatura). DF México: FMVZ UNAM. 1978

- 48) Nelson PW. Relación entre el manejo de hato y la mastitis. Disponible en : URL: <http://ganaderia.com.mx/articulos/sanidad/san004.php>
- 49) Odds FC. *Candida and Candidosis*. London: Leicester University Press. 1979
- 50) Ognean L, Pusta D, Oana L. Signals regarding the isolation of chlorophyll-free algae in the milk of some healthy cows and some with mamitts. *JCEA* 2001; 2: 1-2
- 51) Okungbowa FI, Omoanghe S, Isikhuemhen & Alice PO. Distribución de especies de *Candida* en el tracto genitourinario de individuos con sintomatología en algunas ciudades de Nigeria. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 60-63
- 52) Panizo MM, Reviákina V, Dolande M, Maldonado B. Aislamiento de levaduras en muestras clínicas. Casuística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (1996-2001). *Revista de la Sociedad Venezolana de Micología* 2002; 1; 22
- 53) Pinzón GJ. Mastitis Bovina. FONAIAP Divulga 1989: 31 Disponible en: URL: <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fdvul.html>
- 54) Rebhun WC. *Diseases of Dairy Cattle*. USA: Williams and Wilkins. 1995
- 55) Rebhun, WC. *Enfermedades del ganado vacuno lechero*. Zaragoza: Acribia. 1999
- 56) Robinson RK. *The Microbiology of Milk* 2th ed. London and New York: Elsevier Applied Science. 1990
- 57) Rojano FU. Frecuencia e identificación de especies de levaduras aisladas de leche de vacas con mastitis. XVI Congreso Nacional de Buiatría. Veracruz 1991; 444-446
- 58) Schalm OW, Carroll EJ, Jain NC. *Bovine mastitis*. USA: Lea & Febiger. 1971

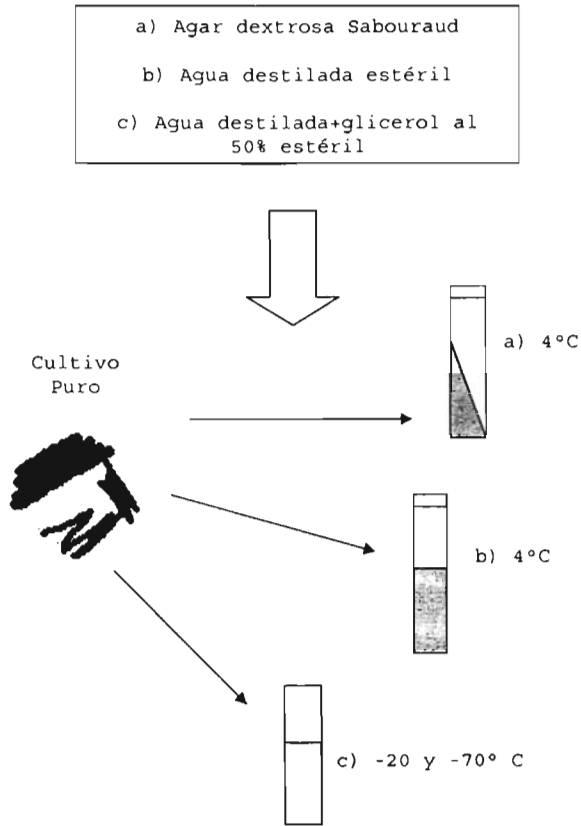
- 59) Segundo ZC. Manual Teórico-Práctico de Micología Médica para la Carrera de QFB (Prácticas y Alternativas) (tesis de licenciatura). DF México: FES CUAUTITLÁN UNAM. 1991
- 60) Stevens FL. Aislamiento e Identificación de hongos patógenos de leches procedentes de bovinos con mastitis (tesis de licenciatura) DF México: ENMVZ UNAM. 1965
- 61) Torres-Rodríguez J, Morera Y, López O. *Candida glabrata*, un patógeno emergente. Instituto Municipal de Asistencia Sanitaria, Universidad Autónoma de Barcelona. 2003
- 62) Veen HS, Kremer WD. Mycotic mastitis in cattle. *Tijds Diergenms* 1992; 117 (14): 414-416
- 63) Wolter W, Castañeda VH, Klopper B, Schoeck M. La mastitis bovina. Disponible en: URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2002/912/pdf/p020003.pdf>
- 64) Zavala SI. Incidencia de los géneros *Mucor*, *Aspergillus* y *Penicillium* en leches procedentes de bovinos con mastitis (tesis de licenciatura). DF México. 1966



Esquema 1. Metodología utilizada para el aislamiento de colonias levaduriformes provenientes de leche



Esquema 2. Metodología utilizada para la identificación



Esquema 3. Metodología llevada a cabo para la conservación de cepas.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

ANEXO 1: PROCEDIMIENTOS DE PRUEBAS Y TINCCIONES EMPLEADAS EN LA METODOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LEVADURAS

a) **Tinción de Gram:** esta herramienta diagnóstica sirve para observar la morfología microscópica, agrupación y afinidad tintorial

1. En un portaobjetos colocar una gota de agua destilada y una pequeña asada del cultivo.
2. Dejar secar y fijar a la flama.
3. Cubrir el frotis con solución de cristal violeta, dejar actuar durante 30 segundos y lavar con agua corriente.
4. Cubrir el frotis con lugol, dejar actuar durante 30 segundos y lavar con agua corriente.
5. Decolorar con 1 gota de alcohol acetona e inmediatamente lavar con agua corriente.
6. Contrastar con la solución de fucsina básica durante 30 segundos.
7. Lavar con agua corriente y secar.
8. Agregar una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio con el objetivo de inmersión (27, 38)

b) **Tubo germinal:** consiste en la incubación de células levaduriformes individuales en plasma o suero bovino o equino, albúmina bovina o líquido amniótico. El tubo germinal se observa como una elongación unipolar de estas células (26, 27, 52)

1. Flamear un asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de la colonia.
2. Inocular un tubo con el reactivo elegido.
3. Incubar a 37°C por un tiempo de 2 a 3 horas.
4. Realizar una preparación húmeda.
5. Observar bajo el microscopio a 10x y 40x.

Interpretación de resultados:

Positivo: formación de tubo germinal

Negativo: ausencia de tubo germinal

c) Tolerancia a pH ácido: consiste en la incubación de células levaduriformes individuales en caldo Czapek-Dox con un pH de 1.1 y 1.5. La tolerancia a pH ácido es característica de ciertas especies (25, 26, 51)

1. Flamear un asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de la colonia.
2. Inocular un tubo con caldo Czapek-Dox pH 1.1 y otro tubo con pH 1.5.
3. Lectura a partir de las 24 a 72 h.

Interpretación de resultados:

Positivo (crecimiento): turbidez en el medio

Negativo (no hay crecimiento): ausencia de turbidez

d) Producción de clamidoconidias: esta prueba se realiza en un medio para producción de clamidoconidias, por ejemplo, agar harina de maíz o agar Czapek-Dox adicionado con tween 80 al 1%. Estas estructuras se consideran de resistencia y reproducción asexual, tienen forma esférica de pared gruesa (26, 27, 52)

1. Flamear un asa bacteriológica, enfriar en el medio y tomar una asada de la colonia.
2. Sembrar con la técnica de emparedado una caja Petri con agar Czapek-Dox adicionado con 1% de tween 80.
3. Lectura a partir de 72 h hasta 7 días de incubación a 30°C, mediante la observación en microscopio con objetivo de 10x y 40x.

Interpretación de resultados:

Positivo: producción de clamidoconidias

Negativo: ausencia de clamidoconidias

e) Producción de ureasa: algunas levaduras producen esta enzima que desdobla la urea. (26, 27, 52)

1. Flamear un asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de la colonia.
2. Sembrar con estría continua un tubo de agar urea.
3. Lectura desde las 24 h al día 7.

Interpretación de resultados:

Positivo (producción ureasa): cambio del medio de amarillo a rosa

Negativo (no hay producción): el medio permanece amarillo

f) Fermentación de carbohidratos: consiste en la incubación de levaduras para observar su capacidad de fermentar diferentes carbohidratos en un ambiente carente de oxígeno (26, 27, 52)

1. Flamear un asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de la colonia.
2. Agitar el asa en un tubo con 10 ml de agua destilada estéril y después agitar el tubo en un Vórtex.
3. Comparar la turbidez con el 0.5 de McFarland.
4. Tomar 0.5 ml de esta suspensión con una micropipeta de 1 ml y adicionar a cada tubo con carbohidrato.
5. Incubación a 37°C y lectura a partir de las 24 h al día 7.

Interpretación de resultados:

Positivo (fermentación): presencia de gas o burbujas en el tubo Durham

Negativo (no hay fermentación): ausencia de gas

g) Asimilación de carbohidratos: esta prueba muestra la capacidad de las levaduras para utilizar como substrato un carbohidrato (26, 27, 52)

1. Flamear un asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de la colonia.
2. Agitar el asa en un tubo con 10 ml de agua destilada estéril y después agitar el tubo en un Vórtex.
3. Comparar la turbidez con el 0.5 de McFarland.

4. Tomar 0.5 ml de esta suspensión con una micropipeta de 1 ml y adicionar a cada tubo con carbohidrato.

5. Incubación a 37°C y lectura a partir de las 24 h al día 7.

Interpretación de resultados:

Positivo (asimilación): cambio de color del medio de rojo a amarillo

Negativo (no hay asimilación): el medio permanece rojo

h) Crecimiento en presencia de ciclohexamida al 0.1%: consiste en incubar cepas levaduriformes en medio líquido nitrogenado adicionado con ciclohexamida para determinar susceptibilidad (17)

1. Flamear un asa bacteriológica, enfriar en el medio y tomar una asada de la colonia.

2. Agitar el asa en un tubo con 10 ml de agua destilada estéril y después agitar el tubo en un Vórtex.

3. Comparar la turbidez con el 0.5 de McFarland.

4. Tomar 0.5 ml de esta suspensión con una micropipeta de 1 ml y adicionar a cada tubo con el medio descrito anteriormente.

5. Incubación a 37°C y lectura a partir de las 72 h hasta 7 días.

Interpretación de resultados:

Positivo (no susceptible a ciclohexamida): crecimiento

Negativo (susceptible a ciclohexamida): ausencia de crecimiento

i) Asimilación de xilosa, inositol y dulcitol: esta prueba determina la capacidad de utilizar estos substratos, por parte de las levaduras (8, 16, 18, 35, 38, 49)

1. Flamear un asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de la colonia.

2. Agitar el asa en un tubo con 10 ml de agua destilada estéril y después agitar el tubo en un Vórtex.

3. Comparar la turbidez con el 0.5 de McFarland.

4. Tomar 0.5 ml de esta suspensión con una micropipeta de 1 ml y adicionar a cada tubo con carbohidrato.

5. Incubación a 37°C y lectura a partir de las 24 h al día 7.

Interpretación de resultados:

Positivo (asimilación): cambio de color del medio de rojo a amarillo

Negativo (no hay asimilación): el medio permanece rojo

j) Conservación en refrigeración (4°C)

1. Flamear un asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de la colonia del cultivo a conservar.

2. Sembrar con estría continua dos viales y un tubo con agar dextrosa Saboraud e incubar a 37°C durante 48 h (40).

3. Del mismo cultivo, tomar varias asadas e inocular un vial con 10 ml de agua destilada estéril y refrigerar.

4. Después de la incubación sellar con parafilm el tubo, viales y refrigerar.

k) Conservación en congelación (-20°C)

1. Flamear un asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de la colonia.

2. Inocular con varias asadas un tubo plástico estéril con 1 ml de agua destilada + glicerol al 50% estéril y congela (40).

l) Conservación en congelación (-70°C)

1. Flamear un asa bacteriológica, enfriar en el agar y tomar una asada de la colonia.

2. Inocular con varias asadas un tubo plástico estéril con 1 ml de agua destilada + glicerol al 50% estéril y congelar (40).

**ANEXO 2: ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO, PRUEBAS
MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS**

***Caldo dextrosa Sabouraud pH 3.5**

Peptona de carne o de caseína.....10 g
Dextrosa.....40 g
Agua destilada.....1000 ml

Suspender 30 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme la cual a su vez se ajusta con ácido clorhídrico a un pH de 3.5 con ayuda del potenciómetro. Posteriormente se colocan 4.5 ml del medio preparado en tubos de 13 x 100 y se esteriliza a 15 libras, 15 minutos a 121° (26)

***Agar dextrosa Sabouraud adicionado con cloranfenicol**

Agar bacteriológico.....15 g
Peptona de carne/ caseína.....10 g
Dextrosa.....40 g
Cloranfenicol.....500 mg
Agua destilada.....1000 ml

Medir el volumen requerido de agua destilada en una probeta y vaciarle en un matraz de vidrio, pesar los gramos correspondientes de cada ingrediente y agregarlos al mismo matraz, calentar con agitación constante hasta el punto de ebullición durante un minuto retirándole del fuego. Agregar el cloranfenicol. Cerrar la boca del matraz con un tapón de algodón y gasa, proteger el tapón con un sombrero hecho de papel y pegarle un trozo de cinta testigo. Esterilizar en autoclave a 121°, 15 libras y 15 minutos. Sacar el matraz del autoclave y dejar que se enfríe un poco a temperatura ambiente, posteriormente, servir cerca del mechero 30 ml en cada caja Petri (26)

*** Crecimiento en presencia de ciclohexamida al 0.1%**

Base de nitrógeno para levaduras.....10 g
 Dextrosa.....10 g
 Ciclohexamida.....0.1 %
 Agua destilada.....1000 ml

Medir volumen del agua en probeta, separar 10 ml y el resto agregarlo a un matraz. Los mililitros que se tomaron se depositan en otro recipiente. Pesar los gramos de dextrosa, agregarlos al recipiente con agua y disolver por agitación. Pesar los gramos de base de nitrógeno para levaduras, agregarlos al matraz con agua y disolver por agitación. Esterilizar en autoclave, al mismo tiempo esterilizar tubos de vidrio 13x100 con tapón de rosca. Diluir la ciclohexamida en acetona: 20 ml de acetona por cada 0.1 g de ciclohexamida. Sacar el matraz de la autoclave, dejar enfriar a temperatura ambiente para después filtrar por una membrana de 0.45 micras la acetona con la ciclohexamida disuelta en el agua con la glucosa, agitar. Adicionar 3 ml con una pipeta estéril a cada tubo (27)

***Caldo Czapek-Dox pH 1.1 y 1.5**

Sacarosa.....30 g
 Nitrato de sodio.....3 g
 Fosfato dipotásico.....1 g
 Sulfato de magnesio.....5 g
 Sulfato ferroso.....5 g
 Cloruro de potasio.....5 g
 Agua destilada.....1000 ml

Medir el volumen requerido en una probeta, hacer el cálculo correspondiente (por cada 1000 ml de agua destilada se disuelven 35 g del medio deshidratado) y vaciar en dos matraces para cambiar el pH de 7.3 a

1.1 y 1.5, utilizando el potenciómetro. Servir 5 ml en tubos de bioquímica y esterilizar por filtración (26)

***Agar Czapek-Dox adicionado con 1% de tween 80**

Czapek-Dox.....50 g

Tween 80.....1%

Agua destilada.....1000 ml

Medir volumen en probeta y vaciar a matraz, pesar los gramos correspondientes de cada ingrediente y agregarlos, calentar con agitación constante hasta el punto de ebullición durante un minuto retirándole de la flama. Cerrar la boca del matraz con un tapón de algodón y gasa, proteger el tapón con un sombrero hecho de papel y pegarle un trozo de cinta testigo. Esterilizar en autoclave a 121°, 15 libras y 15 minutos. Sacar el matraz del autoclave y dejar que se enfríe un poco a temperatura ambiente. Cerca del mechero depositar 25 ml en cada caja Petri (26, 27)

***Agar urea**

Peptona.....1 g

Dextrosa.....1 g

Cloruro de sodio.....5 g

Fosfato monopotásico.....2 g

Urea.....20 g

Rojo de fenol.....0.012 g

Agar bacteriológico.....15 g

Agua destilada.....1000 ml

Disolver todos los ingredientes (29 g en total) en 100 ml de agua destilada. Esterilizar esta solución mediante filtración. Disolver 15 g de agar bacteriológico en 900 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave, dejar enfriar hasta los 50 o 55°C para agregar la solución

antes preparada. Mezclar bien y servir en tubos de 13x100 ml e inclinar con un ángulo de 45° para que solidifique (23)

***Fermentación de carbohidratos al 1%**

Base caldo rojo de fenol.....15 g
 Glucosa, sacarosa y lactosa.....1 g
 Agua destilada.....1000 ml

Medir el volumen en probeta, separar 10 ml y el resto agregarlo al matraz. Los ml separados se colocan en otro recipiente. Pesar los gramos del carbohidrato, agregarlos al recipiente con agua y disolver por agitación. Pesar los gramos correspondientes a la base, agregarlos al matraz con agua y disolver por agitación. Cerrar la boca del matraz con un tapón de algodón y gasa, proteger el tapón con un sombrero hecho de papel y pegarle un trozo de cinta testigo. Esterilizar en autoclave a 121°, 15 libras y 15 minutos. También mandar a esterilizar tubos de vidrio de 13x100 con tapón de rosca que en su interior tenga un tubo de Durham en posición invertida. Sacar el matraz del autoclave y dejar que se enfríe un poco a temperatura ambiente para después filtrar por una membrana de 0.45 micras el agua con la dextrosa disuelta y agitar. Con una pipeta estéril adicionar 5 ml a cada tubo de vidrio 13 x 100 con tapón de rosca hasta cubrir el tubo Durham (26, 27, 41)

***Asimilación de carbohidratos al 1%**

Base caldo rojo de fenol.....15 g
 Glucosa, sacarosa y lactosa.....1 g
 Agua destilada.....1000 ml

Medir el volumen en probeta, separa 10 ml y el resto agregarlo al matraz. Los ml separados se colocan en otro recipiente. Pesar los gramos del carbohidrato, agregarlos al recipiente con agua y disolver por agitación. Pesar los gramos correspondientes a la base, agregarlos al matraz con agua

y disolver por agitación. Cerrar la boca del matraz con un tapón de algodón y gasa, proteger el tapón con un sombrero hecho de papel y pegarle un trozo de cinta testigo. Esterilizar en autoclave a 121°, 15 libras y 15 minutos. También mandar a esterilizar tubos de vidrio de 13x100 con tapón de rosca. Sacar el matraz del autoclave y dejar que se enfríe un poco a temperatura ambiente para después filtrar por una membrana de 0.45 micras el agua con la dextrosa disuelta y agitar. Con una pipeta estéril adicionar 2 ml a cada tubo de vidrio 13 x 100 con tapón de rosca (26, 27, 41)

***Fermentación de carbohidratos al 0.5%**

Base caldo rojo de fenol.....15 g
Galactosa, maltosa, trehalosa y rafinosa.....0.5 g
Agua destilada.....1000 ml

Medir el volumen en probeta, separar 10 ml y el resto agregarlo al matraz. Los ml separados se colocan en otro recipiente. Pesar los gramos del carbohidrato, agregarlos al recipiente con agua y disolver por agitación. Pesar los gramos correspondientes a la base, agregarlos al matraz con agua y disolver por agitación. Cerrar la boca del matraz con un tapón de algodón y gasa, proteger el tapón con un sombrero hecho de papel y pegarle un trozo de cinta testigo. Esterilizar en autoclave a 121°, 15 libras y 15 minutos. También mandar a esterilizar tubos de vidrio de 13x100 con tapón de rosca que en su interior tenga un tubo de Durham en posición invertida. Sacar el matraz del autoclave y dejar que se enfríe un poco a temperatura ambiente para después filtrar por una membrana de 0.45 micras el agua con la dextrosa disuelta y agitar. Con una pipeta estéril adicionar 5 ml a cada tubo de vidrio 13 x 100 con tapón de rosca hasta cubrir el tubo Durham (26, 41)

***Asimilación de carbohidratos al 0.5%**

Base caldo rojo de fenol.....15 g
 Galáctosa, maltosa, trehalosa, rafinosa, arabinosa, xilosa, celobiosa y
 ramnosa.....0.5 g
 Agua destilada.....1000 ml

Medir el volumen en probeta, separa 10 ml y el resto agregarlo al matraz.
 Los ml separados se colocan en otro recipiente. Pesar los gramos del
 carbohidrato, agregarlos al recipiente con agua y disolver por agitación.
 Pesar los gramos correspondientes a la base, agregarlos al matraz con agua
 y disolver por agitación. Cerrar la boca del matraz con un tapón de
 algodón y gasa, proteger el tapón con un sombrero hecho de papel y pegarle
 un trozo de cinta testigo. Esterilizar en autoclave a 121°, 15 libras y
 15 minutos. También mandar a esterilizar tubos de vidrio de 13x100 con
 tapón de rosca. Sacar el matraz del autoclave y dejar que se enfríe un
 poco a temperatura ambiente para después filtrar por una membrana de 0.45
 micras el agua con la dextrosa disuelta y agitar. Con una pipeta estéril
 adicionar 2 ml a cada tubo de vidrio 13 x 100 con tapón de rosca. (26,
 41)

***Asimilación de adonitol, inositol, manitol y sorbitol al 0.5%**

Base caldo rojo de fenol.....15 g
 Adonitol, inositol, manitol y sorbitol.....0.5 g
 Agua destilada.....1000 ml

Medir el volumen en probeta, separa 10 ml y el resto agregarlo al matraz.
 Los ml separados se colocan en otro recipiente. Pesar los gramos de los
 derivados, agregarlos al recipiente con agua y disolver por agitación.
 Pesar los gramos correspondientes a la base, agregarlos al matraz con agua
 y disolver por agitación. Cerrar la boca del matraz con un tapón de
 algodón y gasa, proteger el tapón con un sombrero hecho de papel y pegarle

un trozo de cinta testigo. Esterilizar en autoclave a 121°, 15 libras y 15 minutos. También mandar a esterilizar tubos de vidrio de 13x100 con tapón de rosca. Sacar el matraz del autoclave y dejar que se enfríe un poco a temperatura ambiente para después filtrar por una membrana de 0.45 micras el agua con la dextrosa disuelta y agitar. Con una pipeta estéril adicionar 2 ml a cada tubo de vidrio 13 x 100 con tapón de rosca (23)

***Medios de conservación**

a) Agar dextrosa Sabouraud

Agar bacteriológico.....15g
 Peptona de carne o caseína.....10g
 Dextrosa.....40g
 Agua destilada.....1000 ml

Medir el volumen requerido de agua destilada en una probeta y vaciarle en un matraz de vidrio, pesar los gramos correspondientes de cada ingrediente y agregarlos al mismo matraz, calentar con agitación constante hasta el punto de ebullición durante un minuto retirándole del fuego. Con una pipeta vaciar 11 ml del medio en cada vial con tapón de rosca y 10 ml del medio en cada tubo con tapón de rosca, posteriormente cerrar sin mucha presión y colocar un trozo de cinta testigo. Esterilizar en autoclave a 121°, 15 libras y 15 minutos. Sacar de la autoclave y dejar sobre una superficie con 30 a 35° de ángulo para que se enfríen y solidifiquen (26, 27)

b) Agua destilada + glicerol al 50%

Agua destilada.....50 ml
 Glicerol.....50 ml

En una botella microbiológica colocar el agua destilada y agregar el glicerol. Esterilizar en autoclave a 121°, 15 libras y 15 minutos. Sacar de la autoclave y dejar enfriar a temperatura ambiente.