



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Caracterización de hongos unicelulares aislados de leches
normales y mastíticas, mediante pruebas bioquímicas y
moleculares

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS

P R E S E N T A

CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA

TUTOR

Ph.D. Roberto A. Cervantes Olivares

COMITÉ TUTORAL

Dra. Lourdes Villa Tanaca

Ph.D. Alejandro de la Peña Moctezuma

COLABORADOR INVITADO

Ph.D. Andrés Ducoing Watty

México, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 Jorge Antonio

*Al compañero de mi vida, mi mejor crítico y amigo,
Gracias por compartir mis triunfos y fracasos, por estar siempre presente
ayudando, apoyando, consolando, impulsando a seguir adelante.
Gracias porque juntos hemos logrado consolidar una familia y compartimos
el mejor regalo de Dios: ¡nuestra hija!
Gracias por tener la magia de hacerme sonreír y dar alegría a mi vida
Gracias una vez más por estar conmigo con todo y por todo simplemente
porque sí,
Gracias por tú amor incondicional
¡TE AMO!*

A Ana Carolina

*A mi adorada hija, mi niña, mi razón de existir, Dios me dio contigo la
mayor de las bendiciones en la vida, la cual has colmado de ilusión. Hija
gracias por tantos momentos de felicidad, por dejarme saber que eres uno de
mis mayores logros y el motivo que necesito para superarme día con día,
Gracias por tú mirada siempre llena de amor y por esos abrazos y besos que
son alimento para mí alma,
¡TE AMO!*

A mi madre

*Porque tú ejemplo ha sido la mejor de las enseñanzas, por el infinito amor y
confianza en lo que hago
Porque todo lo que soy te lo debo a ti
Por ser la fortaleza que me protege
Porque eres una GRAN MUJER y la MEJOR MAMÁ DEL MUNDO.
Porque lo que más me llena de orgullo es saberme tú hija,
¡TE AMO MAMÁ!*

A mis hermanas

*Con todo mi amor a mis adoradas hermanas: Rosa María, Patricia, Claudia
y Virginia, por todo lo que me han enseñado a lo largo de la vida que nos ha
tocado compartir, porque ante cualquier circunstancia y reto, nuestra unión
es y seguirá siendo indestructible.*

Dedicatoria y Agradecimiento

A: Cristina Escalante Ochoa.

A ti por mostrarme que la amistad es una joya preciosa que tú me has regalado sin miramientos.

Por TODO, por tú ayuda incondicional, por tú confianza ciega en mí, por tanto tiempo dedicado en la escritura y revisión de este trabajo, por tus acertadas y amables críticas, por siempre estar dispuesta a escucharme, a consolarme, a apoyarme. Gracias por estar presente aún en la distancia y por todo lo que has hecho por mí.

Con mi más sincera admiración, respeto y eterno cariño.

Carolina

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, a mi maestro, Ph.D. Roberto A. Cervantes Olivares, por la eterna confianza, por el apoyo e impulso para seguir adelante, por todas sus enseñanzas y por compartir conmigo sus conocimientos guiándome sabiamente en el estudio de los hongos.

A la Dra. Lourdes Villa Tanaca, una vez más por todo lo que me has dejado aprender de ti, por seguir confiando, por tu apoyo, y sobretodo por tu amistad.

Al Ph.D. Alejandro de la Peña Moctezuma, por el aliento y el apoyo para emprender y finalizar este objetivo en mi vida académica.

Al Ph.D. Andrés Ducoing Watty, por su tiempo, por su apreciable ayuda, por su infinita paciencia, por la confianza que me brindo desde el inicio y hasta el final de este proyecto, ¡MILLONES DE GRACIAS!.

Al apreciable jurado: Dr. Jorge Tórtora Pérez, Dra. Ma. De los Angeles Martínea, Dra. Lourdes Villa Tanaca, Ph.D. Alejandro de la Peña-Moctezuma, Ph.D. Roberto A. Cervantes Olivares, les agradezco profundamente sus observaciones y sugerencias, así como el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A mis valiosísimos alumnos Cecy, Andira, Chucho, Ale y David, por su valiosa ayuda, por su invaluable y paciente compañía, por su inquebrantable confianza en mí, por compartir los momentos de alegría y tristeza, por sus manos siempre firmes donde pude apoyarme, por hacer tan grato mi trabajo en el laboratorio y sobre todo por su amistad ¡Muchas gracias!.

A Sarai, por tu gran ayuda y apoyo en los primeros experimentos.

A Jorge Antonio Godoy Portillo por su apoyo en la obtención de los antimicóticos.

A los integrantes del laboratorio de Leptospira y Vacunología por el apoyo brindado para la realización de los experimentos en el presente trabajo, en especial al Dr. Francisco Basurto Alcántara, Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma, Dr. Armando Rodríguez Reyes, M en C. Rodrigo Mena Bañuelos.

Al Dr. Rigoberto Hernández ¡Mil gracias! Porque tu ayuda fue fundamental para finalizar este proyecto, por compartir tan amablemente tu tiempo y conocimientos.

A la Dra. Laura Cobos Marín y MVZ. Esp. Cristina Rodríguez Sánchez por su ayuda y las facilidades otorgadas en sus respectivos laboratorios.

A mis grandes amigos por apoyarme y siempre tener una palabra de aliento, Enrique Salas, Ivonne Aubert, Elvia Lazo.

A mi familia, por su cariño, por su compañía: Mario, Alberto, Ma. Fernanda, Daniel, Valeria, Joshuá, Diego, Damaris.

A los que crecieron mi familia: Julia, Jorge, Juan Carlos, Sonia Erika, Ma. Elena, Francisco, Thalia, Jorge Francisco, Karla, Andrés.

A todos los que de una u otra forma participaron en el desarrollo de este trabajo.

La sustentante recibió beca del CONACYT (No. de registro 151676)

El presente proyecto de investigación fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN 216703.

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
Índice de cuadros	i
Índice de figuras	ii
Resumen	iii
Summary	iv
1. Introducción	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Identificación de levaduras	5
1.2.1 Identificación tradicional	5
1.2.1.1 Criterios principales y pruebas para la identificación de levaduras	6
1.2.1.2 Sistemas comerciales para la identificación de levaduras y microorganismos relacionados (<i>P.zopfi</i>)	10
1.2.2 Identificación molecular	13
1.3 Pruebas de susceptibilidad a antimicóticos	18
2. Objetivo	22
3. Materiales y métodos	23
3.1 Colección de muestras de leche	23
3.2 Aislamiento	23
3.3 Identificación tradicional	24
3.3.1 Características macroscópicas	24
3.3.2 Características microscópicas	24
3.3.3 Criterios bioquímicos	26
3.4 Conservación de las levaduras aisladas	28
3.5 Pruebas de susceptibilidad a antifúngicos	28
3.5.1 Preparación de soluciones de antifúngicos	29
3.5.2 Preparación del inóculo	29
3.5.3 Desarrollo de la prueba de susceptibilidad a antimicóticos	30
3.5.4 Análisis estadístico de los datos	30

3.6	Caracterización molecular	30
3.6.1	Obtención del ADN de levaduras	31
3.6.2	Electroforesis de ADN en gel de agarosa	32
3.6.3	Cuantificación del ADN	32
3.6.4	RAPD (Polimorfismo del ADN amplificado al azar)	32
3.6.4.1	Iniciadores	32
3.6.4.2	Amplificación al azar del ADN por PCR (RAPD-PCR)	33
3.6.4.3	Análisis de los datos	34
4.	Resultados	35
4.1	Aislamiento	35
4.2	Identificación bioquímica	35
4.3	Pruebas de susceptibilidad a antifúngicos	38
4.4	Identificación molecular	49
4.4.1	Extracción de ADN	49
4.4.2	Amplificación al azar del ADN por PCR	50
4.4.2.1	RAPD-PCR para cepas ATCC	50
4.4.2.2	RAPD-PCR para aislados de <i>C. glabrata</i>	53
4.4.2.3	RAPD-PCR para aislados de <i>C. krusei</i>	56
4.4.2.4	RAPD-PCR para aislados de <i>Candida</i> spp.	61
4.4.2.5	RAPD-PCR para aislados de diferentes especies de <i>Candida</i>	64
4.4.2.6	Análisis de los resultados de las reacciones de RAPD-PCR con los iniciadores OPE y OPA 18	68
5.	Discusión	71
6.	Conclusiones	82
7.	Bibliografía	83

ÍNDICE DE CUADROS

No.	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Estudios de mastitis micótica en diferentes países	4
2	Estudios en México acerca de "mastitis micótica"	5
3	Lista de oligonucleótidos utilizados en ensayos de RAPD-PCR	16
4	Disolventes y concentraciones indicados para cada antifúngico	29
5	Mezcla de reacción para RAPD-PCR	33
6	Condiciones para la reacción de RAPD-PCR	34
7	Aislados de las muestras de leche de glándulas mamarias de bovinos sanos y con mastitis subclínica y clínica	37
8	Especies del género <i>Candida</i> aisladas con mayor frecuencia en las glándulas mamarias sanas y con mastitis subclínica y clínica	38
9	Patrones de resistencia de <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> y <i>C. albicans</i> aisladas en los grupos de estudio	39
10	Aislados y patrones de susceptibilidad de glándulas mamarias de bovinos clínicamente sanos	41
11	Aislados y patrones de susceptibilidad de glándulas mamarias de bovinos con mastitis subclínica	42
12	Aislados y patrones de susceptibilidad de glándulas mamarias de bovinos con mastitis clínica	43

13	Fragmentos obtenidos con los iniciadores OPE 18 y OPA 18 para las cepas de referencia mediante RAPD-PCR	50
14	Especies de <i>Candida</i> que presentaron bandas en la reacción de RAPD-PCR con los oligonucleótidos OPE 18 y OPA 18.	52
15	Grupos de bandas de aislados de <i>C. glabrata</i> con OPE 18	53
16	Grupos de bandas de aislados de <i>C. glabrata</i> con OPA 18	53
17	Grupos de bandas de aislados de <i>C. krusei</i> con OPE 18	57
18	Grupos de bandas de aislados de <i>C. krusei</i> con OPA 18	57
19	Patrones de bandas de <i>Candida</i> spp. con OPE 18	61
20	Patrones de bandas de <i>Candida</i> spp. con OPA 18	61
21	Patrones de bandas de diferentes especies de <i>Candida</i> con OPE 18	65
22	Patrones de bandas de diferentes especies de <i>Candida</i> con OPA 18	67

INDICE DE FIGURAS

No.	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Identificación tradicional de levaduras y microorganismos relacionados (<i>Prototheca zopfii</i>)	12
2	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>C. glabrata</i>	45
3	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>C. krusei</i>	46
4	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>C. albicans</i>	46
5	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>C. norvegica</i>	47
6	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>C. zeylanoides</i>	47
7	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>C. viswanathii</i>	48
8	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>P. zopffii</i>	48
9	Patrón de susceptibilidad de aislados de <i>Candida</i> spp.	49
10	Gel de agarosa de ADN cepas de referencia	50
11	RAPD-PCR de cepas de referencia	51
12	RAPD-PCR de <i>C. glabrata</i> con OPE 18	54
13	RAPD-PCR de <i>C. glabrata</i> con OPA 18	55

ÍNDICE DE FIGURAS

13a	RAPD-PCR de <i>C. glabrata</i> con OPA 18	56
14	RAPD-PCR de <i>C. krusei</i> con OPE 18	58
15	RAPD-PCR de <i>C. krusei</i> con OPA 18	59
15a	RAPD-PCR de <i>C. krusei</i> con OPA 18	60
16	RAPD-PCR de <i>Candida</i> spp. con OPE 18	62
16a	RAPD-PCR de <i>Candida</i> spp. con OPE 18	62
16b	RAPD-PCR de <i>Candida</i> spp. con OPE 18	63
17	RAPD-PCR de <i>Candida</i> spp. con OPA 18	63
17a	RAPD-PCR de <i>Candida</i> spp. con OPA 18	64
18	RAPD-PCR de diferentes especies de <i>Candida</i> con OPE 18	66
19	RAPD-PCR de diferentes especies de <i>Candida</i> con OPA 18	68

RESUMEN

La mayoría de los casos de mastitis se deben a la presencia de microorganismos, reconociéndose a las bacterias como los patógenos primarios en esta afección, mientras que los hongos, en particular las levaduras, son consideradas generalmente como patógenos secundarios u oportunistas. El impacto de la mastitis micótica en la producción de ganado lechero, sin embargo, se ha visto incrementado en la última década en diversas partes del mundo. En México, actualmente no se conocen con precisión cuales son las levaduras presentes en esta afección en bovinos. El objetivo de este trabajo fue determinar e identificar la presencia de levaduras en glándulas mamarias tanto de bovinos sanos como bovinos con mastitis subclínica y clínica. Se trabajaron 1,095 muestras de leche, siendo aisladas y caracterizadas por métodos tradicionales en un 26.02% (285/1,095) de estos casos levaduras. Se identificaron principalmente (99.3%) diferentes especies del género *Candida* siendo *C. glabrata* y *C. krusei* las especies aisladas con mayor frecuencia en las muestras de bovinos sanos y con mastitis clínica. Se utilizó la prueba de RAPD-PCR como una herramienta molecular de identificación, se utilizaron los iniciadores, OPE 18 y OPA 18, siendo OPE 18 el que permitió agrupar de forma más eficiente los diferentes genotipos generados por las especies de levaduras aisladas, en particular *C. glabrata* y *C. krusei*. Se realizaron, así mismo, pruebas de susceptibilidad a antimicóticos como otro parámetro fenotípico de identificación, específicamente hacia fluconazol, itraconazol, anfotericina B,

5 fluorocitosina y nistatina. Los patrones de susceptibilidad/resistencia, apoyaron la identificación de *C. glabrata* y *C. krusei*, especies que tienen una resistencia intrínseca al fluconazol. Este estudio es uno de los primeros que se realizan en México y permite tener un panorama más amplio acerca de las diferentes levaduras presentes tanto en glándulas mamarias sanas como en glándulas mamarias con mastitis.

SUMMARY

In most cases of mastitis due to the presence of microorganisms, bacteria are recognized as the primary pathogens while fungi, particularly yeasts, are mainly considered secondary pathogens or opportunistic organisms. However, the impact that mycotic mastitis has on the dairy cattle production has increased during the last decade in several countries around the world. In Mexico, nowadays it is not known accurately which are the yeasts affecting cattle. The aim of this study was to determine and identify the yeasts present in the mammary gland of healthy dairy cattle as well as of dairy cattle affected with clinical and subclinical mastitis. 1,095 milk samples were analyzed from which yeasts were isolated and identified by traditional methodologies in the 26.02% (285/1,095) of them. 99.3% of the isolates were identified as different species of the genus *Candida*, being *C. glabrata* and *C. krusei* the most frequently recognized species from all the study groups. RAPD-PCR was used as an auxiliary molecular tool to confirm the traditional methodologies of identification. The primers OPE 18 y OPA 18 were therein utilized, being OPE 18 the one that allowed a more efficient grouping of the different genotypes found, in particular for *C. glabrata* and *C. krusei*. Susceptibility tests to antimycotics were also done as another identification phenotype parameter. For this means, fluconazole, itraconazole, amphotericin B, 5-flucytosine and nystatin were used. The profile of susceptibility/resistance found sustained the identification of *C. glabrata* y *C. krusei*, species which have an intrinsic resistance to fluconazol. This

study is one of firsts studies of its kind in Mexico. The features found through it give a wider panorama on the different yeasts present in the mammary gland, both healthy and with mastitis, in dairy cattle.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria que se produce como respuesta al daño causado por microorganismos y sus toxinas, por traumas físicos o agentes químicos irritantes, esta afección en el ganado lechero es la principal causa de pérdidas en la producción y calidad de la leche, repercutiendo en importantes mermas económicas ¹.

La mayoría de los casos de mastitis se deben a la presencia de microorganismos, se reconoce a las bacterias como los patógenos primarios en esta afección, mientras que los hongos, en particular las levaduras, son considerados patógenos secundarios u oportunistas. La presencia de las levaduras puede verse favorecida de manera general por: a) el uso y abuso constante de antibacterianos utilizados ya sea como medidas de prevención o tratamiento, b) el uso de material y equipo contaminado en el proceso de ordeño y c) lesiones en la glándula mamaria. En la práctica veterinaria las levaduras están relacionadas con el 2 al 3% del total de los casos observados de infecciones intramamarias. Aún cuando la mayoría de los casos son leves y las drogas antimicóticas han sido usadas en el tratamiento de mastitis por levaduras, no hay una evidencia clara de la efectividad de esta terapia dando como resultado el desecho del animal afectado ^{1,2,3,4}.

En bovinos se han reportado una variedad de hongos filamentosos y levaduriformes presentes en casos de mastitis, tales como: *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *Penicillium* spp, *Mucor* spp,

Rhizopus spp, *Cephalosporium* spp, *Coccidioides* spp, *Histoplasma* spp, *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula* spp, *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Torulopsis* spp y *Trichosporum* spp^{5,6}. En varios países incluyendo México, las levaduras, en particular del género *Candida*, han adquirido una singular importancia, debido al incremento en su aislamiento de casos de mastitis subclínica y clínica^{3,7,8}.

Entre los estudios realizados a nivel mundial sobre mastitis micótica clínica, se encuentran los realizados en 1993 en Brasil por Costa *et al.*⁹ quienes identificaron a *Cryptococcus neoformans* y especies de *Candida*, mientras que en 1994 en Dinamarca Aalbaek *et al.*⁸ aislaron principalmente especies del género *Candida* y al alga *Prototheca zopfii*. Para 1995, Elad *et al.* en Israel,¹⁰ sugirieron a *C. krusei* como causante de mastitis micótica, mientras que Lagneau *et al.* en 1996 en Bélgica¹¹ reportaron a *C. kefyr*, *C. catenulata* y *C. lambica*. Por su parte, Langoni *et al.* en 1998 en Brasil¹² caracterizaron principalmente a *C. albicans* y *C. krusei*. En 1999, en Turquía, Gunduz *et al.*⁶ así como en Polonia en el 2000 Krukowski *et al.*⁷ reportaron diferentes especies del género *Candida* además de *Rhodotorula* spp, *Geotrichum* spp y *Trichosporum* spp. Estudios recientes, realizados por Casia dos Santos *et al.*³ en Brasil en 2005 y el de Williamson *et al.*¹³ en 2007 han demostrado la presencia de especies del género *Candida*, identificando principalmente a *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. catenulata* (Cuadro 1).

Con relación a casos de mastitis micótica subclínica, en 1998 en Brasil, Costa *et al.*, aislaron diferentes especies del género *Candida* y *Cryptococcus* spp, mientras que Langoni reportó principalmente a *C. albicans* y *C. krusei*^{1,5}.

Por otra parte, entre los escasos reportes de aislamientos de levaduras a partir de leche de animales clínicamente sanos, se encuentran los de Costa *et al.* (1993) en Brasil y en Bélgica Lagneau (1996) y Ognean *et al.* (2001) quienes mencionaron los aislamientos de *Candida kefir*, *C. catenulata*, *C. lambica*, *Cryptococcus* spp, *Rhodotorula* spp, *Trichosporum cutaneum*, *Aureobasidium pullulans* y *Pichia ohmeri*^{11, 14}.

En México, los primeros estudios sobre mastitis clínica causada por hongos, son los de Stevens en 1965¹⁵ y Zavala en 1966¹⁶, quienes aislaron principalmente hongos filamentosos como *Geotrichum* spp, *Aspergillus* spp, *Cephalosporium* spp, *Fusarium* spp, *Mucor* spp, *Penicillium* spp y *Rhizopus* spp. Lagunes y Brewer en 1974¹⁷ identificaron *Geotrichum*. Por su parte, Murillo en 1978¹⁸ identificó las siguientes levaduras: *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. kefir*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces* spp y *Rhodotorula* spp. En 1996, Félix *et al.*¹⁹ identificaron en muestras de leche de vacas con mastitis subclínica y clínica diferentes especies del género *Candida*, siendo *Candida guilliermondii* predominante en el primer grupo y *C. albicans* en el segundo. Otras especies encontradas en ambos grupos de estudio fueron *C. kefir*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. norvegensis* (Cuadro 2).

Cuadro 1. Estudios de mastitis micótica en diferentes países

Año	País	Autor	Tipo de mastitis	Aislados
1993	Brasil	Costa <i>et al.</i>	Clínica	<i>C. neoformans</i> , <i>Candida</i> spp.
			Sanos	<i>C. kefir</i> , <i>C. catenulata</i> <i>C. lambica</i> , <i>Cryptococcus</i> spp., <i>Rhodotorula</i> spp., <i>Trichosporum cutaneum</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Pichia ohmeri</i>
1994	Dinamarca	Aalbaek <i>et al.</i>	Clínica	<i>Candida</i> spp., <i>P. zopfii</i>
1995	Israel	Elad <i>et al.</i>	Clínica	<i>C. krusei</i>
1996	Bélgica	Lagneau <i>et al.</i>	Clínica	<i>C. kefir</i> , <i>C. catenulata</i> , <i>C. lambica</i>
			Sanos	<i>C. kefir</i> , <i>C. catenulata</i> , <i>C. lambica</i> , <i>Cryptococcus</i> spp., <i>Rhodotorula</i> spp., <i>Trichosporum cutaneum</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Pichia ohmeri</i>
1998	Brasil	Langoni <i>et al.</i>	Clínica	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i>
			Subclínica	
		Costa <i>et al.</i>	Subclínica	<i>Candida</i> spp., <i>Cryptococcus</i> spp.
1999	Turquía	Gunduz <i>et al.</i>	Clínica	<i>Candida</i> spp., <i>Rhodotorula</i> spp., <i>Geotrichum</i> spp., <i>Trichosporum</i> spp.
2000	Polonia	Krukowski <i>et al.</i>		
2001	Bélgica	Ognean <i>et al.</i>	Sanos	<i>Candida kefir</i> , <i>C. catenulata</i> , <i>C. lambica</i> , <i>Cryptococcus</i> spp., <i>Rhodotorula</i> spp., <i>Trichosporum cutaneum</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Pichia ohmeri</i>
2005	Brasil	Casia <i>et al.</i>	Clínica	<i>C. krusei</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. catenulata</i>
2007		Williamson <i>et al.</i>		

Cuadro 2. Estudios en México acerca de "mastitis micótica"

Año	Autor	Tipo de mastitis	Aislados
1965	Stevens	Clínica	Filamentosos
1966	Zavala		Filamentosos
1974	Lagunas y Brewer		<i>Geotrichum</i> spp.
1978	Murillo		Levaduras
	Torres <i>et al.</i>		Filamentosos
1991	Rojano <i>et al.</i>		<i>C. guilliermondii</i> <i>Rhodotorula</i> spp.
1996	Félix <i>et al.</i>	Subclínica	<i>C. guilliermondii</i> <i>C. kefyi</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. norvegensis</i>
		Clínica	<i>C. albicans</i> <i>C. kefyi</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. norvegensis</i>

1.2 Identificación de levaduras

1.2.1 Identificación tradicional

Las levaduras son un grupo heterogéneo de hongos unicelulares, que se reproducen por fisión, gemación o una combinación de ambas. Las levaduras en su reproducción sexual desarrollan ascosporas o basidiosporas, mientras que en la reproducción asexual desarrollan blastoconidios. La identificación tradicional de estos hongos se basa en una combinación de criterios morfológicos útiles para establecer el género y criterios bioquímicos que permiten la diferenciación de especies ^{20,21}.

1.2.1.1 Criterios principales y pruebas para la identificación de levaduras

a) Características del cultivo

El medio de aislamiento por excelencia para la identificación de levaduras es el agar dextrosa Sabouraud (ADS), en el cual las colonias de levaduras suelen ser circulares, ligeramente abombadas o planas, de consistencia cremosa que se vuelve más pastosa a medida que envejecen, lisas o rugosas con olor dulce^{20,21,22}.

Una colonia de aspecto y consistencia mucóide sugiere la formación de cápsulas y puede ser el paso inicial para la identificación de *Cryptococcus neoformans*. Las colonias de color rojo-anaranjado o naranja, de aspecto cremoso o rugoso, son características de las especies del género *Rhodotorula*, color que manifiesta esta levadura por su riqueza en pigmentos carotenoides. El género *Candida* presenta colonias cremosas y de color blanco, otros microorganismos que presentan colonias similares a los de este género son las especies de algas aclorofílicas del género *Prototheca*²².

Por lo general, las colonias de levaduras no desarrollan micelio aéreo, aunque en ocasiones pueden aparecer prolongaciones en la periferia de las colonias. Si se observa un micelio aéreo definido, debe considerarse la posibilidad de que se trate de un hongo filamentoso o de ciertas especies de levaduras que pueden formar micelio verdadero como *Trichosporum* spp o *Blastoschizomyces* spp^{20,21,22}.

b) Estructuras asexuales

La formación de estructuras asexuales como blastoconidios, artroconidios, pseudohifas, clamidoconidios y tubos germinales, constituyen características morfológicas de gran importancia para la identificación de algunas especies de levaduras.

La hifa es la unidad estructural de los hongos; puede ser unicelular como las levaduras (blastoconidio) o pluricelular tomando la forma de filamento septado o aseptado (cenocítico). La presencia de esta estructura puede dar origen a artroconidios que son fragmentaciones de la hifa. La presencia de artroconidios puede indicar que los hongos a identificar se tratan de los géneros *Geotrichum*, *Trichosporum* y *Blastoschizomyces*, aunque estos dos últimos también pueden presentar blastoconidios.

Los blastoconidios, que se reproducen por gemación unilateral o multilateral, miden de 2 a 5 μm por 3 a 7 μm y son de forma esférica o alargada. Estas células pueden estar solas, en pares o en cadenas (pseudohifas). La presencia de pseudohifas y blastoconidios, indican que la levadura a identificar pertenece a alguna especie del género *Candida*.

Los clamidoconidios son estructuras de resistencia, redondos u ovals, de 6-12 μm de diámetro y pared gruesa, que pueden ser por su localización laterales, intercalares o terminales en el micelio. Su formación es característica y diagnóstica en el caso de *C. albicans* ^{20, 21, 22}. Otra estructura que presenta *C. albicans* es el tubo germinal, el cual en condiciones *in vitro* se forma por una extensión del blastoconidio sin estrechamiento en su origen y sin desprenderse de la célula original, cuyo

ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre ²². La formación del tubo germinal es útil para diferenciar a *C. albicans* del resto de las especies de *Candida*. Sólo *C. albicans* es capaz de producir verdaderos tubos germinales en dos horas. Sin embargo, hay que tomar en consideración que otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a los tubos germinales pero con una zona de constricción característica adyacente a la célula madre. Es importante, así mismo, el conocer que aproximadamente un 5% de cepas de *C. albicans* no forman tubos germinales, y que se pueden tener falsos negativos en esta prueba cuando se utiliza un inóculo abundante de levaduras ^{20, 21, 22}.

c) Presencia o ausencia de estructuras sexuales

Una de las esporas de reproducción sexual útiles en la identificación de las levaduras son las ascosporas, que se encuentran contenidas en un asca o saco y que dependiendo del género de levadura involucrado, se producen de 2 a 16. Algunas levaduras pueden formar ascosporas en el medio de aislamiento primario, mientras que otras requieren de medios especiales como el agar extracto de malta o agar preparado con jugo V8 ^{21, 23, 24}.

d) Características bioquímicas y fisiológicas

Las propiedades fisiológicas y bioquímicas de las levaduras permiten la diferenciación de especies ²⁵ (Figura 1). Algunas de las más utilizadas se mencionan a continuación:

Asimilación y fermentación de carbohidratos.

Estas pruebas proveen de una base bioquímica definitiva para la determinación de género y especie de levaduras ²⁵

Producción de ureasa. La producción de esta enzima es una característica utilizada principalmente para la identificación de *C. neoformans*. El agar urea usado en esta prueba contiene rojo de fenol, el cual sirve como un indicador de la reacción alcalina que resulta cuando la urea es desdoblada por acción de la enzima ureasa y se produce amonio ²⁶.

Sensibilidad a 0.1% de ciclohexamida. Esta prueba es utilizada en la identificación de algunas especies del género *Candida* que son sensibles a este quimioterapéutico, como: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, en contraste, *C. albicans* y *C. guilliermondii* no son sensibles a la ciclohexamida ²⁵.

Producción de película en caldo Sabouraud. Algunas especies de *Candida* producen una película característica y gas en caldo Sabouraud. El uso primario de esta prueba es para diferenciar *C. krusei* y *C. tropicalis* de otras especies comunes de *Candida* ²⁶.

Tolerancia a pH ácido. Esta es una prueba que se realiza principalmente para diferenciar a *C. albicans* de otras especies. La prueba se desarrolla a pH's que van de 1.1 a 1.9. *C. albicans* puede desarrollarse adecuadamente desde pH= 1.1 hasta pH= 1.9, mientras que las demás especies del género lo hacen a partir de pH= 1.5 ²⁶.

Desarrollo a 37°C y otras temperaturas. Las cepas de levaduras se desarrollan bien a temperaturas entre 20 y 28°C. Las levaduras provenientes de mamíferos requieren de temperaturas de 35-37°C para su desarrollo adecuado ^{20, 21, 25}.

1.2.1.2 Sistemas comerciales para la identificación de levaduras y microorganismos relacionados (*P. zopfi*)

Los sistemas comerciales para la identificación de levaduras se pueden clasificar de acuerdo a la capacidad de estos microorganismos en llevar a cabo:

a) La asimilación de carbohidratos

En estos medios se puede detectar la asimilación de al menos 20 carbohidratos, dependiendo del sistema que se utilice, existen métodos semiautomatizados como el Auxacolor (Bio-Rad), Uni-Yeast-Tek (Remel), API 20C AUX (bioMérieux), Galería ID32C (bioMérieux) y Sistema Vitek (bioMérieux). Otros automatizados como Sistema Biolog YT MicroPlate (Biolog) y Rapid Yeast Identification Panel MicroScan (Dade Behring) ^{20, 22}.

b) La actividad enzimática

Un avance importante en la identificación de las levaduras son los medios diferenciales. Al ser el género *Candida* uno de los más aislados en muestras clínicas, estos medios han sido diseñados principalmente para el aislamiento e identificación de algunas especies de esta levadura a partir de un cultivo obtenido a 30-37°C de 24 a 48 h ²². El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato,

por ejemplo la actividad de la N-acetil-galactosaminidasa (NAGasa) y la L-prolina aminopeptidasa cuyos sustratos son el 4-metilumbeliferil-N-acetil-B-D-galactosaminida y el 4-metilumbeliferil-N-acetil galactosaminida prolina-p-nitroanilida, respectivamente ^{21, 22}.

Los medios diferenciales permiten detectar la hidrólisis de un compuesto específico del medio debido a la acción enzimática de las levaduras mediante cambios en el medio mismo. Así, estos medios se clasifican en fluorogénicos, cuando se originan compuestos fluorescentes, y cromogénicos, cuando los cambios en el medio de cultivo producen colonias con un color característico.

Los medios cromogénicos, son los más utilizados porque no necesitan luz ultravioleta para la observación de las colonias y porque pueden identificar un número mayor de especies que los fluorogénicos, algunos ejemplos son CHROMOagar Candida (CHROMagar), Cromogen Albicans (Biomedics), Candida ID (bioMérieux), Albicans ID2 (bioMérieux) y CandiSelect (bioMérieux). Algunos ejemplos de medios fluorogénicos son Fluoroplate Candida (Merck), Agar SDCA-MUAG (Biolife) y BactiCard Candida (Remel) ^{20, 27}.

Estos sistemas en conjunto con estudios morfológicos proporcionan un resultado confiable de identificación para levaduras ²⁰. Sin embargo, puede ocurrir una identificación incompleta debido a que existen levaduras no incluidas en los sistemas que se basan en la asimilación de carbohidratos y en la detección de actividad enzimática ²⁸.

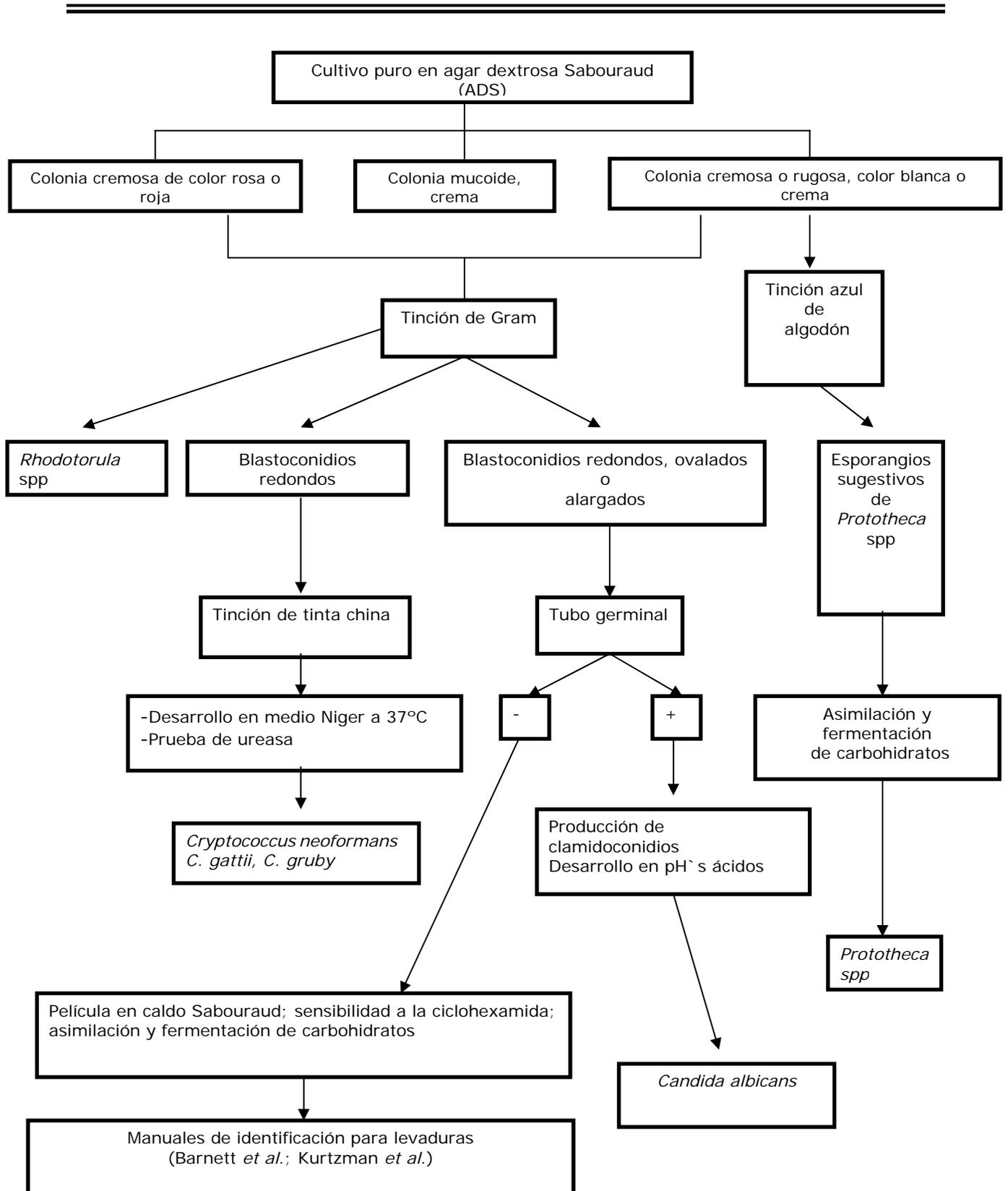


Figura 1. Identificación tradicional de levaduras y microorganismos relacionados (*Prototheca zopfii*) (adaptado de 20,21).

1.2.2 Identificación molecular

La identificación tradicional de levaduras, en general, requiere de alrededor de 100 pruebas para obtener una identificación aceptable de género y especie y con frecuencia se necesitan de 1 a 3 semanas para un resultado final ²⁹. En años recientes, se han desarrollado métodos estandarizados para apoyar en la identificación, sin embargo, estos métodos pueden identificar sólo de 40 a 60 especies de diferentes géneros de levaduras. Debido a las dificultades tanto de sensibilidad como de especificidad y el tiempo prolongado en la realización de las técnicas microbiológicas tradicionales, y con la finalidad de evitar ambigüedades y simplificar los métodos de identificación de levaduras se han desarrollado durante la última década diversas técnicas en el campo de la biología molecular ³⁰. El aspecto más interesante de estas técnicas reside en su gran especificidad, que permite la identificación de hongos poco frecuentes o que no producen las estructuras morfológicas utilizadas habitualmente en la clasificación ²⁷.

Los métodos moleculares de identificación de levaduras, se basan en el estudio de las moléculas de ADN, ARN o proteínas. En levaduras se iniciaron con el estudio de complementariedad del ADN nuclear, determinándose la existencia de relaciones coespecíficas entre cepas cuyos caracteres fisiológicos y morfológicos considerados determinantes para discernir entre especies eran diferentes, por ejemplo, el género *Torulopsis*, que carece de pseudohifas, es coespecífico con *Candida* que sí

las forma; *Hansenula*, que asimila el nitrato, es coespecífico de *Pichia*, que no lo asimila ³¹.

Entre los métodos para la identificación del género *Candida* basados en la variación genética se encuentran: el análisis de diferencias cariotípicas electroforéticas y polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción genómica (RFLPs) usando electroforesis en gel e hibridación ADN-ADN, respectivamente. El análisis cariotípico-electroforético ha progresado en el desarrollo de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), que resuelve fragmentos de ADN de más de 50 kb sometidos a un campo que alterna su dirección de migración dentro de la matriz de agarosa. Las variaciones cariotípicas electroforéticas, han diferenciado muestras de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei*. Se ha informado de un alto nivel de discriminación entre especies de *Candida* usando PFGE, lo que sugiere que el enfoque puede ser de valor en la tipificación de especies del género *Candida*. Una versión modificada de PFGE, que es capaz de aumentar la resolución de las bandas de ADN de gran tamaño, es la electroforesis de campo eléctrico homogéneo (CHEF), que se realiza con ADN previamente embebido en agarosa. Esto es para evitar una excesiva manipulación y prevenir así la ruptura de los grandes fragmentos de ADN que se analizan. Las grandes moléculas de ADN son separadas con base en su afinidad para realinearse a través de los poros de agarosa produciéndose un patrón más agudo y distintivo. Los patrones producidos permiten la cariotipificación

electroforética del genoma de varias levaduras incluyendo *C. albicans* y otras especies de *Candida*.

El análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) provee una alternativa a la cariotipificación electroforética. El ADN extraído es digerido en fragmentos por enzimas de restricción del ADN antes de la separación en el gel de electroforesis. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei* pueden ser caracterizadas por digestión con *EcoRI*, generando distintos patrones^{29, 31}.

Por otro lado, se ha propuesto utilizar las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 para la identificación rápida de levaduras y otros tipos de hongos, tomando en consideración que las regiones ITS2 de éstos son específicas de cada especie. Para estos ensayos se ha utilizado PCR en combinación con inmunoensayos enzimáticos (EIA) y enzimas de restricción (RFLP) que permitan detectar los productos de amplificación obtenidos^{28, 29}.

Con respecto a los ensayos de RAPD, éstos se utilizan para estudios taxonómicos³², y como auxiliares en la identificación de cepas cuando los métodos fenotípicos muestran inconsistencias^{32, 33}, siendo una herramienta molecular útil para la discriminación de diferentes especies de *Candida*³⁴.

Steffan *et al.* en 1997 propusieron un RAPD-PCR para identificar 10 de las especies más frecuentes de *Candida*, utilizando los iniciadores CX5 y el PST (Cuadro 3), en donde cada una de las especies estudiadas generó de uno a cuatro fragmentos. Cada huella genética resultó característica y específica para cada especie estudiada de *Candida*³³. En 2003

Bautista *et al.* reportaron un ensayo directo, fácil, estable y repetible de RAPD-PCR para la identificación de nueve especies patógenas de *Candida* de relevancia clínica, donde utilizaron tres diferentes iniciadores, OPE-04, OPA-18 y OPE-18 (Cuadro 3). Con esta metodología se obtuvieron patrones consistentes, únicos de cada especie ³⁵. Campos *et al.* ³⁶ en 2004 utilizaron cinco oligonucleótidos OPA 1, OPA2, OPA3, OPA4 Y M13 (Cuadro 3) para la identificación de especies de *Candida* de relevancia clínica, en particular de aislados de *Candida* en los cuales no se logró la identificación de especies por métodos bioquímicos ³⁶.

Cuadro 3. Lista de oligonucleótidos y secuencias utilizados en ensayos de RAPD-PCR

Autor	Oligonucleótido	Secuencia
Steffan <i>et al.</i> , 1997	CX5	5´ACACTGCTTC 3´
	PST	5´CAGTTCTGCAG 3´
Bautista <i>et al.</i> , 2003	OPE-4	5´GTGACATGCC 3´
	OPA-18	5´AGCTGACCGT 3´
	OPE-18	5´GGACTGCAGA 3´
Campos <i>et al.</i> , 2004	OPA-1	5´CAGGCCCTTC 3´
	OPA-2	5´TGCCGAGCTG 3´
	OPA-3	5´AGTCAGCCAC 3´
	OPA-4	5´AGTCAGCCAC 3´
	M13	5´GAGGGTGGCGGTTCT 3´
Torres-Rodríguez <i>et al.</i> , 2004	CN1	5´TACCCCGCCCATATTCCAT 3´
	5sor	5' ATGGGAATACGACGTGCTGTAG 3´
	C1	5' ACGGTACACT 3´
	C3	5´GTTTCCGCCCC 3´

Otra técnica molecular empleada es el PCR en tiempo real que permite una cuantificación del número de moléculas del genoma diana que se encuentran en la muestra. La elevada sensibilidad del método y la posibilidad de cuantificación, han facilitado el establecer criterios de valoración para descartar falsos positivos por contaminación, así como apoyar en la diferenciación de colonización e infección por *Candida*³⁷.

Por otro lado, las secuencias Multilocus (MLST) han ido ganando aceptación como una herramienta para explorar las diferencias entre cepas y esta técnica ha sido usada para la tipificación de bacterias patógenas y de algunos hongos patógenos, incluyendo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*. Los datos de las secuencias multilocus pueden ser usados no solamente para analizar identidad y recombinación de poblaciones de cepas entre especies también proveen de una evidencia de diferenciación de niveles de cepas. Un análisis genético de 416 aislados de *C. albicans* con datos de MLST mostraron que las especies podían ser divididas dentro de algunas clases y que esas clases difieren en las proporciones de los aislados considerando diferencias geográficas y localización anatómicas. Una base de datos de MLST que incluye 1000 aislados de *C. albicans*, con una distribución geográfica y localización anatómica conocidas ha permitido observar eventos de recombinación genética, así como explorar los mecanismos de microdiversidad en *C. albicans*³⁸.

Para *C. neoformans* se han realizado una serie de estudios utilizando RAPD-PCR^{39, 40}, para la caracterización de aislamientos de esta levadura, siendo el trabajo realizado por Torres-Rodríguez *et al.*⁴¹ uno de los más actuales, donde caracterizaron aislados de *C. neoformans* mediante RAPD, utilizando cuatro diferentes iniciadores: CN1, 5sor, C1 y C3 (Cuadro 3). Los resultados obtenidos permitieron agrupar las cepas con perfil electroforético idéntico en dos diferentes patrones genotípicos que han sido denominados A y B⁴¹.

1.3 Pruebas de susceptibilidad a antimicóticos

En los últimos 20 años se ha observado un aumento progresivo de infecciones sistémicas por hongos, siendo estas infecciones una causa importante de letalidad, principalmente en pacientes inmunodeprimidos⁴². En humanos y animales se reconocen a varios hongos como causantes de infección. Sin embargo, el género *Candida* es el que se aísla con mayor frecuencia de procesos infecciosos, siendo las drogas antimicóticas más efectivas contra especies de este género los azoles (fluconazol, itraconazol) y los polienos (nistatina, anfotericina B)⁴³. El surgimiento creciente de levaduras resistentes es un fenómeno esperado ya que el tratamiento con estos antimicóticos es realizado por períodos prolongados. Este fenómeno se ha observado principalmente en cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei*⁴².

El fluconazol es el antimicótico que se usa con mayor frecuencia por su eficacia en el tratamiento de infecciones superficiales y sistémicas por hongos. Sin embargo, un número de especies de *Candida* son ahora

reconocidas como poseedoras de una resistencia intrínseca *in vitro* a esta droga, como es el caso de *C. krusei*, *C. inconspicua* y *C. norvegensis*, las dos últimas de reciente asociación con infecciones en humanos. *C. glabrata* también puede desarrollar resistencia a fluconazol. Especies como *C. dubliniensis* y *C. tropicalis* han mostrado la adquisición de resistencia a fluconazol seguido de una exposición *in vitro* a esta droga. Aunque no de manera concluyente, varios estudios han sugerido que la introducción y el uso de nuevas drogas azólicas como el itraconazol y fluconazol pueden haber contribuido de manera significativa a la selección y aparición de cepas y especies de *Candida* con una reducida susceptibilidad a estos agentes ^{43, 44}.

El desarrollo de resistencia al fluconazol es un proceso complejo en el cual intervienen diversos factores, tanto del huésped como del microorganismo. Entre los factores dependientes del microorganismo figuran mecanismos celulares y moleculares. Dentro de los primeros destacan: sustitución de la población sensible de *C. albicans* por otra especie (*C. krusei*, *C. glabrata*) o aislamiento de *C. albicans* más resistente; alteraciones genéticas que dan lugar al desarrollo de resistencia temporal en presencia del antifúngico (resistencia epigenética); y por último alteraciones en la población fúngica (microevolución). Entre los mecanismos moleculares de resistencia a los azoles hasta ahora descritos en *Candida* están: a) alteraciones en la enzima blanco (14- alfa-esterol desmetilasa, derivadas tanto de la sobre expresión de los genes que la codifican (*erg11*) como de mutaciones

concretas en éstos (las mutaciones en *erg11* originan sustituciones en aminoácidos, disminuyendo con ello la afinidad de la enzima por los azoles), b) alteración en otras enzimas de la ruta biosintética del ergosterol y c) sistemas de bombeo activos del antifúngico al exterior de la célula, que impiden la acumulación intracelular del fármaco ^{45, 46}.

La anfotericina B, agente poliénico usado desde los años 1950, es una droga antimicótica con una baja incidencia en el desarrollo de resistencias en pruebas clínicas. La resistencia a la anfotericina B es poco común en la mayoría de las especies de *Candida*, o bien, siendo descritos raramente aislados de *C. albicans* resistentes a este fármaco. Recientes evidencias sugieren, sin embargo, que una proporción de aislados de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae* pueden exhibir resistencia a este agente ^{43, 47}.

Por lo que se refiere a la 5-fluorocitosina, la cual actúa impidiendo la síntesis del ADN del hongo al convertirse en fluorouracilo por la acción de la enzima citosín desaminasa ⁴⁸, los índices de resistencia para este antimicótico varían del 5 al 50% dependiendo de las especies de *Candida* ⁴⁹. Esta resistencia puede presentarse en aislados de *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. parasilopsis* ^{47, 50}.

En casos de mastitis en bovinos causadas por *Candida*, se ha reportado que las levaduras aisladas son sensibles *in vitro* a nistatina, anfotericina B y 5-fluorocitosina. Estos agentes, sin embargo, pueden frecuentemente causar daño a la glándula mamaria durante el tratamiento. Estudios *in vitro* indican que el 96% de levaduras del género *Candida* aisladas de

casos de mastitis fueron sensibles al clotrimazol, 65% a ketoconazol y nistatina; mientras que menos del 50% fueron sensibles al miconazol, anfotericina B y 5-fluorocitosina ⁵¹.

En los últimos años, se han estandarizado varias técnicas para la detección de resistencia *in vitro*, que muestran cierta correlación con la evolución clínica de los pacientes. Por esta razón es importante conocer el perfil de sensibilidad de las cepas clínicas y el espectro de acción de los antifúngicos.

2. OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar las levaduras presentes en la leche de ganado bovino clínicamente sano y con problemas de mastitis.

Objetivos específicos.

1. Caracterizar los patrones bioquímicos de las levaduras obtenidas de muestras de leche de bovinos clínicamente sanos, y con mastitis subclínica y clínica.
2. Caracterizar las levaduras aisladas con base en sus patrones de RAPD-PCR.
3. Determinar los patrones de susceptibilidad a antimicóticos de las levaduras aisladas.
4. Establecer grupos de relación entre el estado clínico del animal, la caracterización bioquímica, los patrones de susceptibilidad y de RAPD-PCR.

3. MATERIAL Y MÉTODOS**3.1 Colección de muestras de leche**

Se colectaron 1,095 muestras de leche de vacas mayores de 24 meses de la raza Holstein-Friesian, alojadas en sistemas de producción intensiva de los estados de México, Querétaro, Hidalgo, Puebla y Distrito Federal. Se obtuvieron 342 muestras de glándulas mamarias sanas, 383 de mastitis subclínica y 370 de mastitis clínica. El estado clínico de las glándulas se determinó mediante la prueba de California ⁵² y el examen clínico. El muestreo se llevó a cabo antes del ordeño, lavando la ubre con jabón, secando y desinfectando con yodo al 3% o alcohol al 70%, y volviendo a secar. Se colectaron 15 ml de leche en recipientes estériles con tapón de rosca. Las muestras se mantuvieron en refrigeración y se trasladaron al laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para su procesamiento.

3.2 Aislamiento

Las muestras de leche se incubaron a 25°C durante 15 min. para liberar a los microorganismos de las partículas grasas de la leche. Se adicionaron 0.5 ml de la leche a un tubo conteniendo 4.5 ml de caldo dextrosa Sabouraud (Bioxon) pH 3.5, incubando a 37°C durante 10 días. Al final de la incubación, 50 µl del cultivo fueron sembrados en una placa con agar dextrosa Sabouraud (Bioxon), adicionado con 50 µg/ml de cloranfenicol (Merck). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 h ¹⁹. El desarrollo

de levaduras se confirmó aplicando la tinción de Gram a los frotis de las colonias que se desarrollaron en el agar dextrosa Sabouraud (ADS) ^{23, 53}.

3.3 Identificación morfológica-bioquímica

La identificación inicial de las levaduras se llevó a cabo tomando en cuenta las características macroscópicas de su desarrollo (colonias abombadas, planas, de consistencia lisa, rugosa, cremosa o mucoide, pigmentación) ^{21,22} y sus características microscópicas ^{23, 53}.

Los datos obtenidos fueron analizados con una distribución Xi cuadrada con el uso del paquete JMP software, version 5.1.

3.3.1 Características macroscópicas

a) Desarrollo en agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol. Este medio de cultivo fue utilizado para el primoaislamiento y purificación de las levaduras aisladas de las muestras de leche. La siembra en este medio de cultivo se realizó por estría continua o cultivo puro, según se requiera, las placas se incubaron a 37°C de 24-48 hrs.

3.3.2 Características microscópicas

a) Tinción de Gram. Esta tinción se utilizó para la observación de la forma y tamaño de las levaduras. Las levaduras por la composición de su pared celular, retienen el cristal violeta y tienen una reacción tintorial de Gram positivas. Se preparó un frotis y fue fijado con calor, la preparación se cubrió con la solución de cristal violeta durante un minuto y se lavó con agua. Posteriormente, el frotis se cubrió con lugol por un minuto y nuevamente se lavó con agua. Se decoloró con alcohol-acetona y se lavó rápidamente con agua adicionando la solución de fucsina y/o safranina y

dejando actuar por un minuto, se lavó con agua, se secó al aire y se observó con el objetivo de inmersión (100X) ²³.

b) Formación de tubo germinal

En 0.5 ml de suero de equino se adicionó una asada del cultivo levaduras y se incubó por 2 horas a 37°C. Una gota de esta suspensión fue colocada en un portaobjetos limpio cubriéndola con un cubreobjetos.

La observación al microscopio se realizó con el objetivo seco fuerte (40X) ⁵³.

c) Formación de clamidoconidios. Los clamidoconidios fueron inducidos a su formación en Agar Harina de Maíz y Agar Czapek Dox, ambos adicionados con 1% de Tween 80 ⁵³.

Las técnicas utilizadas para sembrar estos medios, fueron:

Técnica de picadura

Con el asa en forma de "L" se tomó una pequeña asada de la colonia de levaduras y se sembró rasgando el agar en el centro y a lo largo de la caja. La incubación se realizó a 30°C, revisando las cajas diariamente durante 5 días al microscopio con el objetivo 10X para observar el desarrollo de los clamidoconidios.

Técnica de "sándwich"

En un portaobjetos limpio y desengrasado se vaciaron de 4-5 ml del medio a utilizar, dejando solidificar. Una asada de las colonias de levaduras se sembró sobre la superficie en estría, al final se cubrió con otro portaobjetos limpio y desengrasado. La incubación se realizó a 30°C,

revisando las cajas diariamente durante 5 días al microscopio con el objetivo 10X para observar el desarrollo de los clamidoconidios⁵⁴.

3.3.3 Criterios bioquímicos

La identificación incluyó: sensibilidad a 0.1% de ciclohexamida, formación de película y producción de gas en caldo Sabouraud, tolerancia a pH ácido, producción de ureasa, así como, asimilación y fermentación de carbohidratos^{25, 55}.

a) Sensibilidad a 0.1% de ciclohexamida. Esta prueba se realizó en medio líquido de YNB (yeast nitrogen base- Difco) con adición de ciclohexamida (Sigma) a una concentración final de 0.1 % (p/v).

De un cultivo de levaduras con 24 horas de desarrollo, se preparó un inóculo en 5 ml de SSF al 0.85% ajustando con el tubo 0.5 de McFarland. Se tomaron 0.5 ml y se inocularon en 2 ml de una solución con 0.1% de ciclohexamida. La incubación se realizó a 30°C, registrando la lectura a partir de las 24 hrs y hasta 7 días. La presencia de turbidez indicó resistencia a este quimioterapéutico, la ausencia de turbidez indicó sensibilidad al mismo^{25,55}.

b) Producción de película en caldo Sabouraud. Se utilizaron 2 ml de caldo dextrosa Sabouraud en tubos de ensaye estériles preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una asada de las levaduras de 24 horas de desarrollo se inoculó por agitación en el caldo Sabouraud, incubando a 37°C durante 24-48 hrs. La formación de la película se observa en la superficie del caldo y en las paredes del tubo. La formación de burbujas al agitar el tubo indican la producción de gas²⁶.

c) Tolerancia a pH ácido. Tubos de ensaye con 2 ml de caldo Czapek Dox (Bioxon) se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El pH (1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.9) se ajustó con una solución de HCl (Acido clorhídrico) 1 N. Una asada de las levaduras de 24 horas de desarrollo se inocularon por agitación en el caldo Czapek Dox, incubando a 37°C de 24-48 hrs. La turbidez en el medio indicó desarrollo y la ausencia de turbidez indicó no desarrollo ⁵⁴.

d) Producción de ureasa. Se utilizaron 2 ml de caldo urea (Bioxon) en tubos de ensaye estériles preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una asada de las levaduras de 24 horas de desarrollo se inoculó por agitación en el caldo urea, incubando a 37°C de 24-48 hrs. En una reacción positiva el medio cambia a color rosa fuerte, indicando la producción de ureasa, en caso contrario el medio permanece del mismo color (amarillo claro) ⁵³.

e) Asimilación y fermentación de carbohidratos. Se utilizaron 2 y 5 ml de caldo rojo de fenol en tubos de ensaye estériles para asimilación y fermentación respectivamente, preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las soluciones de carbohidratos al 10% fueron preparadas en agua destilada estéril y esterilizadas por filtración. La adición del carbohidrato en el caldo rojo de fenol, se realizó considerando una concentración final de 1% para glucosa, sacarosa, lactosa y maltosa y 0.5 % para galactosa, melobiosa, celobiosa, xilosa, rafinosa, rhamnosa y trehalosa.

A los tubos para las pruebas de fermentación se les colocó un tubo invertido (tubo de Durham) ^{25, 55, 56}.

De un cultivo de levaduras con 24 horas de crecimiento, se preparó un inóculo en 5 ml de SSF al 0.85% ajustando con el tubo 0.5 de McFarland (1.5×10^8 levaduras/ml). Se tomaron 200 μ l de esta suspensión y se inocularon a cada uno de los carbohidratos de prueba. La incubación se realizó a 37°C durante 7 días. Para las pruebas de asimilación, una reacción positiva fue considerada con el cambio de color de medio rojo a amarillo y turbidez, mientras que en una reacción negativa el medio no cambió de color y no hay desarrollo. En las pruebas de fermentación, una fermentación positiva tuvo dos variantes: a) ácido-gas, con cambio de color del medio a amarillo y burbujas dentro del tubo de Durham, b) ácido, el medio cambia a color amarillo sin burbujas. En una fermentación negativa, el medio permanece de color rojo y no se observan burbujas ^{25, 55, 56}.

3.4 Conservación de las levaduras aisladas.

Las levaduras aisladas se conservaron a corto plazo (tres meses) en agar Dextrosa Sabouraud a 4°C, a mediano plazo (un año) en agua deionizada estéril a 4°C y a largo plazo en glicerol al 25% a -20 y -70°C (más de un año) ⁵⁷.

3.5 Pruebas de susceptibilidad a antifúngicos

En las pruebas de susceptibilidad, se utilizaron cinco antifúngicos: nistatina (Nutrer), itraconazol (Nutrer), fluconazol (Nutrer), anfotericina B (Sigma) y 5-fluorocitosina (Sigma). El procedimiento se realizó de acuerdo

al método de microdilución descrito por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio método M27-A de Estados Unidos ⁵⁸.

3.5.1 Preparación de soluciones de antifúngicos.

Las soluciones de antifúngicos se prepararon utilizando los disolventes y las concentraciones recomendados por la CLSI (Cuadro 4).

Cuadro 4. Disolventes y concentraciones indicados para cada antifúngico

Antifúngico	Disolvente	Conc. mínima µg/ml	Conc. máxima µg/ml
Fluconazol	Agua	0.062	64
Anfotericina B	DMSO*	0.015	16
5-Fluorocitosina	Agua	0.062	64
Nistatina	DMSO	0.01	18
Itraconazol	DMSO	0.015	16

* DMSO= Dimetilsulfóxido

Estas soluciones se almacenaron en volúmenes de 1 ml en tubos Eppendorf a -20°C hasta su uso ⁵⁸.

3.5.2 Preparación del inóculo

A partir de un cultivo de levaduras con 24 horas de desarrollo, se preparó un inóculo en 5 ml de SSF al 0.85% ajustando con el tubo 0.5 de McFarland, obteniendo una suspensión de levaduras de 0.5 a 1 x 10⁶ células por ml.

Se realizó una dilución 1:100 en medio líquido de RPMI (In Vitro), seguida de una dilución 1:20 en el mismo medio. La concentración final del inóculo fue de 5 x 10² a 2.5 x 10³ células/ml ⁵⁸.

3.5.3 Desarrollo de la prueba de susceptibilidad a antimicóticos

Se utilizó una modificación del método de microdilución en caldo. Se adicionaron 100 μ l de medio líquido de RPMI en cada pozo de una microplaca estéril de 96 pozos. En cada uno de los pozos de la columna 1 se adicionaron 100 μ l de la solución del antifúngico de prueba realizando diluciones dobles, donde la columna 1 contenía la concentración máxima del antifúngico (64, 18 ó 16 μ g/ml) y la columna 11 la concentración más baja (entre 0.062 ó 0.015 μ g/ml). Se adicionaron 100 μ l de la suspensión de levaduras (5.0×10^2 a 2.5×10^3 células/ml) en cada pozo de la fila que correspondía para cada aislado de prueba (p.ej. fila A aislado 1, fila B, aislado 2, fila C aislado 3, etc). La columna 12 fue utilizada para los controles, donde el control de desarrollo contenía 100 μ l de medio estéril libre de droga y 100 μ l del inóculo. El control de medio contenía 200 μ l de medio estéril libre de droga y de inóculo. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 hrs. La lectura visual se llevó a cabo a las 24 y 48 hrs ⁵⁸.

3.5.4 Análisis de la información

Los datos obtenidos en las pruebas de susceptibilidad fueron analizados con el paquete estadístico JMP (SAS Ins Inc., 1989-2003) Versión 5.1, generando tablas de contingencia, para estimar la relación de las especies identificadas, estado sanitario y patrones de susceptibilidad.

3.6 Caracterización molecular

Posterior a la identificación tradicional, los aislados fueron caracterizados mediante la técnica de RAPD-PCR ³⁵.

3.6.1 Obtención del ADN de levaduras

Se obtuvo el ADN de cuatro cepas de referencia del género *Candida*: *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22014 y *C. glabrata* (Instituto Pasteur de París), así como de los 285 aislados provenientes de las muestras de leche.

Las levaduras se incubaron en 10 ml de medio YEPD (2% de peptona, 2% de dextrosa, 1% de extracto de levadura) a 37°C durante 24 horas en agitación. El paquete celular se obtuvo por centrifugación a 2,000 xg durante 10 min a 4°C. Las células y 200 µl de regulador de lisis (Tritón X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, pH8 y EDTA 1mM) se transfirieron a un microtubo de 1.5 ml, se agregaron 200 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25: 41:1). Se mezcló el tubo por inversión y se incubó a 65°C durante una hora. Posteriormente, se adicionaron 200 µl de regulador TE (Tris 10 mM, pH 8.0, EDTA 1mM) y se centrifugó a 15,000 xg durante 5 min a 4°C. La purificación del ADN total se realizó a partir del sobrenadante por precipitación con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C por 20 min o hasta la aparición de un precipitado. Se centrifugó a 15,000 xg durante 5 min a 4°C, se decantó y dejó evaporar el etanol residual a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en 400 µl de regulador TE y se adicionaron 10 µg/ml de RNAsa incubando a 37°C durante 15 min. La precipitación del ADN se realizó con 10 µl de acetato de amonio 4M y 1 ml de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se dejó a - 20°C por 20 min o hasta la aparición de un precipitado. Nuevamente se centrifugo a 15,000 xg durante 5 min a 4°C, se decantó y dejó

evaporar el etanol residual a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en 50 µl de agua inyectable estéril ⁵⁹.

3.6.2 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

El ADN se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1% en regulador TAE 1X (Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1mM) adicionado con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Las condiciones de electroforesis fueron 45 min. a 80 V. La visualización del ADN se realizó colocando el gel en un transiluminador de luz ultravioleta y su presencia se registró en un procesador de imágenes (Kodak mod. Gel Logia 200).

3.6.3 Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN obtenido de las levaduras se determinó con un biofotómetro (Eppendorf) utilizando una dilución 1:100 del ADN en agua inyectable y registrando las lecturas obtenidas del coeficiente A_{260}/A_{280} .

3.6.4 RAPD (Polimorfismo del ADN amplificado al azar)

3.6.4.1 Iniciadores

El ensayo molecular se realizó para las cepas de referencia de *Candida*; *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22014 y *C. glabrata* (Instituto Pasteur de París) y para 274 aislados de levaduras del género *Candida* provenientes de leche de bovinos clínicamente sanos y con mastitis subclínica o clínica.

Los iniciadores utilizados para amplificar al azar el ADN fueron el OPE-18 (5´GGACTGCAGA 3´) y el OPA-18 (5´AGCTGACCGT 3´) ⁶⁰, los cuales han sido utilizados en ensayos de RAPD por ser específicos de especies de

Candida, como es el caso de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*³⁵.

3.6.4.2 Amplificación al azar del ADN por PCR (RAPD-PCR)

Se utilizó el ADN de las cepas de referencia y de los aislados de diferentes especies de *Candida* obtenidos de las muestras de leche.

Las mezclas de reacción se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l (Cuadro 5).

Cuadro 5. Mezcla de reacción para RAPD-PCR

Reactivo	Cantidad
MgCl	2 mM
dNTPs	200 μ M
Iniciadores	0.4 μ M
Taq ADN polimerasa	1.2 U
Regulador enzimático	1X
ADN molde	10 ng

El ADN fue amplificado con cada uno de los dos iniciadores mencionados y aplicando 38 ciclos de amplificación. Para la realización de la PCR se utilizó un termociclador (Techne mod.TC-412). Las condiciones de amplificación se muestran en el Cuadro 6³⁵.

Cuadro 6. Condiciones para la reacción de RAPD-PCR

Ciclo	Condición	
	°C	t min
desnaturalización inicial	94	5
desnaturalización	94	1
alineamiento	36	1
extensión	72	2
extensión final	72	5
ciclos	38	

De la reacción de PCR, 5 μ l fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.3% en regulador TAE 1X y adicionado con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio. Las condiciones de electroforesis fueron de 70 volts durante 1:30 hrs y fue documentado mediante una fotografía utilizando un digitalizador Kodak. El tamaño de las bandas obtenidas de los productos de PCR se determinó usando el programa Molecular Imaging ASoftware (Kodak) versión 4.0.2., usando como referencia el marcador de talla molecular de ADN de 1 Kb (Fermentas).

3.6.4.3 Análisis de la información

Con los tamaños de los fragmentos de ADN amplificado al azar se elaboró una matriz de presencia-ausencia de bandas con el programa Microsolft Excell. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa estadístico JMP (SAS Ins Inc., 1989-2003) Versión 5.1.

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento

De las 1,095 muestras de leche analizadas, se aislaron levaduras en el 26.02% (285/1,095) de los casos, de las muestras de leche de bovinos sanos se aislaron 23.09% (79/342), 8.87% (34/383) de bovinos con mastitis subclínica y 46.48% (172/370) de bovinos con mastitis clínica. En el análisis estadístico no se encontró una distribución homogénea de las levaduras aisladas en los tres grupos de glándulas mamarias evaluadas ($p < 0.05$).

4.2 Identificación bioquímica

Con la metodología tradicional utilizada para la identificación de las levaduras aisladas ($n=285$) se identificaron 20 especies del género *Candida*. Las especies encontradas con mayor frecuencia en los diferentes grupos de estudio fueron *C. glabrata* con un 30.17% (86/285) y *C. krusei* con un 26.66% (76/285) (Cuadro 7).

De las muestras de leche de glándulas mamarias sanas se aislaron levaduras en un 23.09% (79/342), de las cuales un 22.80% (78/342) pertenece al género *Candida* y un 0.29% (1/342) al género *Rhodotorula*. Se identificaron 12 especies de *Candida*, predominantemente *C. glabrata* en un 59.49% (47/79) seguida de *C. krusei* en un 10.12% (8/79) y *C. viswanathii* en un 7.59% (6/79) (Cuadro 8). El 8.86% (7/79) de los aislados se identificaron como *Candida* spp.

Con respecto a las muestras de leche de glándulas mamarias con mastitis subclínica, se obtuvieron aislados de *Candida* tan sólo en el 8.87% (34/383) de los casos, siendo identificadas 13 especies. Las especies aisladas con mayor frecuencia fueron *C. zeylanoides* en un 8.82% (3/34), *C. krusei* y *C. albicans*, cada uno en un 5.88% (2/34). De este grupo, 44.11% (15/34) se identificaron como *Candida* spp.

De las muestras de leche de glándulas mamarias con mastitis clínica, se aisló a *Candida* en el 43.54% (165/379), encontrándose 13 especies de este género, entre las cuales *C. krusei* en un 40% (66/165), *C. glabrata* en un 23.63% (39/165), *C. albicans* en un 5.45% (9/165), 15.15% (25/165) de los aislados fueron consideradas *Candida* spp. En este grupo se aisló asimismo a *Prototheca zopffii* en un 1.84% (7/379) de las muestras analizadas.

Otras especies del género *Candida* aisladas en este estudio fueron: *C. norvegica*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. intermedia*, *C. clausenii*, *C. lusitaniae*, *C. macedoniensis*, *C. brumptii*, *C. slooffii*, *C. lambica*, *C. cantarelli*, *C. incommunis* y *C. lipolytica* con una frecuencia global menor a 1.75% ($\leq 5/285$).

Cuadro 7. Aislados de las muestras de leche de glándulas mamarias de bovinos sanos y con mastitis subclínica y clínica

Especies de <i>Candida</i>	Estado sanitario de las glándulas mamarias			Frecuencia de aislamiento	
	Sanos n = 342	Mastitis subclínica n = 383	Mastitis clínica n = 370	n	%
<i>Candida glabrata</i>	47	0	39	86	30.17
<i>Candida krusei</i>	8	2	66	76	26.66
<i>Candida albicans</i>	0	2	9	11	3.85
<i>Candida zeylanoides</i>	2	3	2	7	2.45
<i>Candida norvegica</i>	1	1	5	7	2.45
<i>Candida viswanathii</i>	6	1	0	7	2.45
<i>Prototheca zopfii</i>	0	0	7	7	2.45
<i>Candida keyfir</i>	1	0	4	5	1.75
<i>Candida guilliermondii</i>	1	1	3	5	1.75
<i>Candida tropicalis</i>	1	1	3	5	1.75
<i>Candida parasilopsis</i>	0	0	3	3	1.05
<i>Candida intermedia</i>	1	0	2	3	1.05
<i>Candida claussenii</i>	0	1	1	2	0.7
<i>Rhodotorula spp.</i>	1	0	0	1	0.35
<i>Candida lusitaniae</i>	0	0	2	2	0.7
<i>Candida macedoniensis</i>	1	1	0	2	0.7
<i>Candida brumptii</i>	0	2	0	2	0.7
<i>Candida slooffii</i>	1	1	0	2	0.7
<i>Candida lambica</i>	0	0	1	1	0.35
<i>Candida cantarelli</i>	0	1	0	1	0.35
<i>Candida lipolytica</i>	1	0	0	1	0.35
<i>Candida incommunis</i>	0	1	0	1	0.35
<i>Geotrichum spp.</i>	0	1	0	1	0.35
<i>Candida spp.</i>	7	15	25	47	16.49
TOTAL	79	34	172	285	100

Cuadro 8. Especies del género *Candida* aisladas con mayor frecuencia en las glándulas mamarias sanas y con mastitis subclínica y clínica.

Estado sanitario glándulas mamarias	Aislados género <i>Candida</i> %	<i>C. glabrata</i> %	<i>C. krusei</i> %	<i>C. albicans</i> %	<i>C. zeylanoides</i> %	<i>C. viswanathii</i> %
Sanas	22.80 (78/342)	59.49 (47/79)	10.12 (8/79)	0	2.53 (2/79)	7.59 (6/79)
Subclínicas	8.87 (34/383)	0	5.88 (2/34)	5.88 (2/34)	8.82 (3/34)	2.94 (1/34)
Clínicas	43.54 (165/379)	23.63 (39/165)	40 (66/165)	5.45 (9/165)	1.21 (2/165)	0

4.3 Pruebas de susceptibilidad a antifúngicos.

Se realizaron pruebas de susceptibilidad a los 285 aislados obtenidos de las muestras de leche. De las glándulas mamarias sanas, los aislados de *C. glabrata* presentaron una resistencia del 6.38% (3/47) 5-fluorocitosina (5-fluorocitosina), 63.83% (30/47) a nistatina, 93.62% (44/47) a anfotericina B (anfotericina B), 95.74% (45/47) a fluconazol e itraconazol. Los aislados de *C. krusei* presentaron una resistencia de 37.5%(3/8) a 5-fluorocitosina, 75% (6/8) a fluconazol, itraconazol y nistatina, y 87.5% (7/8) a anfotericina B (Cuadro 9). Los aislados de *C. viswanathii* presentaron una resistencia del 66.66% (4/6) a itraconazol y anfotericina B, y 100% (6/6) a nistatina. Con respecto a los aislados de *Candida* spp., presentaron resistencia del 14.29% (1/7) a 5-fluorocitosina, 28.57% (2/7) a fluconazol, itraconazol y anfotericina B, y 57.14% (4/7) a nistatina (Cuadro 10).

Cuadro 9. Patrones de resistencia de *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. albicans* aisladas en los grupos de estudio.

Especie de <i>Candida</i>	Antimicótico	Sanos	Subclínicos	Clínicos
		%	%	%
<i>C. glabrata</i>	5FC	6.38	S/A	5.13
	Nist	63.83	S/A	79.5
	Anf B	93.62	S/A	69.2
	Flu	95.74	S/A	92.3
	Itra	95.74	S/A	92.3
<i>C. krusei</i>	5FC	37.5	50	36.36
	Nist	75	50	74.2
	AnfB	87.5	50	92.4
	Flu	75	50	93.94
	Itra	75	50	77.27
<i>C. albicans</i>	5FC	S/A	0	0
	Nist	S/A	100	100
	Anf B	S/A	0	77.7
	Flu	S/A	100	11
	Itra	S/A	100	55.5

Donde: 5-fluorocitosina = 5-fluorocitosina; Nist = nistatina; Anfotericina B = anfotericina B; Flu = fluconazol; Itra= Itraconazol; S/A = sin aislamiento

Con respecto a las glándulas mamarias con mastitis subclínica, los aislados de *C. krusei*, presentaron resistencia del 50% (1/2) a los cinco antimicóticos, mientras que los aislados de *C. albicans* fueron resistentes al 100% (2/2) a fluconazol, itraconazol y nistatina (Cuadro 9). Los

aislados de *C. zeylanoides* fueron resistentes al 100% a anfotericina B y nistatina. Los aislados de *Candida* spp obtenidas en este grupo de muestras, presentaron una resistencia del 20% (3/15) a 5-fluorocitosina, 26.67% (4/15) a anfotericina B, 46.67% (7/15) a itraconazol, 60% (9/15) a nistatina y 86.67% (13/15) a fluconazol (Cuadro 11).

En los aislados de levaduras provenientes de las muestras de leche de glándulas mamarias con mastitis clínica, los aislados de *C. krusei* presentaron una resistencia a 5-fluorocitosina del 36.36% (24/66), 74.24% (49/66) a nistatina, 77.27% (51/66) a itraconazol, 92.42% (61/66) a anfotericina B y 93.94% (62/66) a fluconazol. Los aislados de *C. glabrata* presentaron resistencia del 5.13% (2/39) a 5-fluorocitosina, 69.23% (27/39) a anfotericina B, 79.48% (31/39) a nistatina y 92.31% (36/39) a fluconazol e itraconazol. Los aislados de *C. albicans* presentaron resistencia del 11.11% (1/9) a fluconazol, 55.55% (5/9) a itraconazol, 77.77% (7/9) a anfotericina B y 100% (9/9) a nistatina (Cuadro 9), mientras que los aislados de *C. norvegica* presentaron resistencia del 100% a los cinco antimicóticos. Los aislados de *P. zopfii* presentaron resistencia del 14.29% (1/7) a 5-fluorocitosina, 28.57% (2/7) a itraconazol, 42.86% (3/7) a fluconazol y 100% a nistatina (Cuadro 12).

Cuadro 10. Aislados y sus patrones de susceptibilidad obtenidos de leche procedente de glándulas mamarias de bovinos clínicamente sanos

Especies de levaduras	No. de aislados (%)	Flu			Itra			Anf.B			5 FC			Nist		
		S	SDD	R	S	SDD	R	S	S	R	S	S	R	S	S	R
<i>C. glabrata</i>	47 (100)	2 (4.26)		45 (95.74)	2 (4.26)		45 (95.74)	3 (6.38)	44 (93.62)	44 (93.62)	3 (6.38)	44 (93.62)	3 (6.38)	17 (36.17)	30 (63.83)	
<i>C. krusei</i>	8 (100)		2 (25)	6 (75)		2 (25)	6 (75)	1 (12.5)	7 (87.5)	7 (87.5)	5 (62.5)	3 (37.5)	2 (25)	6 (75)		
<i>C. albicans</i>	0															
<i>C. zeylanoides</i>	2 (100)		1 (50)	1 (50)		2 (100)			2 (100)	2 (100)		2 (100)				
<i>C. norvegica</i>	1 (100)			1 (100)			1 (100)		1 (100)	1 (100)		1 (100)		1 (100)		
<i>C. viswanathii</i>	6 (100)	6 (100)			2 (33.33)	4 (66.66)		5 (83.33)	1 (16.66)	1 (16.66)	6 (100)			6 (100)		
<i>C. kefyr</i>	1 (100)	1 (100)		1 (100)	1 (100)		1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)			1 (100)		
<i>C. guilliermondii</i>	1 (100)	1 (100)			1 (100)		1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)			1 (100)		
<i>C. tropicalis</i>	1 (100)	1 (100)				1 (100)			1 (100)	1 (100)	1 (100)			1 (100)		
<i>C. parapsilosis</i>	0															
<i>C. intermedia</i>	1 (100)			1 (100)			1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)			1 (100)		
<i>C. clausenii</i>	0															
<i>C. lusitanae</i>	0															
<i>C. macedoniensis</i>	1 (100)			1 (100)			1 (100)		1 (100)	1 (100)	1 (100)			1 (100)		
<i>C. brumptii</i>	0															
<i>C. slooffii</i>	1 (100)	1 (100)			1 (100)			1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)			1 (100)		
<i>C. lambica</i>	0															
<i>C. cantarelli</i>	0															
<i>C. lipolytica</i>	1 (100)			1 (100)		1 (100)			1 (100)	1 (100)	1 (100)			1 (100)		
<i>C. incommunis</i>	0															
Especies parecidas a <i>Candida P.zopffii</i>	7 (100)	3 (42.86)	2 (28.57)	2 (28.57)	3 (42.86)	2 (28.57)	2 (28.57)	5 (71.43)	2 (28.57)	2 (28.57)	6 (85.71)	1 (14.29)	3 (42.86)	4 (57.14)		
<i>Geotrichum</i>	0															
<i>Rhodotorula</i>	1 (100)	1 (100)			1 (100)		1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)			1 (100)		

Donde: Flu= fluconazol; Itra= Itraconazol; Anf B= Anfotericina B; 5FC= 5-Fluorocitosina; Nist= Nistatina; S= Susceptibles; SDD= Susceptible Dependiente de la Dosis; R= Resistente.

Cuadro 11. Aislados y sus patrones de susceptibilidad obtenidos de leche procedente de glándulas mamarias de bovinos clínicamente sanos

Especies de levaduras	No. de aislados (%)	Flu			Itra			Anf.B			5 FC			Nist			
		S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	
<i>C. glabrata</i>	0																
<i>C. krusei</i>	2 (100)	1 (50)		1 (50)	1 (50)		1 (50)	1 (50)		1 (50)		1 (50)	1 (50)		1 (50)		1 (50)
<i>C. albicans</i>	2 (100)			2 (100)			2 (100)			2 (100)			2 (100)				2 (100)
<i>C. zeylanoides</i>	3 (100)		3 (100)					3 (100)					3 (100)				3 (100)
<i>C. norvegica</i>	1 (100)			1 (100)			1 (100)			1 (100)					1 (100)		1 (100)
<i>C. viswanathii</i>	1 (100)			1 (100)			1 (100)			1 (100)					1 (100)		1 (100)
<i>C. kefir</i>	0																
<i>C. guilliermondii</i>	1 (100)	1 (100)					1 (100)						1 (100)				1 (100)
<i>C. tropicalis</i>	1 (100)			1 (100)			1 (100)			1 (100)					1 (100)		1 (100)
<i>C. parapsilosis</i>	0																
<i>C. intermedia</i>	0																
<i>C. clausenii</i>	1 (100)			1 (100)			1 (100)						1 (100)				1 (100)
<i>C. lusitanae</i>	0																
<i>C. macedoniensis</i>	1 (100)			1 (100)			1 (100)						1 (100)				1 (100)
<i>C. brumptii</i>	2 (100)		2 (100)					1 (50)		1 (50)					2 (100)		2 (100)
<i>C. slooffii</i>	1 (100)		1 (100)				1 (100)			1 (100)					1 (100)		1 (100)
<i>C. lambica</i>	0																
<i>C. cantarelli</i>	1 (100)	1 (100)					1 (100)						1 (100)				1 (100)
<i>C. lipolytica</i>	0																
<i>C. incommunis</i>	1 (100)			1 (100)			1 (100)						1 (100)				1 (100)
Especies parecidas a <i>Candida P.zopffii</i>	15 (100)	2 (13.33)		13 (86.67)	4 (26.67)	4 (26.67)	7 (46.67)	4 (26.67)	4 (26.67)	11 (73.33)	4 (26.67)	12 (80)	3 (20)	6 (40)	9 (60)		
<i>Geotrichum</i>	1 (100)	1 (100)					1 (100)			1 (100)					1 (100)		1 (100)
<i>Rhodotorula</i>	0																

Donde: Flu= fluconazol; Itra= Itraconazol; Anf B= Anfotericina B; 5FC= 5-Fluorocitosina; Nist= Nistatina; S= Susceptibles; SDD= Susceptible Dependiente de la Dosis; R= Resistente.

Cuadro 12. Aislados y sus patrones de susceptibilidad obtenidos de leche procedente de glándulas mamarias de bovinos clínicamente sanos

Especies de levaduras	No. de aislados (%)	Flu			Itra			Anf.B			5 FC			Nist		
		S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	S	R	S	S	R
<i>C. glabrata</i>	39 (100)	3 (7.29)		36 (92.31)	2 (5.13)	1 (2.56)	36 (92.31)	12 (30.77)	27 (69.23)	37 (94.87)	2 (5.13)	8 (20.51)	31 (79.48)			
<i>C. krusei</i>	66 (100)	3 (4.55)	1 (1.52)	62 (93.94)	3 (4.55)	12 (18.18)	51 (77.27)	5 (7.58)	61 (92.42)	42 (63.64)	24 (36.36)	17 (25.76)	49 (74.24)			
<i>C. albicans</i>	9 (100)	6 (66.66)	2 (22.22)	1 (11.11)	6 (66.66)	4 (44.44)	5 (55.55)	2 (22.22)	7 (77.77)	9 (100)			9 (100)			
<i>C. zeylanoides</i>	2 (100)	1 (50)		1 (50)	1 (50)	1 (50)		1 (50)	1 (50)	2 (100)			2 (100)			
<i>C. norvegica</i>	5 (100)			5 (100)			5 (100)		5 (100)				5 (100)			
<i>C. viswanathii</i>	0															
<i>C. kefyr</i>	4 (100)	2 (50)	1 (25)	1 (25)	2 (50)	2 (50)	2 (50)	1 (25)	3 (75)	4 (100)		4 (100)				
<i>C. guilliermondii</i>	3 (100)	2 (66.66)	1 (33.33)		2 (66.66)	1 (33.33)		3 (100)		3 (100)			3 (100)			
<i>C. tropicalis</i>	3 (100)	2 (66.66)		1 (33.33)	2 (66.66)	1 (33.33)		1 (33.33)	2 (66.66)	3 (100)			3 (100)			
<i>C. parapsilosis</i>	3 (100)		2 (66.66)	1 (33.33)	1 (33.33)	2 (66.66)	2 (100)	1 (33.33)	2 (66.66)	3 (100)			3 (100)			
<i>C. intermedia</i>	2 (100)			2 (100)			2 (100)	2 (100)		2 (100)			2 (100)			
<i>C. clausenii</i>	1 (100)	1 (100)			1 (100)		1 (100)		1 (100)	1 (100)			1 (100)			
<i>C. lusitanae</i>	2 (100)	1 (50)	1 (50)		1 (50)	1 (50)		2 (100)		2 (100)		1 (50)	1 (50)			
<i>C. macedoniensis</i>	0															
<i>C. brumptii</i>	0															
<i>C. slooffii</i>	0															
<i>C. lambica</i>	1 (100)			1 (100)			1 (100)		1 (100)				1 (100)			
<i>C. cantarelli</i>	0															
<i>C. lipolytica</i>	0															
<i>C. incommunis</i>	0															
Especies parecidas a <i>Candida</i>	25 (100)	6 (24)	4 (16)	15 (60)	7 (28)	3 (12)	15 (60)	4 (26)	21 (84)	18 (72)	7 (28)	10 (40)	15 (60)			
<i>P. zopffii</i>	7 (100)	4 (57.14)		3 (42.86)	4 (57.14)	1 (14.29)	2 (28.57)	7 (100)		6 (85.71)	1 (14.29)		7 (100)			
<i>Rhodotorula</i>	0															

Donde: Flu= fluconazol; Itra= Itraconazol; Anf B= Anfotericina B; 5FC= 5-Fluorocitosina; Nist= Nistatina; S= Susceptibles; SDD= Susceptible Dependiente de la Dosis; R= Resistente.

No se observó relación significativa entre el estado sanitario de las glándulas mamarias y los patrones de susceptibilidad ($p > 0.05$). Al analizar los datos considerando sólo la identificación bioquímica y los patrones de susceptibilidad, se observó lo siguiente:

De los 86 aislados de *C. glabrata* un 5.81% (5/86) fue resistente a 5-fluorocitosina, 94.19% (81/86) a fluconazol e itraconazol, 95.35% (82/86) a nistatina, 98% (49/86) a anfotericina B (Figura 2).

Con relación a los 76 aislados de *C. krusei*, se observó resistencia del 76.32% (58/76) a itraconazol y anfotericina B, 90.79% (69/76) a fluconazol y 5-fluorocitosina, y 92.11% (70/76) a nistatina (Figura 3).

Los 11 aislados de *C. albicans* presentaron resistencia del 27.27% (3/11) a fluconazol, 63.63% (7/11) a anfotericina B y 100% a nistatina (Figura 4).

C. norvegica presentó una resistencia del 85.71% (6/7) a fluconazol, itraconazol, anfotericina B y 5-fluorocitosina (Figura 5).

Con respecto a *C. zeylanoides*, presentó resistencia del 14.29% (1/7) a itraconazol, 28.57% (2/7) a fluconazol y 5-fluorocitosina, 42.86% (3/7) a anfotericina B y 85.71% (6/7) a nistatina (Figura 6).

Los aislados de *C. viswanathii* fueron resistentes en un 14.28% (1/7) a fluconazol y anfotericina B, 71.42% (5/7) a itraconazol y 100% a nistatina (Figura 7).

P. zopffii fue resistente en un 28.57% (2/7) a itraconazol y 5-fluorocitosina, y 42.86% (3/7) a fluconazol (Figura 8).

Con respecto a los aislados de *Candida* spp., presentaron una resistencia del 17.02% (8/47) a 5-fluorocitosina, 31.91% (15/47) a anfotericina B, 51.06% (24/47) a fluconazol e itraconazol y 82.98% (39/47) a nistatina (Figura 9).

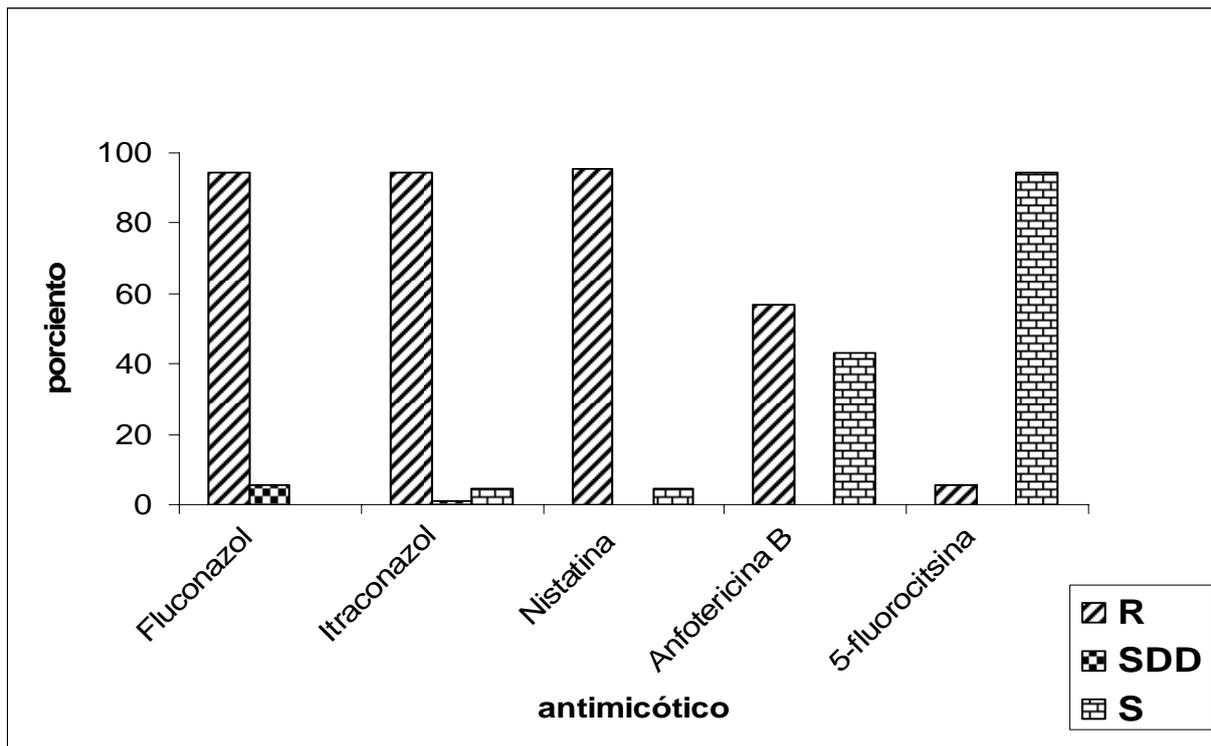


Figura 2. Patrón de susceptibilidad de aislados de *C. glabrata* (n= 86) a fluconazol, itraconazol, nistatina, anfotericina B y 5 fluorocitosina. R = resistente; SDD = susceptible dependiente de la dosis; S = susceptible

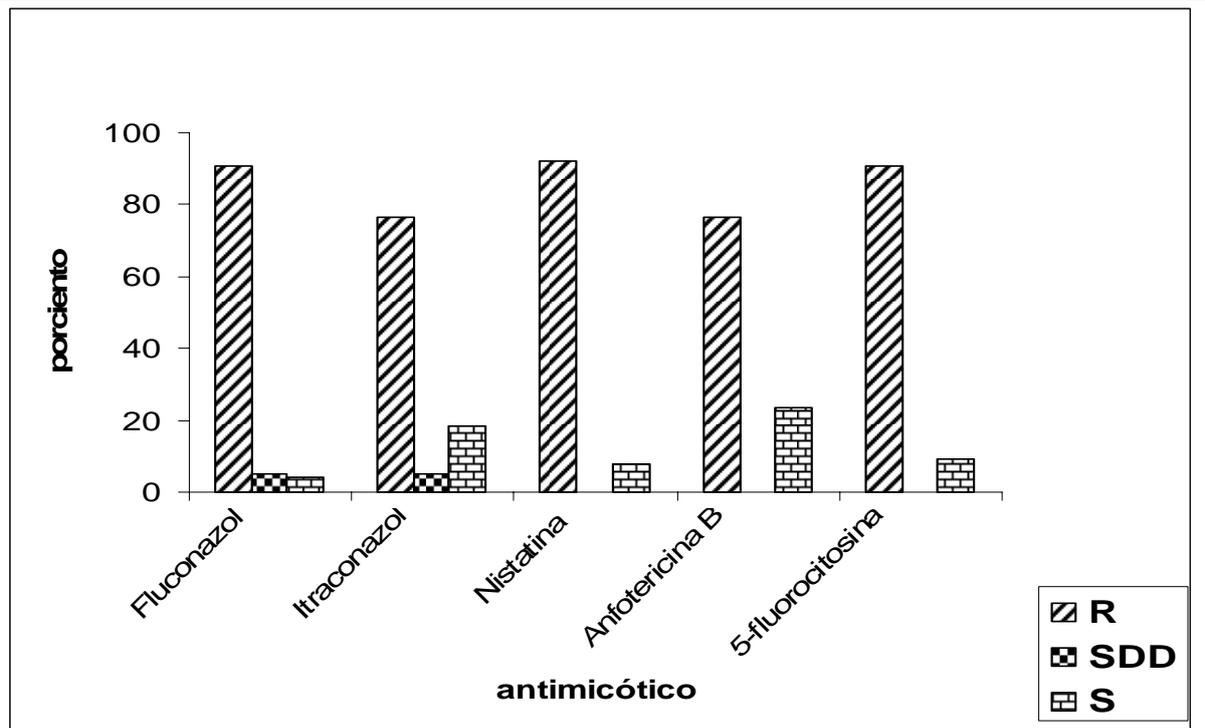


Figura 3. Patrón de susceptibilidad de aislados de *C. krusei* (n= 76) a fluconazol, itraconazol, nistatina, anfotericina B y 5 fluorocitosina. R = resistente; SDD = susceptible dependiente de la dosis; S = susceptible.

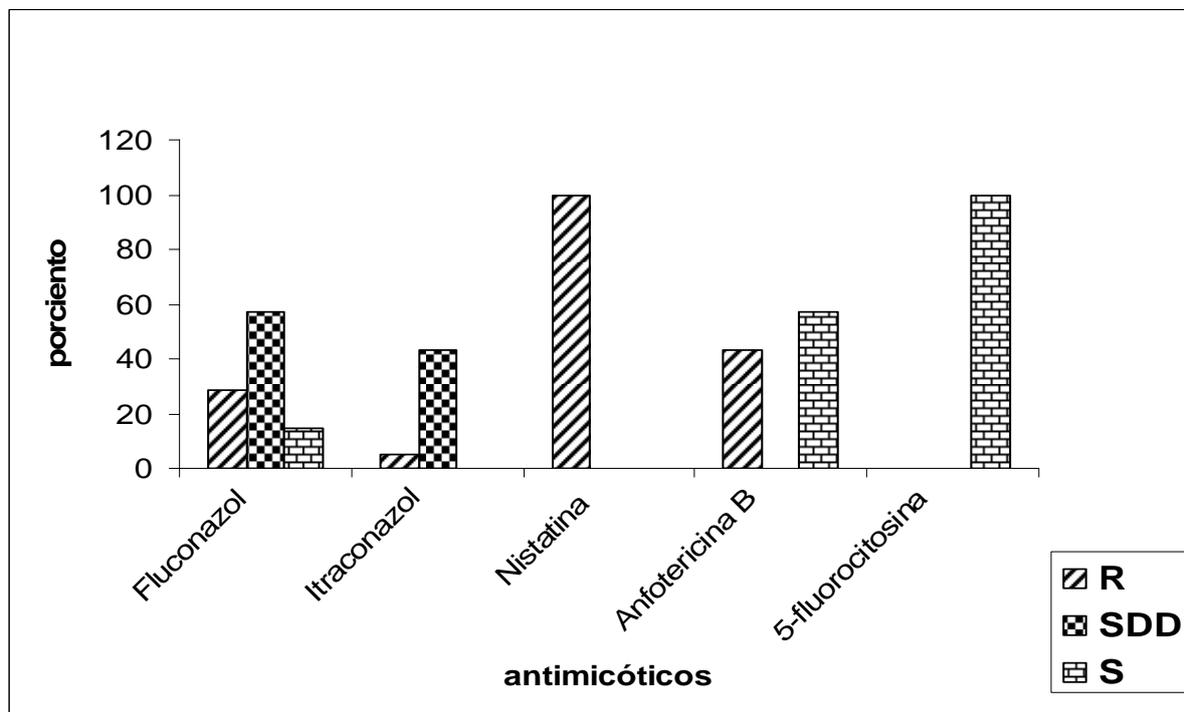


Figura 4. Patrón de susceptibilidad de aislados de *C. albicans* (n= 11) a fluconazol, itraconazol, nistatina, anfotericina B y 5 fluorocitosina. R = resistente; SDD = susceptible dependiente de la dosis; S = susceptible.

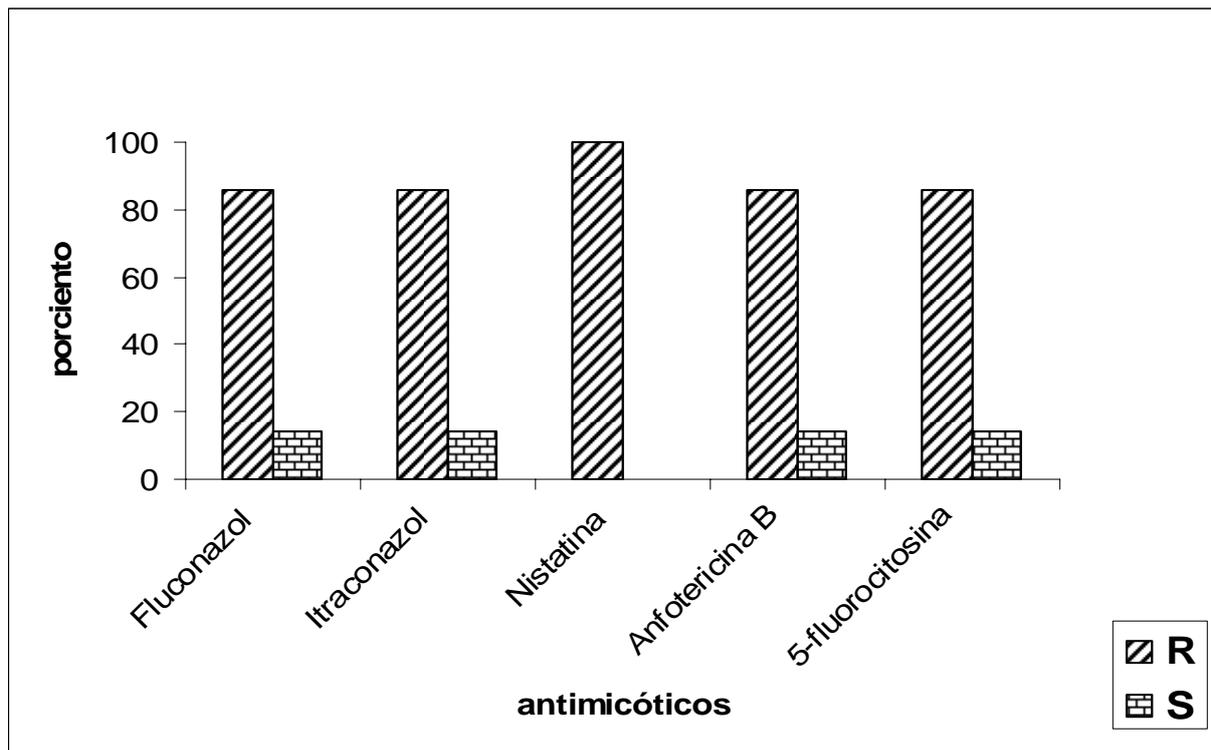


Figura 5. Patrón de susceptibilidad de aislados de *C. norvegica* (n= 7) a fluconazol, itraconazol, nistatina, anfotericina B y 5 fluorocitosina. R = resistente; SDD = susceptible dependiente de la dosis; S = susceptible.

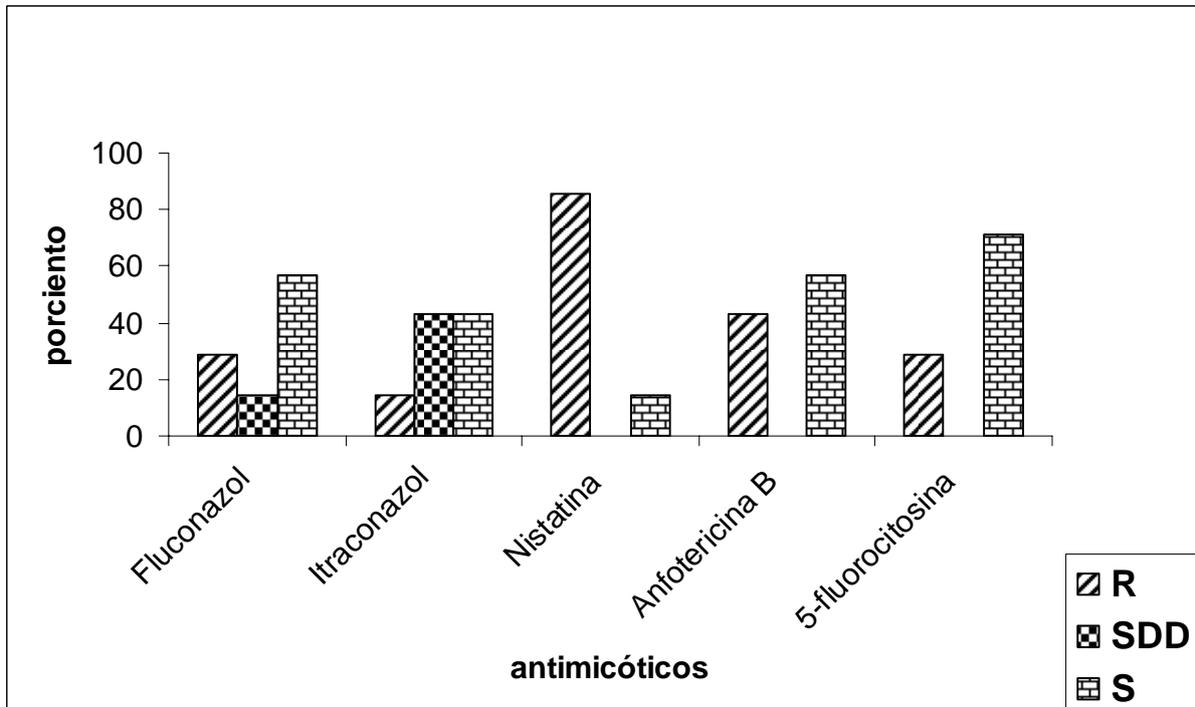


Figura 6. Patrón de susceptibilidad de aislados de *C. zeylanoides* (n= 7) a fluconazol, itraconazol, nistatina, anfotericina B y 5 fluorocitosina. R = resistente; SDD = susceptible dependiente de la dosis; S = susceptible.

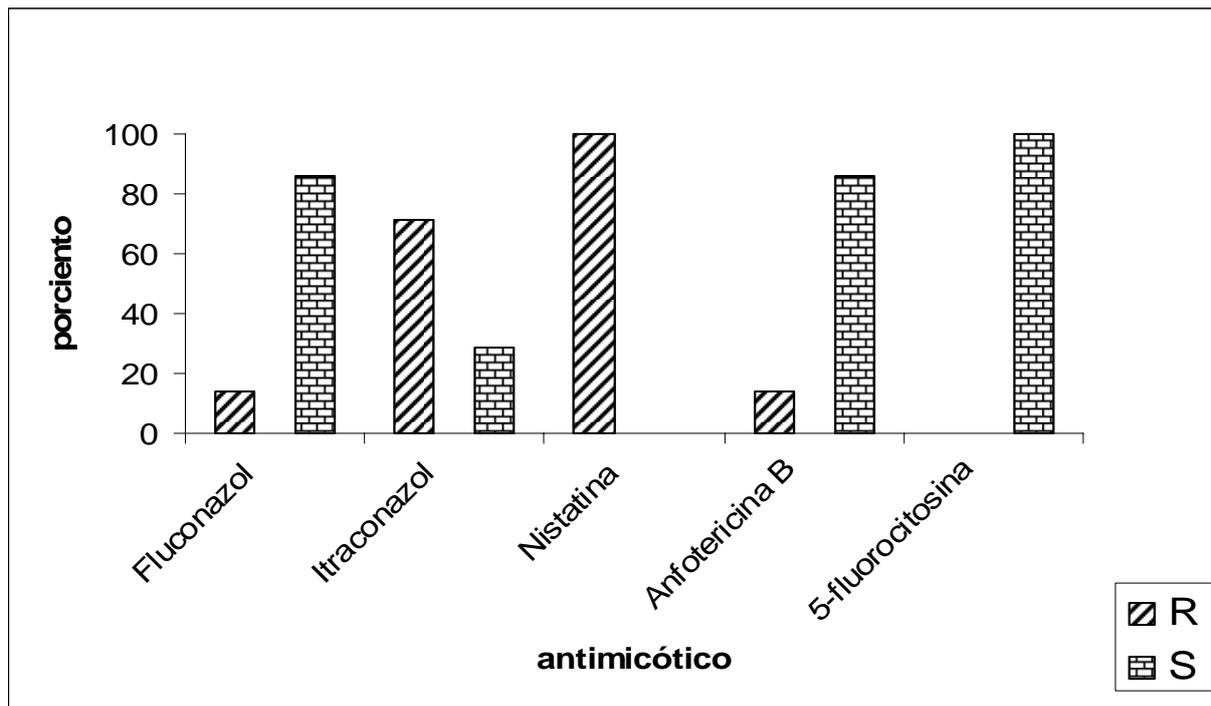


Figura 7. Patrón de susceptibilidad de aislados de *C. viswanathii* (n= 7) a fluconazol, itraconazol, nistatina, anfotericina B y 5 fluorocitosina. R = resistente; S = susceptible.

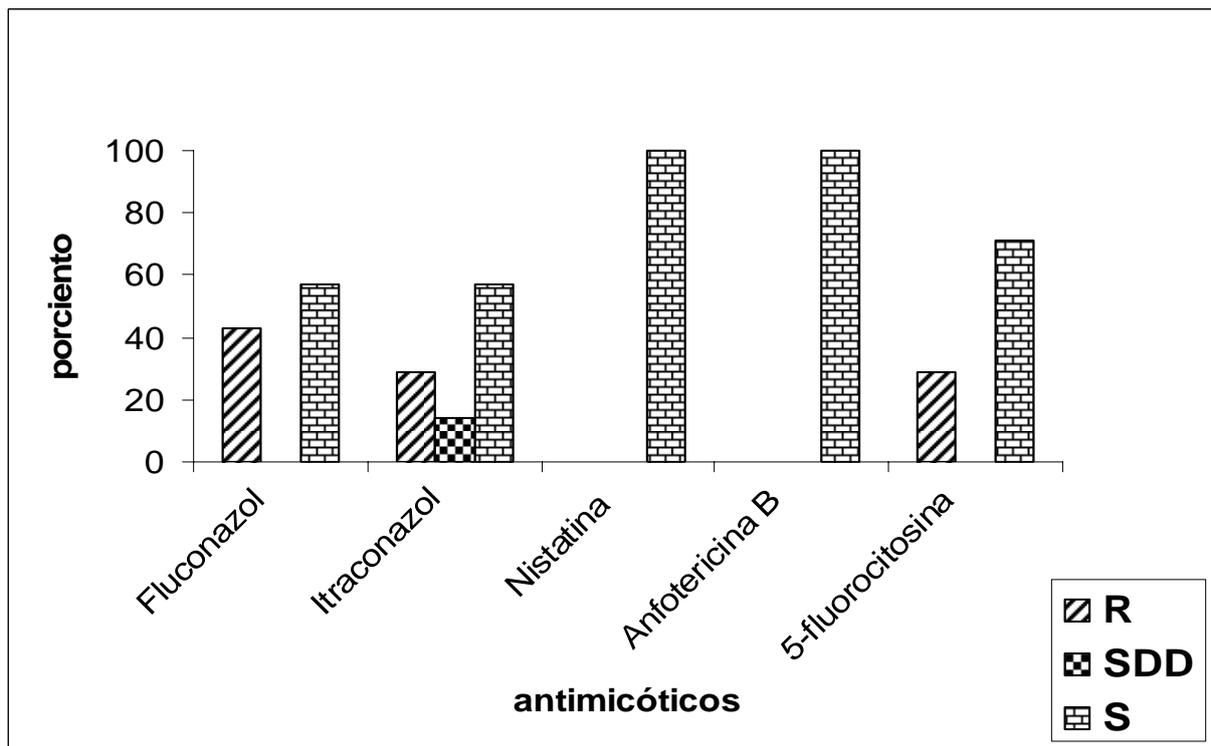


Figura 8. Patrón de susceptibilidad de aislados de *P. zopffii* (n= 7) a fluconazol, itraconazol, nistatina, anfotericina B y 5 fluorocitosina. R = resistente; SDD = susceptible dependiente de la dosis; S = susceptible.

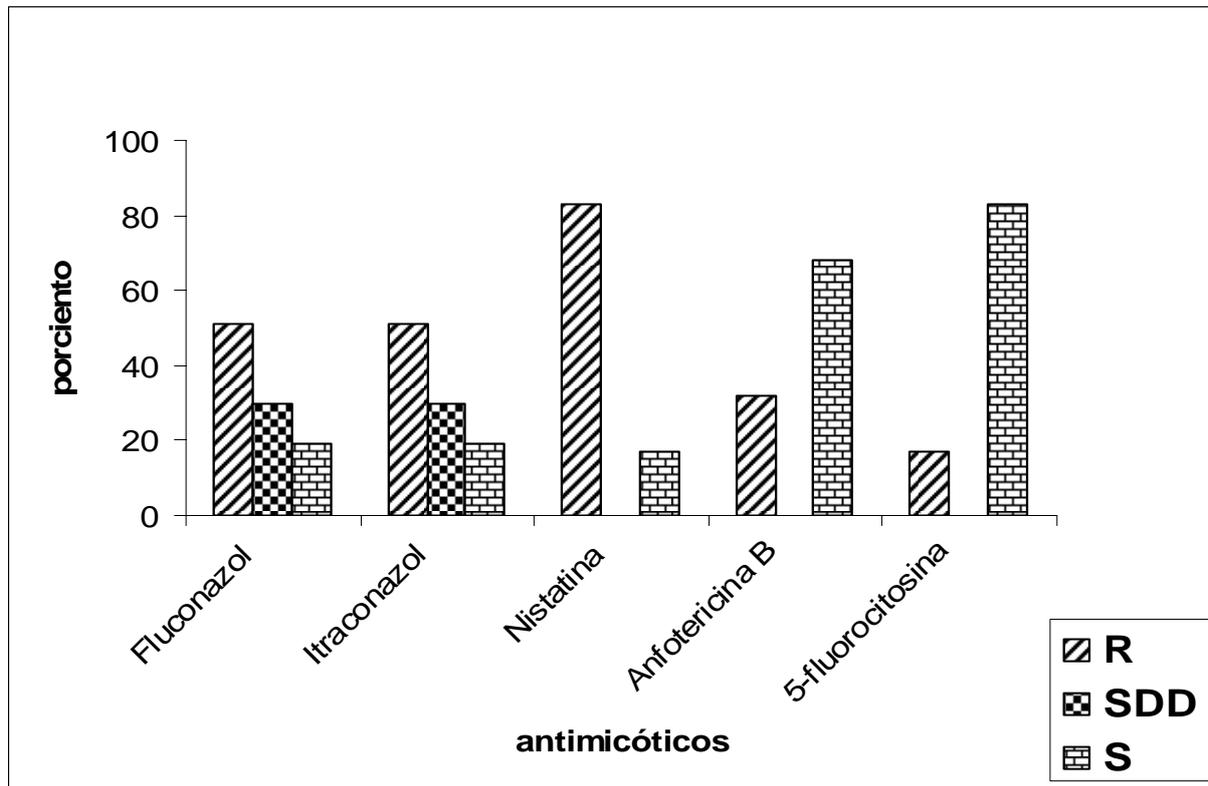


Figura 9. Patrón de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp. (n=47) a fluconazol, itraconazol, nistatina, anfotericina B y 5 fluorocitosina. R = resistente; SDD = susceptible dependiente de la dosis; S = susceptible.

4.4 Identificación molecular

4.4.1 Extracción ADN

Con el método de extracción descrito por Ausubel. El ADN obtenido de las cepas ATCC así como de los 285 aislados, se visualizó en un gel de agarosa al 1%, no se observó degradación ni ARN (Figura 10). El rendimiento promedio de los aislados con este método fue de 5.0 μ g de ADN genómico total.

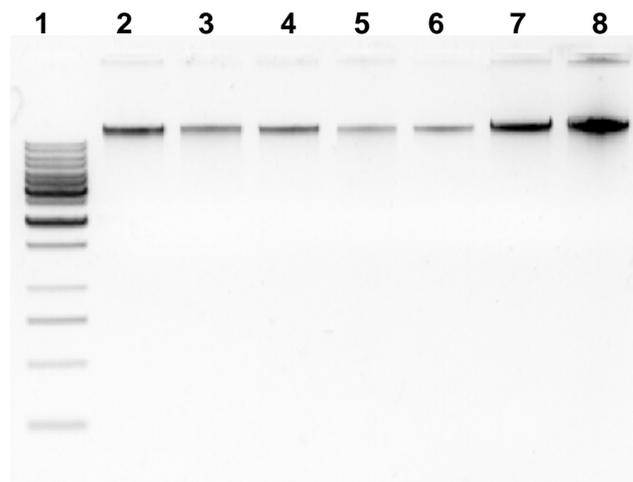


Figura 10. Gel de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio. Donde: carril 1= marcador ADN 1 kb; carril 2= *C. albicans* ATCC 10231, carril 3= *C. krusei* ATCC 6258; carril 4= *C. parapsilosis* ATCC 22014; carril 5= *P. zopffii*; carriles 6 y 7 = *Candida* spp.; carril 8= *C. glabrata*.

4.4.2 Amplificación al azar del ADN por PCR

La visualización de los productos de RAPD-PCR se realizó en geles de agarosa al 1.3%, adicionados con bromuro de etidio.

4.4.2.1 RAPD-PCR para cepas ATCC

Las bandas observadas en las cepas de *C. krusei* ATCC 6258, *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22014 y *C. glabrata* del Instituto Pasteur de París, con los iniciadores utilizados se muestran en el Cuadro 13, Figura 11.

Cuadro 13. Fragmentos obtenidos con los iniciadores OPE 18 y OPA 18 para las cepas de referencia mediante RAPD-PCR.

Cepa	Fragmentos en pb con OPE18	Fragmentos en pb con OPA18
<i>C. krusei</i>	807, 1250, 1321, 2400	1420, 2538, 3208
<i>C. albicans</i>	1375	1187
<i>C. parapsilosis</i>		1265, 1357
<i>C. glabrata</i>	891, 1026, 1968, 2440	597, 839, 1017, 1142, 1330, 1968, 2380

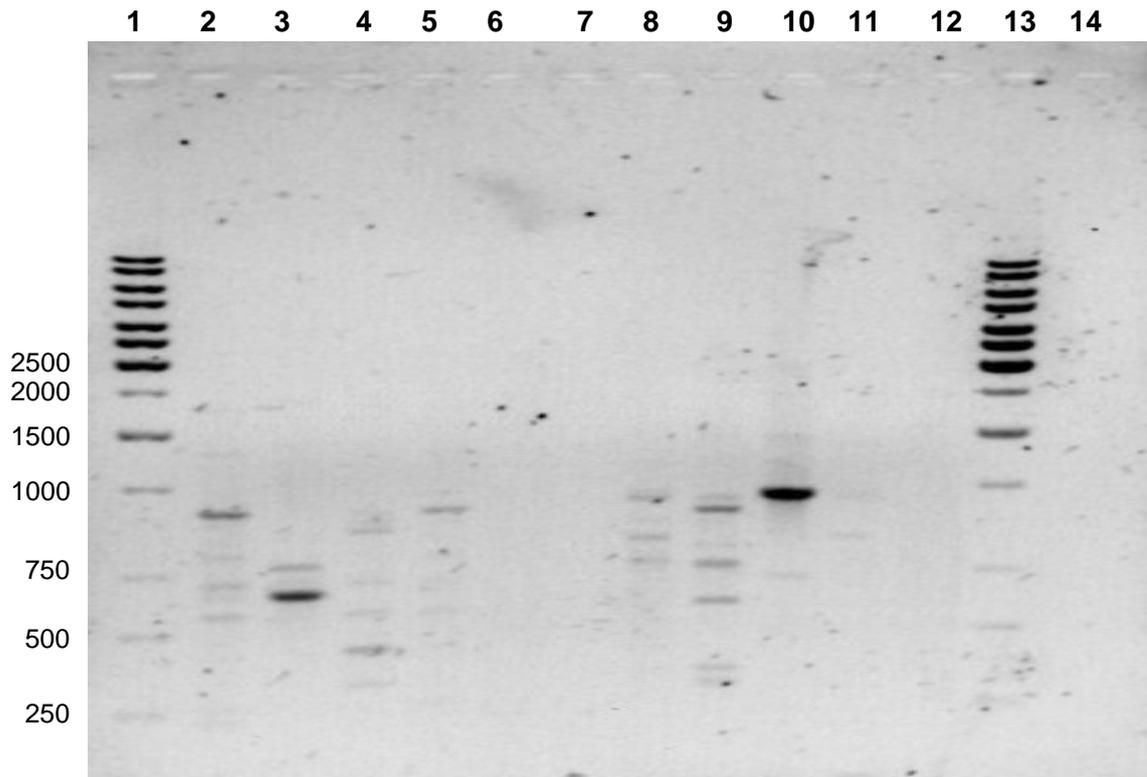


Figura 11. RAPD-PCR de cepas de referencia con iniciadores OPE 18 (carriles 2-5) y OPA 18 (carriles 8-11). Donde: carril 1 y 13= marcador 1 kb; carriles 2 y 8= *C. krusei* ATCC, carriles 3 y 9= *C. albicans* ATCC 10231, carriles 4 y 10= *C. parapsilosis* ATCC y carriles 5 y 11= *C. glabrata* del Instituto Pasteur de París.

Las reacciones de RAPD-PCR se realizaron a 269 de los aislados de levaduras, con el iniciador OPE 18 se obtuvieron bandas en el 76.20% (205/269), mientras que con el iniciador OPA 18 se obtuvieron 67% (181/269) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Especies de *Candida* que presentaron bandas en la reacción de RAPD-PCR con los oligonucleótidos OPE 18 y OPA 18.

Especies de <i>Candida</i>	Positivos a bandas en reacción de RAPD-PCR	
	OPE 18	OPA 18
<i>Candida glabrata</i>	79	71
<i>Candida krusei</i>	74	65
<i>Candida albicans</i>	2	5
<i>Candida zeylanoides</i>	3	1
<i>Candida norvegica</i>	4	4
<i>Candida viswanathii</i>	4	4
<i>Prototheca zopffii</i>	1	0
<i>Candida keyfir</i>	4	3
<i>Candida guilliermondii</i>	1	1
<i>Candida parasilopsis</i>	5	4
<i>Candida intermedia</i>	3	3
<i>Candida macedoniensis</i>	1	1
<i>Candida brumptii</i>	1	1
<i>Candida slooffii</i>	1	1
<i>Candida cantarelli</i>	1	1
<i>Candida incommunis</i>	1	1
<i>Geotrichum spp.</i>	1	0.35
<i>Candida spp.</i>	20	13
TOTAL	205	180

4.4.2.2 RAPD-PCR para aislados de *C. glabrata*

En el caso de los aislados de *C. glabrata* fue posible determinar hasta cinco patrones diferentes con el iniciador OPE 18 (72 aislados), denominados con letras de la A a la E (Cuadro 15, Figura 12) y hasta siete patrones distintos con el iniciador OPA 18 (71 aislados), denominados del 1 al 7. Siete de los aislados de *C. glabrata* no pudieron ser agrupados con OPE 18 (Cuadro 16) (Figuras 13, 13a).

Cuadro 15. Grupos de bandas de aislados de *C. glabrata* con OPE18 (n=79)

Grupo	3678	2194	1887	1714	1332	1054	945	779	633	576	467
A (n=39)		+				+	+	+	+		+
B (n=18)	+		+			+	+	+	+		
C (n= 7)		+	+			+	+			+	+
D (n=6)				+	+		+				
E (n=2)							+			+	

7 aislados sin agruparse

Cuadro 16. Grupos de bandas de aislados de *C. glabrata* con OPA 18 (n=71)

Grupo	1692	1381	1254	1064	968	851	768	646	562	381	
1 (n=26)		+		+	+	+	+	+	+		
2 (n=13)		+		+	+	+		+			
3 (n=11)			+		+	+			+		
4 (n=8)	+	+	+		+		+	+			
5 (n=7)	+		+	+							
6 (n=4)				+					+		
7 (n=2)								+		+	

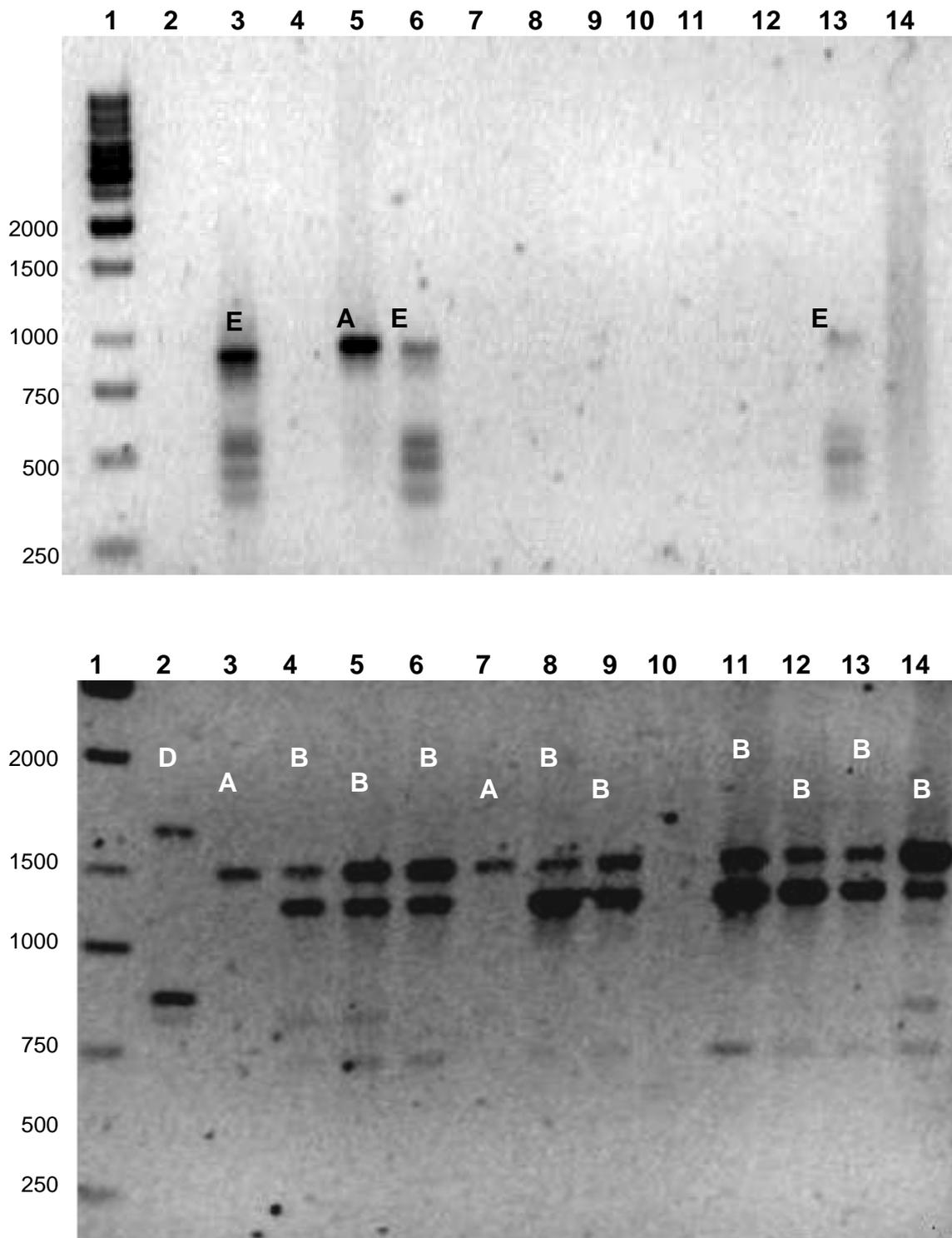


Figura 12. RAPD-PCR de aislados de *C. glabrata* con OPE 18 en geles de agarosa al 1.3% adicionados con bromuro de etidio. Donde: carril 1=marcador 1 kb; carriles 2-14 aislados de *C. glabrata*. Grupos referidos en Cuadro 15.

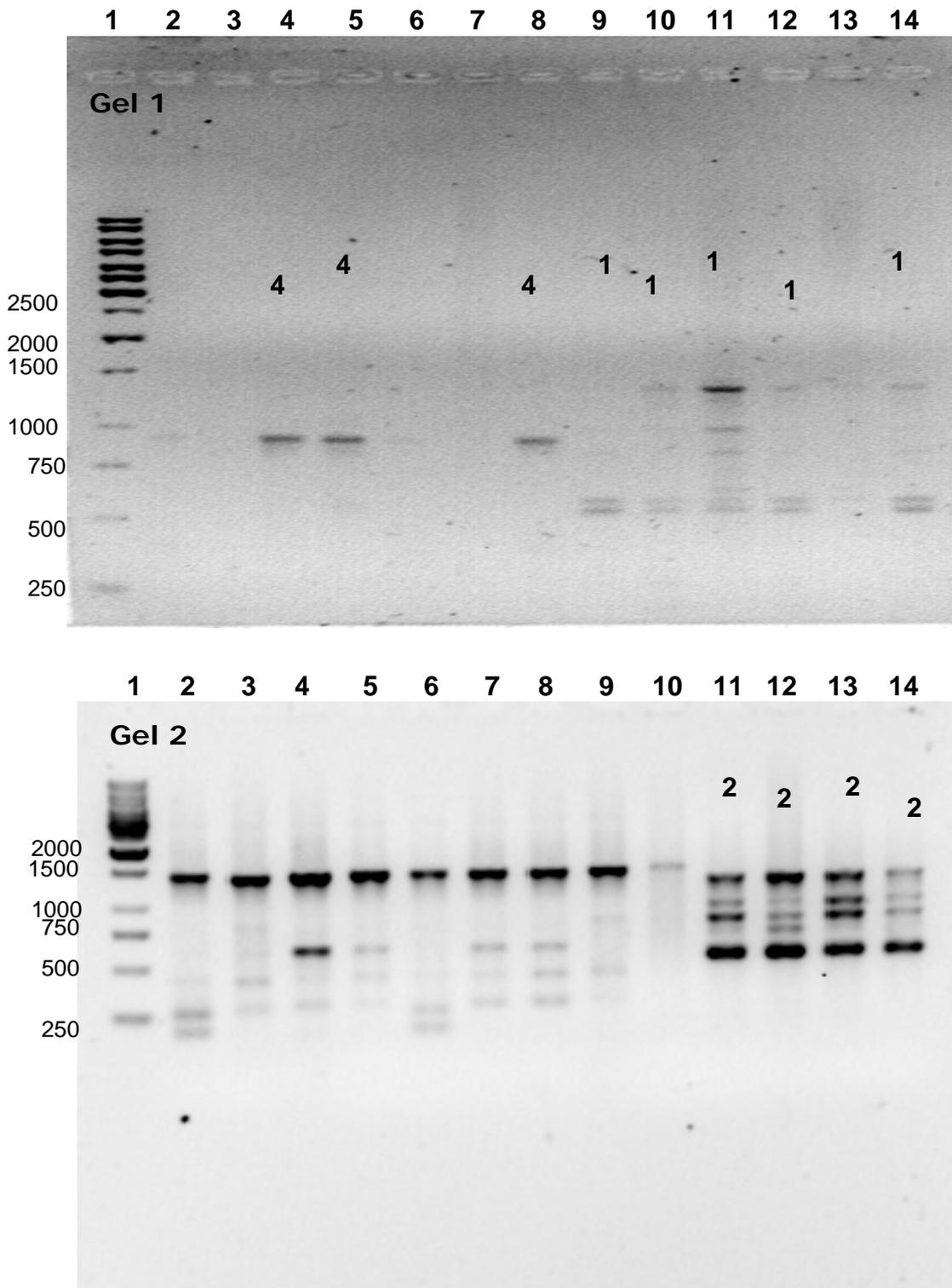


Figura 13. RAPD-PCR de aislados de *C. glabrata* con OPA 18 en geles de agarosa al 1.3% adicionados con bromuro de etidio. Gel 1: carril 1=marcador 1 kb; carriles 2-14 aislados de *C. glabrata*. Gel 2: carril 1=marcador 1 kb; carriles 2-10 aislados de *C. krusei*; carriles 11-14 aislados de *C. glabrata*. Grupos referidos en Cuadro 16.

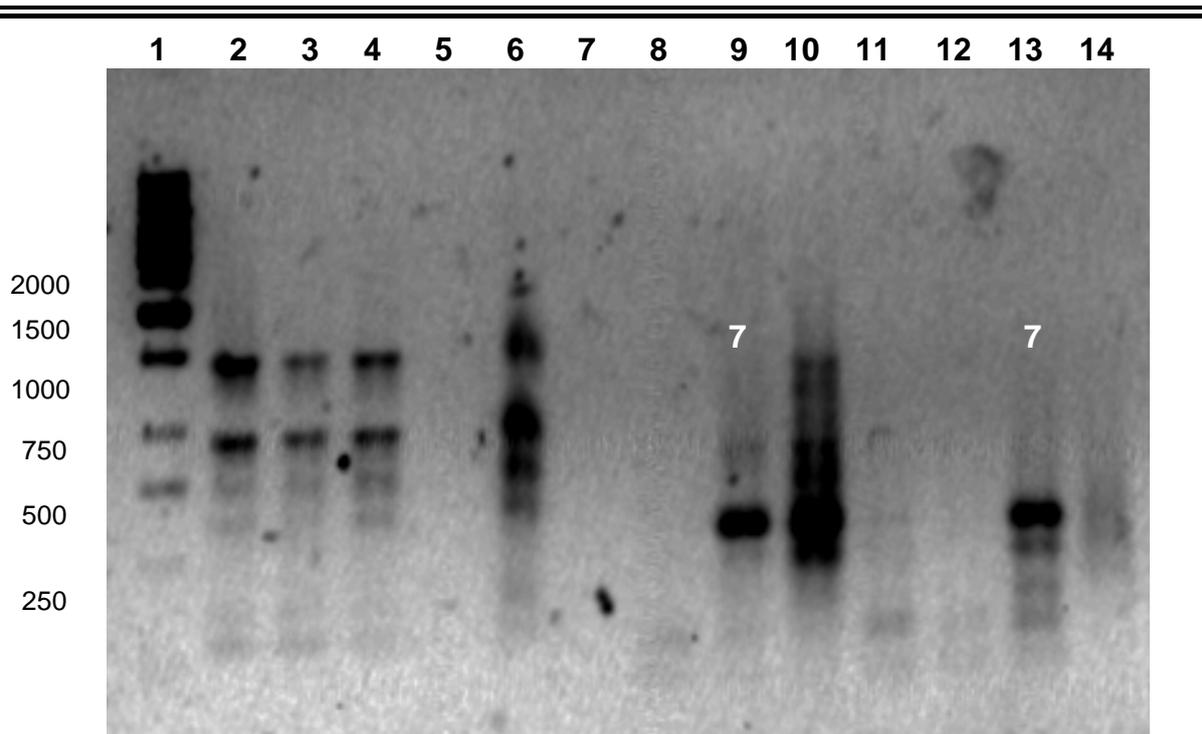


Figura 13a. RAPD-PCR de aislados de *C. glabrata* con OPA 18 en geles de agarosa al 1.3% adicionados con bromuro de etidio. Donde: carril 1=marcador 1 kb; carriles 2-14 aislados de *C. glabrata*. Grupos referidos en Cuadro 16.

4.4.2.3 RAPD-PCR para aislados de *C. krusei*

En el caso de los aislados de *C. krusei* fue posible determinar hasta siete patrones diferentes con el iniciador OPE 18 (74 aislados), denominados con letras de la A a la G (Cuadro 17, Figura 14) y hasta siete patrones distintos con el iniciador OPA 18 (65 aislados), denominados del 1 al 7 (Cuadro 18) (Figuras 15, 15a). 12 de los aislados de *C. krusei* no pudieron agruparse con el iniciador OPE 18 y 3 con el OPA 18.

Cuadro 17. Grupos de bandas de aislados de *C. krusei* con OPE18 (n=74)

Grupo	7718	2331	1307	936	815	728	653	553	434
A (n=24)			+	+	+		+	+	
B (n=19)		+	+		+		+	+	+
C (n=5)							+	+	+
D (n=5)				+			+	+	+
E (n=4)				+	+		+	+	
F (n=3)						+	+		
G (n=2)	+								

12 aislados sin agruparse

Cuadro 18. Grupos de bandas de aislados de *C. krusei* con OPA 18 (n=65)

Grupo	3098	2725	1451	1102	988	899	746	634	565	437
1 (n=36)	+	+	+	+						
2 (n=8)	+		+		+		+	+		
3 (n=3)					+		+			
4 (n=3)			+	+		+		+		
5 (n=3)				+			+		+	+
6 (n=6)			+							
7 (n=3)							+	+		

3 aislados sin agruparse

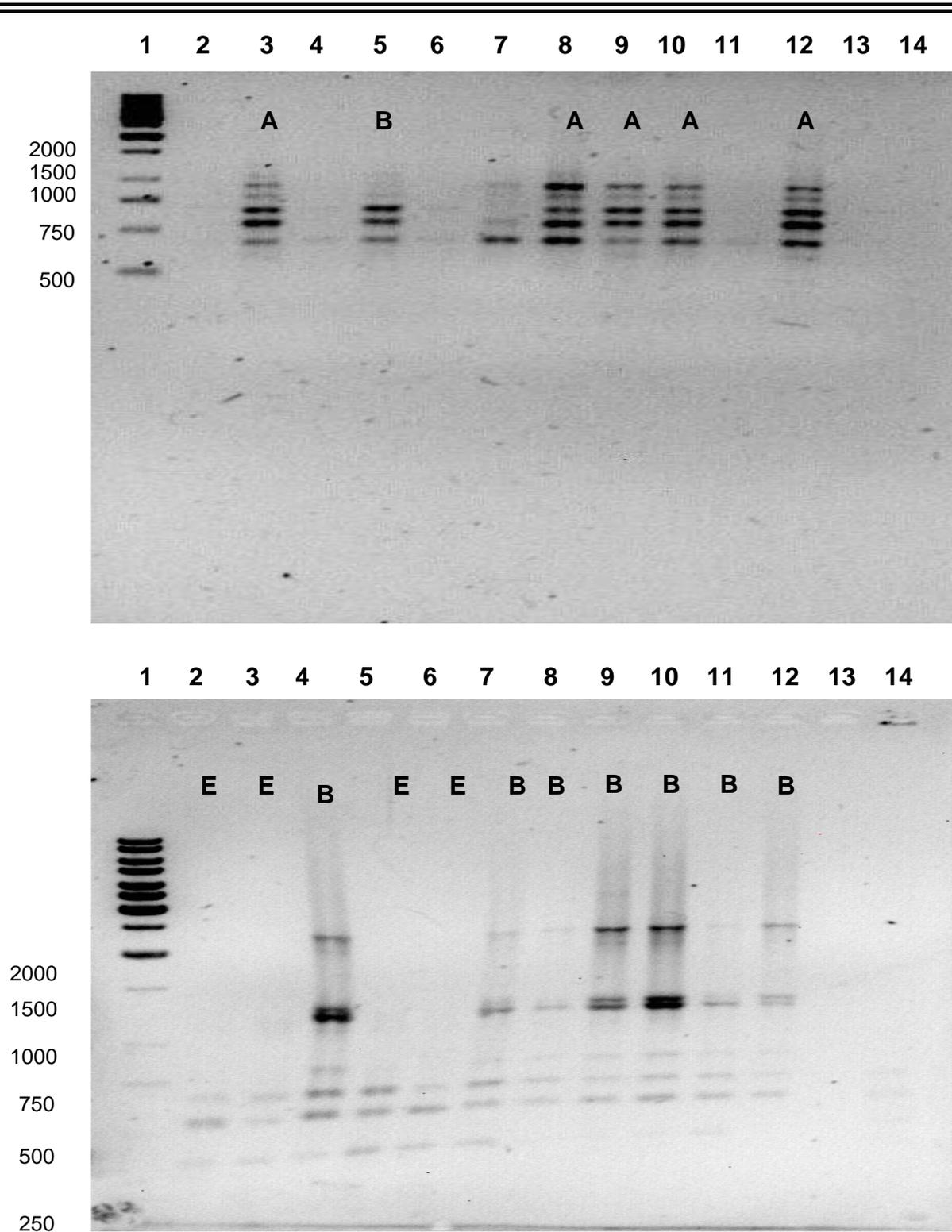


Figura 14. RAPD-PCR de aislados de *C. krusei* con OPE 18 en geles de agarosa al 1.3% adicionados con bromuro de etidio. Donde: carril 1= marcador de 1 kb; carriles 2-14 aislados de *C. krusei*. Grupos referidos en Cuadro 17.

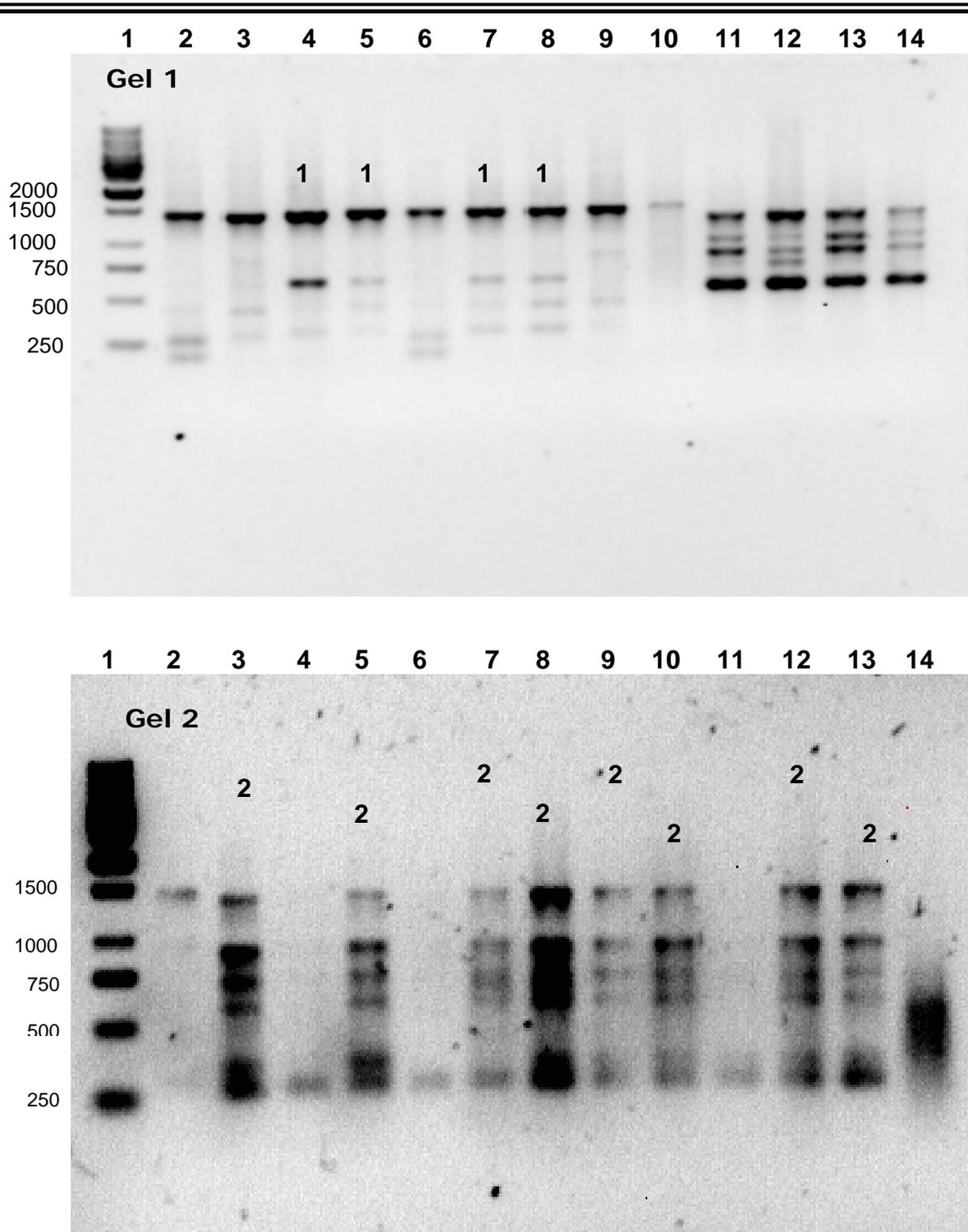


Figura 15. RAPD PCR de aislados de *C. krusei* con OPA 18 en geles de agarosa al 1.3% adicionados con bromuro de etidio. Gel 1: carril 1= marcador de 1 kb; carriles 2-10 aislados de *C. krusei*; carriles 11-14 aislados de *C. glabrata*. Gel 2: carril 1= marcador de 1 kb; carriles 2-14 aislados de *C. krusei*. Grupos referidos en Cuadro 18.

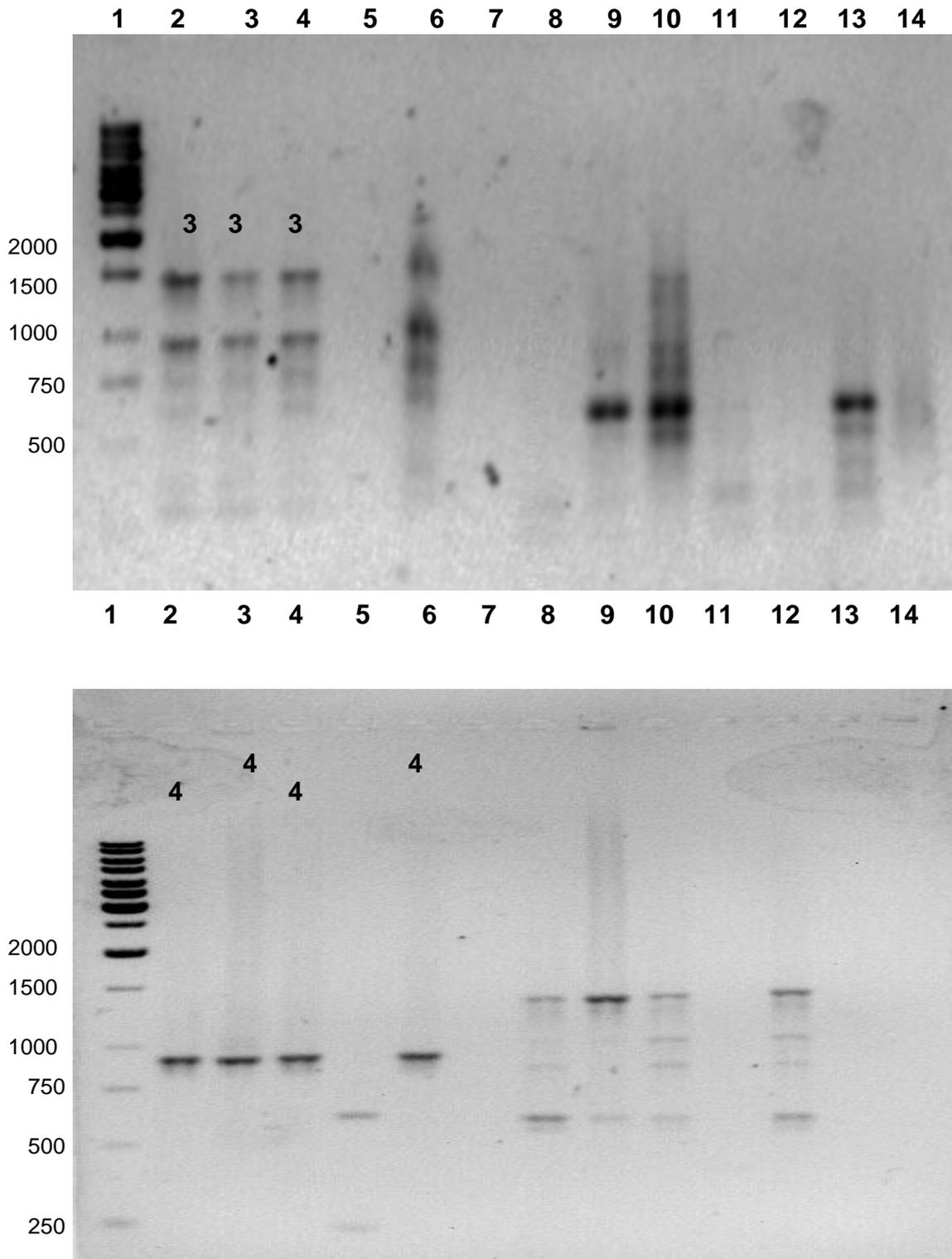


Figura 15a. RAPD PCR de aislados de *C. krusei* con OPA 18 en geles de agarosa al 1.3% adicionados con bromuro de etidio. Donde: carril 1= marcador de 1 kb; carriles 2-14 aislados de *C. krusei*.

4.4.2.4 RAPD-PCR para aislados de *Candida* spp.

De los 47 aislados de *Candida* spp. sólo el 42.55% (20/47) presentaron patrones de bandas con el OPE 18 y 28% (13/47) con OPA 18. Los patrones de bandas para cada aislado con OPE 18 se presentan en Cuadro 19 (Figuras 16,16a,16b) y para OPA 18 en el Cuadro 20 (Figuras 17,17a).

Cuadro 19. Patrones de bandas de *Candida* spp con OPE 18 (n=20)

aislado	Patrón de bandas en pb								
*1			1103.4		870.4				360.5
2			1194.9				666.7		
3			1211.9						
4	2411.8	1750		1076.3		722.2			
*5	2323.5			1025.4	913				500
*6				1025.4	923.9				504.6
7			1378.8				699.2		474.6
8			1219.7						572
9						816.7			
10			1348.5						
*11				1051	911.8				
*12				1030.6	897.1				
13							652.2		
*14				1020.4	889.7				
*15				1071.4	933.8				
*16			1112.2	963.2					
*17			1132.7	1000					
*18									453
19			1475			750		538	
20			1475			773		563	

- Patrón compatible grupo C de *C. glabrata* con OPE 18.

Cuadro 20. Patrones de bandas de especies parecidas a *Candida* con OPA 18 (n=13)

aislado	Patrón de bandas en pb								
1				1112.2		947			
2	2333.3		1500		1066.7			580.5	
3	2333.3		1491.7		1058.3			580.5	
4			1500	1208.3	941.9				
5	2250			1166.7	1000				
6	2220.6		1429.8		993.9			522.3	
*7			1438.6						
8									437.5
*9			1456.1						
10									421.1
*11			1448.3						
12	2423.1	1893.9	1344.8	1137.9	1008.6		856.3	602.7	
13	2423.1		1353.4	1137.9	1017.2		862.5	607.1	

- * Patrón de bandas grupo F de *C. krusei* con OPA 18

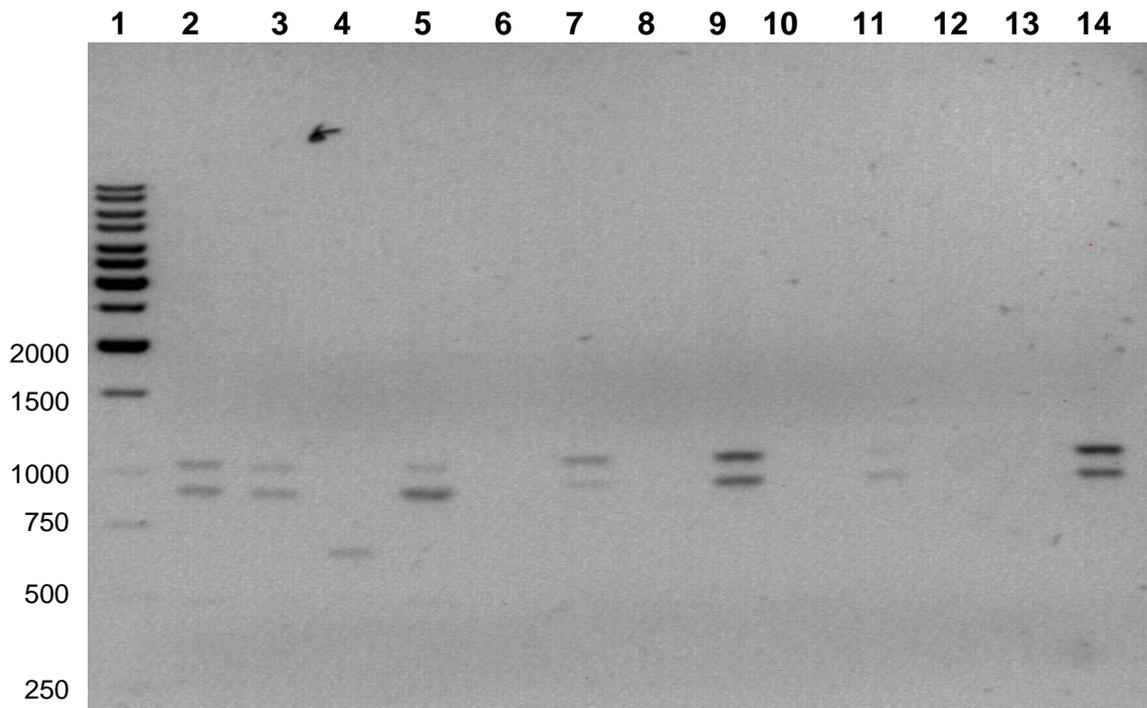


Figura 16. RAPD-PCR de aislados de *Candida* spp con OPE 18 en gel de agarosa al 1.3% adicionado con bromuro de etidio. Donde: carril 1= marcador 1 kb; carriles 2-14 aislados *Candida* spp; carriles 2,3,5,7,9,11 y 14 presentan patrón coincidente con grupo C de *C. glabrata* con OPE 18. Grupos referidos en Cuadro 19.

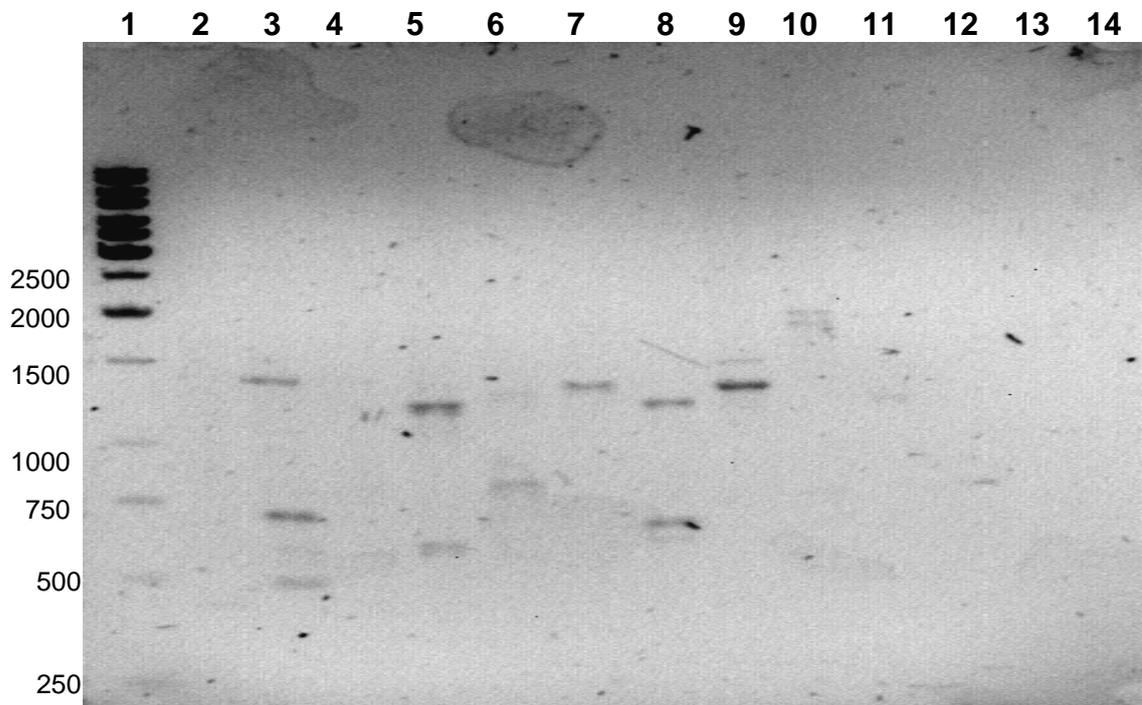


Figura 16a. RAPD-PCR de aislados de *Candida* spp con OPE 18 en gel de agarosa al 1.3% adicionado con bromuro de etidio. Donde: carril 1= 1 kb; carriles 2-7 aislados *Candida* spp; carril 8= *C. parapsilosis*; carriles 9-11= *C. glabrata*. Grupos referidos en Cuadro 19.

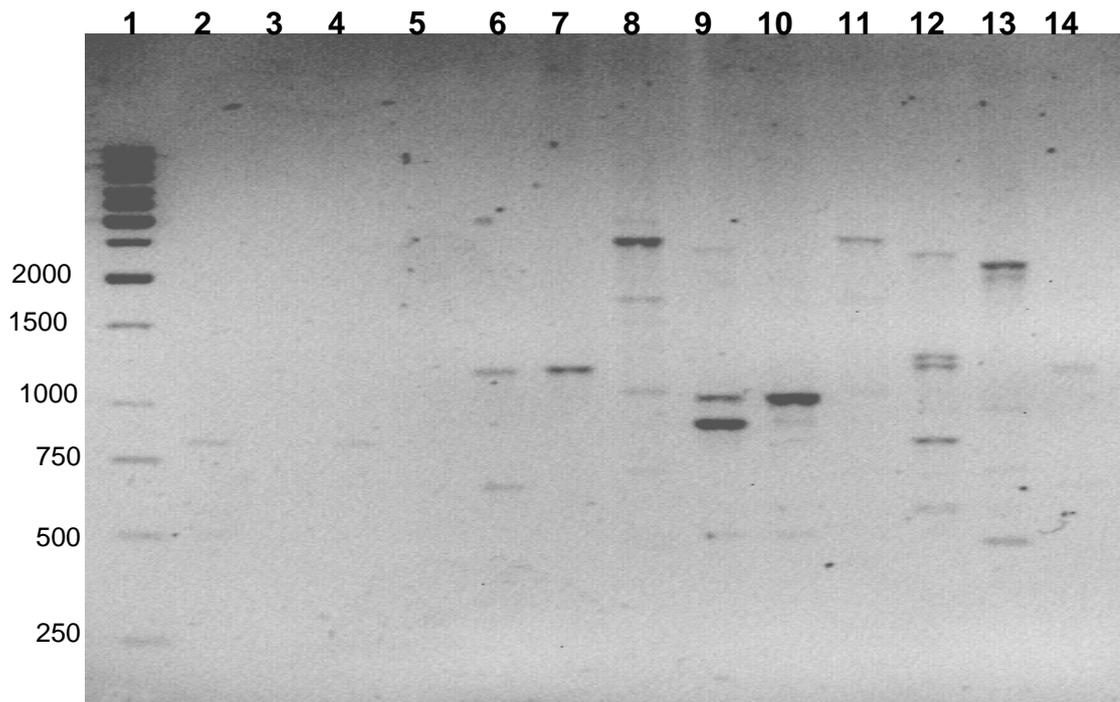


Figura 16b. RAPD-PCR de aislados de *Candida* spp con OPE 18 en gel de agarosa al 1.3% adicionado con bromuro de etidio. Carril 1= 1 kb; carriles 2-5 aislados *C. krusei*; carriles 6-10 aislados *Candida* spp.; 11-14 = *C. parapsilosis*. Grupos referidos en Cuadro 19.

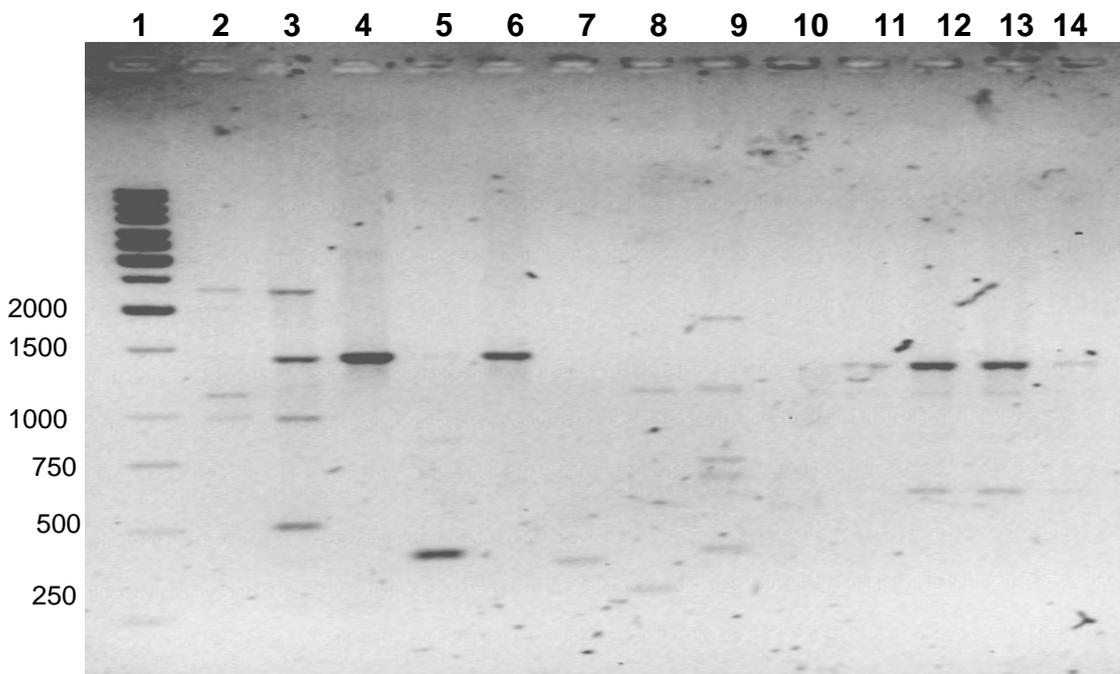


Figura 17. RAPD-PCR de aislados de *Candida* spp con OPA 18 en gel de agarosa al 1.3% adicionado con bromuro de etidio. Carril 1= 1 kb; carriles 2-7 aislados *Candida* spp.; carril 8= *C. parapsilosis*; carriles 9-14= *C. glabrata*. El patrón de bandas de carril 3 y 5 coincide con grupo 1 de *C. krusei* con OPA 18. Grupos referidos en Cuadro 20.

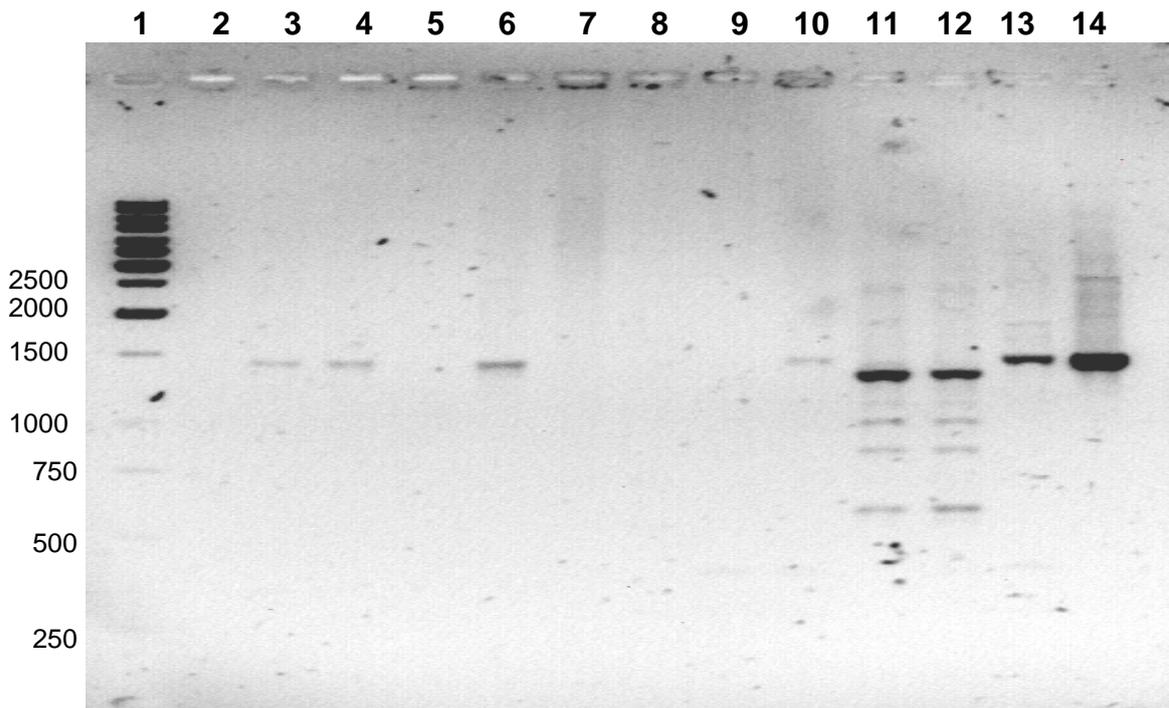


Figura 17a. RAPD-PCR de aislados de *Candida* spp con OPA 18 en gel de agarosa al 1.3% adicionado con bromuro de etidio. Carril 1= 1 kb; carriles 2-7 aislados *C. krusei*; carril 8-12= *Candida* spp.; carriles 13-14= *C. parapsilosis*. El patrón de bandas de carril 10 coincide con grupo 1 de *C. krusei* con OPA 18. Grupos referidos en Cuadro 20.

4.4.2.5 RAPD-PCR para aislados de diferentes especies de *Candida*

De los 68 aislados de diferentes especies de *Candida* se realizó RAPD PCR a 46 aislados de los cuales el 70% (32/46) presentaron bandas con OPE18 y el 67% (31/46) con OPA18. Los patrones de bandas para cada aislado con OPE 18 se presentan en Cuadro 21 (Figura 18) y para OPA 18 en Cuadro 22 (Figura 19).

Cuadro 21. Patrones de bandas de diferentes especies de *Candida* con OPE 18 (n=32)

	Especies de <i>Candida</i>	Patrones de bandas en pb									
1	<i>C. brumptii</i>			1012.8		888.9					
2	<i>C. cantarelli</i>				990.7	870.4					
3	<i>C. guilliermondii</i>		1217.9					641.9			
4	<i>C. incommunis</i>		1153.8					614.9	445		
5	<i>C. macedoniensis</i>	2078.9	1153.8			870.4	750	635.1	527		
6	<i>C. albicans</i>			1032.6	905.4						
7	<i>C. albicans</i>	2434.8	1293.5			817.6		583.3			
8	<i>C. slooffii</i>		1250					669.5			
9	<i>C. intermedia</i>	2105.3						668.9	435		
10	<i>C. intermedia</i>		1500			870.4		614.9	547.3		
11	<i>C. intermedia</i>		1500					608.1			
12	<i>C. zeylanoides</i>						702.4				
13	<i>C. zeylanoides</i>						706.3		488.6		
14	<i>C. zeylanoides</i>				963					348.8	162.8
15	<i>C. viswanathii</i>	2426.5									
16	<i>C. viswanathii</i>	2176.5	1305.1			847.8		592.6			
17	<i>C. viswanathii</i>	2147.1			978.3		731.5		487.5		
18	<i>C. viswanathii</i>		1220.3								
19	<i>C. kefyr</i>	2391.3	1293.5			831.1	711.1	577.8			
20	<i>C. kefyr</i>		1119.6		952.7						
21	<i>C. kefyr</i>			1065.2	945.9						
22	<i>C. kefyr</i>							627.8	533.3		
23	<i>C. norvegica</i>		1282.6				727.8		496.1		
24	<i>C. norvegica</i>		1130.4		979.7						
25	<i>C. norvegica</i>		1130.4					683.3	594.4		
26	<i>C. norvegica</i>		1380.4				750				
27	<i>C. parapsilosis</i>		1250	1097.8							
28	<i>C. parapsilosis</i>		1260.9	1108.7							
29	<i>C. parapsilosis</i>		1781.3					678.6			
30	<i>C. parapsilosis</i>		1425.9				714.3				
31	<i>C. parapsilosis</i>		1425.9				715.3				
32	<i>P. zopfi</i>		1258.6				705.1		500	284.9	

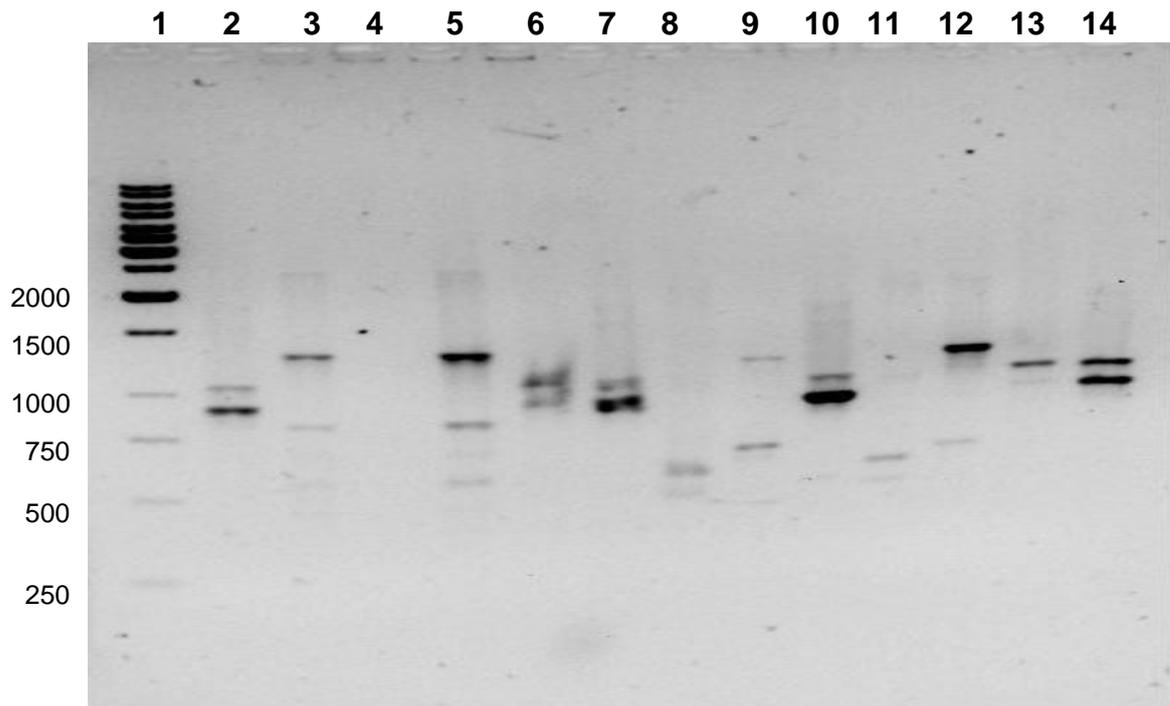


Figura 18. RAPD-PCR de aislados de diferentes especies de *Candida* con OPE 18 en gel de agarosa al 1.3% adicionado con bromuro de etidio. Carril 1= 1 kb; carriles 2-5= *C. norvegica*; carriles 6-8= *C. intermedia*; carriles 9-12= *C. viswanathii*; carril 13= *C. macedoniensis*; carril 14= *C. kefyr*.

Cuadro 22. Patrones de bandas de diferentes especies de *Candida* con OPA 18 (n=31)

	Especies de <i>Candida</i>	Patrones de bandas en pb							
1	<i>C. brumptii</i>			1444.4				543.7	
2	<i>C. cantarelli</i>			1453.7				539.7	
3	<i>C. guilliermondii</i>							558	291.1
4	<i>C. incommunis</i>			1444.4				535.7	
5	<i>C. macedoniensis</i>			1409.1					
6	<i>C. albicans</i>	2357.1		1474.6		1042.4		560.3	
7	<i>C. albicans</i>			1500	1059.3				
8	<i>C. albicans</i>			1370.4	1157.4	1000	839.7	593.8	
9	<i>C. albicans</i>				1101.9				
10	<i>C. albicans</i>			1355.9					
11	<i>C. sloofii</i>			1463					
12	<i>C. intermedia</i>			1381.8				565	
13	<i>C. intermedia</i>			1372.7				605	
14	<i>C. intermedia</i>				1163.6				
5	<i>C. zeylanoides</i>			1361.1	1138.9	1000	846.2	598.2	
16	<i>C. viswanathii</i>							610	
17	<i>C. viswanathii</i>			1390.9		1054.5	885.1	615	570
18	<i>C. viswanathii</i>				1163.6				
19	<i>C. viswanathii</i>								422.5
20	<i>C. kefyr</i>		1984.8	1681.8	1342.6		897.4	696.4	
21	<i>C. kefyr</i>			1351.9	1046.3			504.5	
22	<i>C. kefyr</i>			1409.1			912.2	615	570
23	<i>C. norvegica</i>	3461.5		1444.4					
24	<i>C. norvegica</i>			1345.5	1081.8		858.1		
25	<i>C. norvegica</i>			1445.5					
26	<i>C. norvegica</i>			1463.6					
27	<i>C. parapsilosis</i>			1201.8					345.4
28	<i>C. parapsilosis</i>	2607.1	1878.8	1456.9					
39	<i>C. parapsilosis</i>	2642.9		1439.7					
30	<i>C. parapsilosis</i>				1110.2				
31	<i>C. lambica</i>			1472.2					

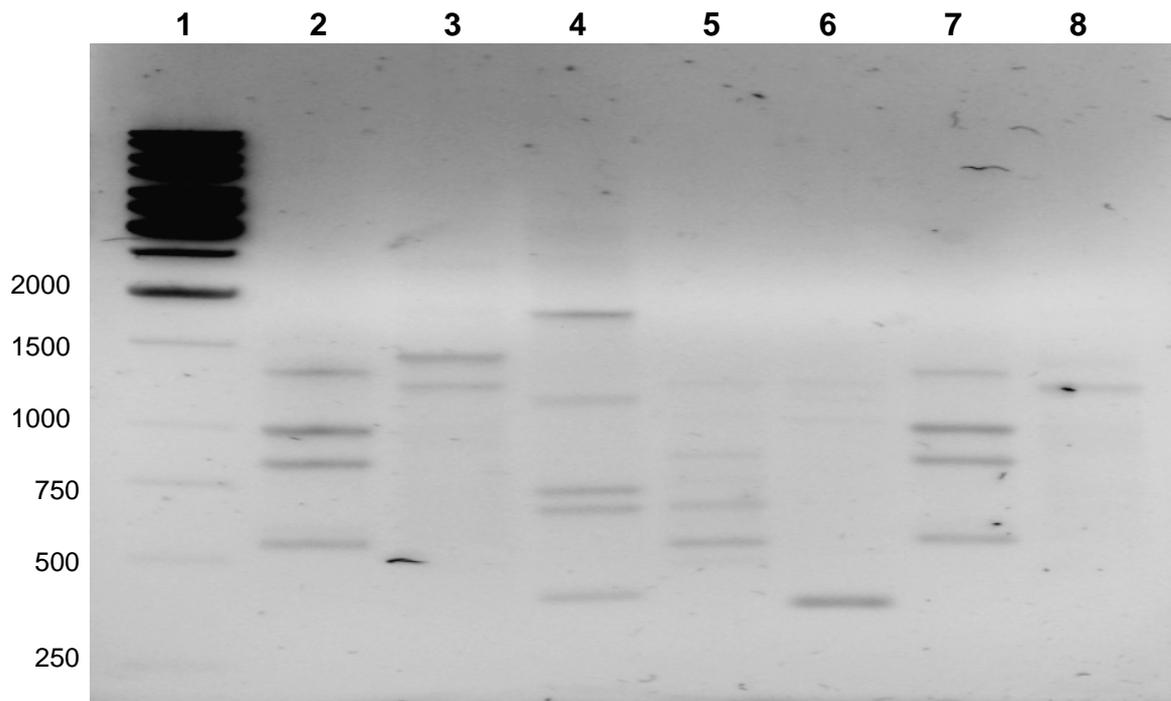


Figura 19. RAPD-PCR de aislados de diferentes especies de *Candida* con OPA 18 en gel de agarosa al 1.3% adicionado con bromuro de etidio. Carril 1= 1 kb; carril 2= *C. macedoniensis*; carril 3= *C. krusei*; carril 4= *C. parapsilosis*; carril 5= *P. zopffii*; carril 6= *C. albicans*; carril 7= *C. glabrata*; carril 8= control negativo.

4.4.2.6 Análisis de los resultados de las reacciones de RAPD-PCR con los iniciadores OPE y OPA 18.

Los productos de reacción de los aislados de *C. glabrata* originados con el iniciador OPE 18, permitieron formar 5 grupos de acuerdo al número de bandas observadas. El fragmento común de 945 pb en los cinco grupos distingue a los aislados de esta especie. En contraste, con el iniciador OPA 18 se generaron 7 grupos, en los cuales se observan de dos hasta siete bandas en cada uno, sin encontrarse una banda común en los grupos como es el caso con OPE18.

Para los aislados de *C. krusei* ocurre una situación similar a la observada para *C. glabrata*, aunque para ambos iniciadores se forman 7 grupos, OPE

18 permite observar una banda de 653 pb común a seis de los grupos, que sería la banda que distingue a los aislados de esta especie.

Con relación a los aislados de *Candida* spp del 42.55% que presentaron bandas con OPE 18 (Cuadro 19), los fragmentos generados permiten observar que 10 de los aislados presentan un patrón compatible con el grupo "C" de *C. glabrata*, 8 de éstos con un fragmento común cercano a los 945 pb, lo cual sugiere que estas 8 cepas pueden ser clasificadas como *C. glabrata*. En forma similar, los aislados 19 y 20 (Cuadro 19), presentan un patrón compatible con los aislados 30 y 31 de las diferentes especies de *Candida* (Cuadro 21), patrón presentado por aislados identificados como *C. parapsilosis* que concuerda con los tamaños de bandas reportado por Bautista *et al.* ³⁵. El resto de los aislados de *Candida* spp, presentan una diversidad de bandas que hace difícil su reclasificación. Los fragmentos generados en este grupo con OPA 18 (Cuadro 20), al parecer permiten reclasificar tres de los aislados, aislado 7, 9 y 11 en el grupo "F" de *C. krusei* al presentar una banda cercana a 1451 pb. Los aislados 2, 3, 5 y 6 (Cuadro 20) presentan un patrón de bandas común, semejante al observado en uno de los aislados identificados como *C. albicans* (aislado 6 Cuadro 22). Estos podrían entonces ser considerados como *C. albicans* a pesar de que mediante la metodología tradicional no lograron ser identificados hasta el nivel de especie. Cabe mencionar que se ha reportado que 5% de cepas de *C. albicans* pueden dar negativo al tubo germinal, entre las causas por las cuales puede no formarse el tubo germinal se mencionan un exceso de levaduras en la prueba^{20,21,22},

aunque también debe considerarse que esta prueba debe realizarse con cultivos no mayores a 24 horas de desarrollo y cuidar que la temperatura de la prueba sea de 37°C. Los aislados 8 y 10 (Cuadro 20) presentan una sola banda superior a los 400 pb al igual que el aislado 19 (Cuadro 22) identificado como *C. viswanathii*, al parecer ambos aislados podrían ser reclasificados como *C. viswanathii*.

5. DISCUSIÓN

En este estudio, se aisló un 26.02% de levaduras en el total de muestras analizadas, identificándose principalmente (99.3%) diferentes especies del género *Candida*.

Tanto en las glándulas mamarias sanas como en las glándulas mamarias con mastitis clínica, *C. glabrata* fue la especie predominante al ser aislada en un 59.49% y 22.67% de los casos analizados, respectivamente. Estudios previos ¹¹ han reportado la presencia de *C. glabrata* en las glándulas mamarias de animales sanos, aunque en números muy bajos (0.2%) en relación a estos hallazgos. Recientemente, se ha informado el aislamiento de esta especie de *Candida* en bovinos afectados con mastitis en Nueva Zelanda¹³. En el presente estudio no se aisló *C. glabrata* en casos de mastitis subclínica. Esto puede ser explicado por el hecho de que en procesos de mastitis subclínica es más común encontrarse con un gran número de bacterias en la glándula mamaria que también compiten por los substratos; adicionalmente, se sabe que algunos metabolitos bacterianos son antagonistas de las levaduras y no permiten su desarrollo ⁶¹. Es necesario poner atención en esta especie para dilucidar su papel en infecciones de mastitis. En humanos, *C. glabrata* es considerada un patógeno emergente ⁴¹ y aunque no se conoce con certeza qué factor(es) está(n) influyendo para ello, es posible que pueda estar relacionado con la resistencia que presentan un alto número de cepas a los azoles, en particular al fluconazol.

La segunda especie aislada con mayor frecuencia en los tres grupos de estudio fue *C. krusei*, siendo predominante en las glándulas mamarias de animales con mastitis clínica (38.37%). La presencia de *C. krusei* en animales con mastitis ha sido reconocida desde 1970^{62,63}, aumentando los reportes a partir de 1990^{3, 5, 7, 64}. Sin embargo, existen discrepancias con relación al número de aislados reportados de esta levadura. Por ejemplo, Casia *et al.*³, reportaron en 2005 un 44.5% de aislados de *C. krusei* de bovinos con mastitis, lo cual es similar a los presentes resultados, mientras que Krukowski *et al.*⁷ en 2000 y Langoni *et al.*⁵ en 1995, encontraron esta levadura sólo en un 15.5% en muestras de bovinos con mastitis clínica y en menos del 2% en bovinos con mastitis subclínica, porcentajes inferiores a los obtenidos en este estudio. Las diferencias en los porcentajes de aislados en diferentes países de esta especie de *Candida*, en general, pueden estar relacionadas con varios factores, como el abuso de tratamientos intramamarios con antibióticos o el uso de infusiones de antibióticos hechos en casa para terapia de mastitis⁷, la resistencia natural de esta levadura al fluconazol⁶⁴, alimento contaminado con levaduras^{10, 13} y condiciones de higiene inadecuadas en las zonas de ordeño^{10, 65, 66}, así como también la presencia de cepas de *C. krusei* altamente patógenas^{10, 67}. La presentación de mastitis clínica por *C. krusei* ha sido relacionada más con el uso de material y equipo contaminado en el momento del ordeño, mientras que la subclínica con el uso de quimioterapéuticos antibacterianos⁶³, que eliminan las bacterias comensales y patógenas de la glándula mamaria permitiendo la

multiplicación de las levaduras ¹⁰. Es probable que en el caso del aislamiento de *C. krusei* en las glándulas mamarias sanas, se deba también a condiciones inadecuadas de higiene en el ambiente de ordeño del animal.

Otras especies aisladas de las glándulas mamarias analizadas fueron *C. zeylanoides*, *C. norvegica*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*. Estas especies han sido reportadas en casos de mastitis clínica^{3, 13} y son consideradas patógenos oportunistas^{3, 7}. Sin embargo, es reconocido el potencial patógeno de *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*, aunque los resultados de este estudio, sugieren que *C. norvegica* podría estar actuando de manera similar a *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*, debido a que las tres especies de *Candida* fueron encontradas predominantemente en las muestras de leche de animales con mastitis clínica. En adición, el aislar a *C. parasilopsis* únicamente de las muestras de animales con mastitis clínica, apoya el carácter patógeno de esta especie de *Candida*^{7, 11}.

Con relación a los porcentajes de aislamientos de *C. albicans* sólo de glándulas mamarias con mastitis, están en concordancia con la reconocida patogenicidad de esta especie y con los reportes de Langoni *et al.*⁵, Krukowski *et al.*⁷ y Casia *et al.*³.

Los hallazgos con relación a *C. viswanathii*, la cual fue encontrada en 7.5% (6/89) de las levaduras aisladas de animales sanos y en 2.6% (1/38) de las muestras de animales con mastitis subclínica pero no de

mastitis clínica, podrían sugerir que esta especie de *Candida* es una levadura oportunista.

Con relación a *C. kefyr*, su presencia estuvo relacionada con la leche de mastitis clínica, lo cual ha sido reportado previamente ^{7, 14}. Sin embargo, en contraste con lo informado en Europa por Lagneau *et al.* ¹¹ y Krukowski *et al.* ⁷, quienes aislaron esta especie de *Candida* en un 22.5% y 24.1% respectivamente, en este estudio no se encontró como una especie de *Candida* predominante en los grupos analizados, siendo aislada en menos del 3%. Las diferencias en los porcentajes de aislados de *C. kefyr* en mastitis micótica, es posible que tenga relación con el sitio geográfico del cual fueron aisladas, considerando que los reportes de mayores aislados como se mencionó anteriormente se encuentran en Europa, mientras que en México y Brasil aún no es una especie que se encuentre con frecuencia como es el caso de *C. krusei*. Al respecto, en este estudio no se encontró una correlación con las especies aisladas de *Candida* y el origen de las muestras, siendo necesario en un futuro obtener muestras de otras zonas de México con la intención de conocer si la presencia de una determinada especie de *Candida* tiene relación con la zona geográfica.

El aislamiento de numerosas especies diferentes a *C. albicans* de bovinos con mastitis es acorde con diversos reportes ^{3, 7, 11}, los cuales reconocen como uno de los principales factores predisponentes para la infección por levaduras la terapia con quimioterapéuticos antibacterianos. Otros autores mencionan que la presencia de levaduras en la glándula mamaria puede verse favorecida por el contacto que tienen los animales con los diversos

sustratos en los que éstas pueden ser encontradas como suelo, agua y plantas ^{3, 7, 13}. Aún cuando en humanos, *C. albicans* sigue siendo la especie más frecuente en la mayoría de las manifestaciones clínicas, se ha observado un incremento de aislamientos de otras especies de *Candida*, situación semejante a lo que sucede en los casos de mastitis clínica en bovinos, donde los reportes anteriores y éste trabajo indican un aumento de especies diferentes a *C. albicans* como causantes del proceso infeccioso ^{13, 64, 65}. No existe una evidencia clara para explicar lo anterior, sin embargo la susceptibilidad de *C. albicans* hacia determinados antimicóticos a diferencia de la resistencia natural o adquirida de algunas especies de *Candida* a los mismos, podrían ser un camino para dilucidar este fenómeno.

Por otra parte, un número bajo de levaduras fueron identificadas como *Candida* spp. con la metodología bioquímica utilizada. Es conocido, el hecho, de que los métodos de identificación de rutina para levaduras que se basan en características morfológicas y bioquímicas, además de requerir de un período prolongado para su realización, en considerables ocasiones presentan inconsistencias que dificultan la identificación de las especies diferentes a *C. albicans* ^{20, 27}.

Con relación a las pruebas de susceptibilidad, estas se llevan a cabo con aislados de levaduras de pacientes con procesos de SIDA, trasplantes, cáncer, y que han recibido una terapia prolongada con antimicóticos, lo anterior debido al incremento de resistencia natural o adquirida de algunas especies del género *Candida* hacia las sustancias antimicóticas.

Aún cuando el fenómeno de resistencia de las levaduras ha sido reportado hacia la mayoría de los antimicóticos, los estudios se enfocan a los derivados azólicos, en particular al fluconazol, ya que esta droga es la preferida en la terapia por su actividad fungistática hacia el hongo, a diferencia de los derivados poliénicos como es el caso de la anfotericina B que tiene una acción fungicida ⁶⁸.

La evaluación de la susceptibilidad a antimicóticos realizada en este estudio es una de las primeras que se llevan a cabo en México de levaduras aisladas de glándulas mamarias de bovinos sanos y con mastitis.

Las levaduras aisladas de *C. glabrata* provenientes de glándulas mamarias con mastitis clínica presentaron una susceptibilidad del 95% a la 5-fluorocitosina, y una alta resistencia a nistatina y a los azoles, superior al 90% y 95%, respectivamente. Mientras que los aislados de *C. krusei* presentaron una resistencia de más del 70% a itraconazol y anfotericina B y mayor al 90% para fluconazol, 5-fluorocitosina y nistatina. Con relación a los azoles, en particular, fluconazol, los porcentajes obtenidos de los aislados de *C. glabrata* y *C. krusei* confirman lo reportado por diversos autores con respecto a la resistencia intrínseca de estas levaduras al fluconazol ^{41, 43, 45, 69, 70, 71}, así como la clara susceptibilidad de los aislados de *C. glabrata* a la 5-fluorocitosina cercana al 95% y la evidente resistencia de los aislados de *C. krusei* con un porcentaje mayor al 90% para el mismo antimicótico. La susceptibilidad a la 5-fluorocitosina de los aislados de *C. glabrata* concuerdan con reportes sobre la susceptibilidad a

este antimicótico ^{45,72}. Con relación a los aislados de *C. krusei*, es también conocida la resistencia intrínseca de esta especie de *Candida* a la 5-fluorocitosina, situación que se sustenta aún más con el alto porcentaje de resistencia encontrado en este estudio. Los patrones de susceptibilidad a los antimicóticos obtenidos tanto en los aislados de *C. glabrata* y *C. krusei*, confirman lo reportado en la literatura para ambas especies.

Con relación a los aislados de *C. albicans*, cabe resaltar la susceptibilidad de esta especie a la 5-fluorocitosina, situación que concuerda con lo reportado por Cuenca-Estrella en 2001 ⁷³ y Pfaller *et al.* en 2002 ⁷⁴, quienes obtienen una susceptibilidad a la 5-fluorocitosina mayor al 97% en aislados de *C. albicans* obtenidos de sangre y de otros fluidos corporales.

En general, la susceptibilidad a la 5-fluorocitosina ha sido reportada en un porcentaje mayor a 95% para diferentes especies de *Candida* aisladas de humanos principalmente de cavidad oral, vaginal y de sangre, por ejemplo *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr* y *C. tropicalis* ⁷⁴. Lo anterior concuerda con lo encontrado en el presente estudio, donde el porcentaje de susceptibilidad a este antimicótico fue mayor al 95% para los aislados de *C. glabrata*, *C. albicans* y *C. viswanathii* mientras que *C. zeylanoides* y los aislados de *Candida* spp presentaron una susceptibilidad mayor al 70%, mientras que *C. norvegica* presentó tan sólo una susceptibilidad cercana al 15%. A este respecto, son pocos los estudios que refieren desarrollo de resistencia a este fármaco; Cuenca-Estrella *et al.* ⁷³ reportaron porcentajes de resistencia

menores al 2% en aislados de *C. albicans* y *C. parapsilosis* y de un 6.9% para *C. lusitaniae*⁷³. La resistencia primaria a 5-fluorocitosina es poco común y aún no clara para este antimicótico.

En humanos, se ha observado que la resistencia antifúngica depende de la interacción entre el hospedero, el fármaco y el hongo; siendo los factores inherentes al paciente con frecuencia los más relevantes para definir resistencia^{64, 69, 70}, en los animales poco se sabe al respecto, debido entre otras causas a que los animales con padecimientos por levaduras, en particular en los casos de mastitis micótica, difícilmente son diagnosticados y por consiguiente no se implementa un tratamiento con antimicóticos. Por lo anterior, con este estudio en particular, no se puede definir cuál o cuáles factores influyeron en la presencia de resistencia a antimicóticos de las levaduras aisladas. Es conveniente continuar con las pruebas de susceptibilidad/resistencia de levaduras aisladas de animales con diversos procesos infecciosos que permitan conocer cuáles son los factores involucrados en la presencia de resistencia a antimicóticos y si éstos están en concordancia con lo reportado en humanos.

Por otro lado, es conveniente mencionar que al igual que en las pruebas de susceptibilidad a antimicóticos, este es uno de los primeros estudios que utiliza métodos moleculares para: a) corroborar la identificación por métodos fenotípicos de levaduras de muestras de mastitis y b) caracterizar especies de *Candida* que con la metodología bioquímica sólo fueron identificadas hasta el nivel de género.

Con los ensayos de RAPD-PCR se logró corroborar la identificación bioquímica de los aislados de *C. glabrata* y *C. krusei*. Los productos de reacción de los aislados de *C. glabrata* originados con el iniciador OPE 18, permitieron formar 5 grupos de acuerdo al número de bandas observadas. El fragmento común de 945 pb en los cinco grupos distingue a los aislados de esta especie. En contraste, con el iniciador OPA 18 se generaron 7 grupos, en los cuales se observan de dos hasta siete bandas en cada uno, sin encontrarse una banda común en los grupos como es el caso con OPE18.

Para los aislados de *C. krusei* ocurrió una situación similar a la observada para *C. glabrata*, aunque para ambos iniciadores se formaron 7 grupos, OPE 18 permitió observar una banda común de 653 pb común a seis de los grupos de 653 pb, que sería la banda que distingue a los aislados de esta especie. Los patrones generados en las reacciones de RAPD-PCR con los diferentes iniciadores fueron altamente consistentes para la identificación de ambas especies. De acuerdo a los patrones observados con ambos iniciadores en los casos de *C. glabrata* y *C. krusei*, al parecer el iniciador OPE 18 permite la observación de una banda común en cada caso, situación que difiere con los fragmentos generados con OPA 18 donde la diversidad de genotipos es más amplia.

Con el iniciador OPE 18 se logró la agrupación de 8 aislados de *Candida* spp., siendo sus perfiles de RAPD coincidentes con los de *C. glabrata*. Asimismo, con el iniciador OPA 18 se agruparon 3 aislados de *Candida* spp., los cuales presentaron perfiles de RAPD coincidentes con *C. krusei*.

Con el resto de los aislados de *Candida* spp y el grupo de las diferentes especies de *Candida* se originaron una gran variedad de fragmentos con los iniciadores utilizados dificultando su agrupación y/o identificación.

Aún cuando los ensayos de RAPD-PCR han sido ampliamente utilizados para desarrollar marcadores genéticos en distintas especies y para discriminar entre variedades y aislamientos de levaduras patógenas, el número de fragmentos de la reacción, la intensidad de amplificación y la reproducibilidad de los resultados dependen tanto de las condiciones de amplificación como de los componentes de la mezcla de reacción^{75, 76}. En el presente estudio se utilizaron los iniciadores OPE 18 y OPA 18 así como las condiciones de reacción sugeridas por Bautista *et al.*, quienes obtuvieron patrones consistentes con bandas únicas para *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* y *C. guilliermondii*, aisladas en su mayoría de diversos procesos infecciosos en humanos³⁵. Considerando la gran variedad de especies de *Candida* aisladas en este estudio y observando los diferentes patrones de bandas generados, es necesario estandarizar la prueba para encontrar las condiciones adecuadas para su óptimo desarrollo en la caracterización de levaduras aisladas de muestras de mastitis, una vez estandarizada, sería adecuado sumar a las levaduras obtenidas de leche, otras de diversos procesos infecciosos en bovinos y en diferentes especies animales.

Aún cuando la identificación (morfológica-bioquímica) consume tiempo y la variabilidad de expresión de características fenotípicas dificulta la

caracterización, en este estudio fueron adecuadas para identificar el 83.5% del total de las levaduras obtenidas. Los ensayos moleculares, en este caso el RAPD-PCR fue útil para apoyar la caracterización de especies como *C. glabrata* y *C. krusei*, además de detectar diferentes grupos genotípicos entre aislados de una misma especie del género *Candida*.

El presente estudio permitió conocer la prevalencia actual de las levaduras presentes en las glándulas mamarias de bovinos sanos y con mastitis subclínica y clínica, así como determinar los patrones de susceptibilidad a antimicóticos. Esta información será de utilidad para continuar con estudios que ayuden a dilucidar con mayor claridad el papel que juegan las levaduras en la mastitis bovina, lo cual en consecuencia puede mejorar la calidad y producción de la leche y la recuperación del animal, disminuyendo de esta manera las pérdidas económicas generadas por este proceso infeccioso.

6. CONCLUSIONES

1. La metodología tradicional utilizada permitió la identificación del 84% de las levaduras aisladas en el total de las muestras de leche glándulas mamarias sanas y con mastitis subclínica y clínica.
2. Las pruebas de susceptibilidad a antimicóticos permitió conocer el comportamiento de las levaduras aisladas de origen animal frente a cinco antimicóticos diferentes, siendo útil como un parámetro de identificación para los aislados de *C. glabrata* y *C. krusei*.
3. Con los ensayos de RAPD-PCR se corroboró la identificación bioquímica de los aislados de *C. glabrata* y *C. krusei*.
4. Los mayores porcentajes de aislamientos de levaduras se encontraron en las muestras de leche de glándulas mamarias sanas y con mastitis clínica.
5. En las glándulas mamarias sanas *C. glabrata* fue la especie aislada con mayor frecuencia mientras que en las glándulas mamarias con mastitis clínica fue *C. krusei*.
6. Se logró establecer grupos de relación con la identificación bioquímica y los patrones de susceptibilidad en los aislados de *C. glabrata* y *C. krusei*.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Costa EO, Ribeiro AR, Watanabe ET, and Melvilla PA. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. J Vet Med 1998. B 45: 65-71.
2. García ME, Blanco JL. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. Rev Iberoam Micol 2000; 17: S2-S7.
3. Casia dos Santos R, Marín JM. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. Mycopathologia. 2005; 159: 251-253.
4. González, R. Mastitis Lesson B. 2003; <http://vie.dis.strath.ac.uk/vie/CaDDiS/docs/Mastitis.html>)
5. Langoni H, Domínguez 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.
6. Gunduz K, OK, U. Studies on isolation and sensitivities to various antimycotics of mycotic agents causing clinical and subclinical mastitis in Kenya region. Veterinary Control and Research Institute. 1999.
7. 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. 2000; 150 (1): 5-7.

-
-
8. 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.
 9. Costa EO, Gandra CR, Pires MF, Coutinho SD, Castillo W, Teixeira CM. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of Sao Paulo, Brazil. *Mycopathology* 1993; 124: 7-13.
 10. Elad D, Yehuda N, Winkler M, Klinger I, Fuchs V, Saran A, Faingold D. Feed contamination with *Candida krusei* as a probable source of mycotic mastitis in dairy cows. *JAVMA*. 1995; 207 (5): 620- 622.
 11. Lagneau PE, Lebtani K, Swinne D. Isolation of yeast from bovine milk in Belgium. *Mycopathology* 1996; 135 (2): 99-102.
 12. Langoni H, Domínguez PF, Chi KD, Pardo RB, Da Silva AV, Cabral KG, Rosa C. Participación de levaduras, algas y hongos en mastitis bovina. *Vet e Zoot*. 1998; 10: 89-98.
 13. Williamson JH, di Menna ME. Fungi isolated from bovine udders, and their possible sources. *New Zealand Vet J* 2007; 55 (4): 188-190.
 14. Ognean L, Pusta D, Oana L. Signals regarding the isolation of chlorophyll-free algae in the milk of some healthy cows and some with mamitis. *JCEA* 2001; 2: 1-2.
 15. Stevens FL.: Aislamiento e identificación de hongos patógenos de leches procedentes de bovinos con mastitis. Tesis de licenciatura.
-

-
-
- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, México., D.F. 1965.
16. Zavala SI.: Incidencia de los géneros *Mucor*, *Aspergillus* y *Penicillium* en leches procedentes de bovinos con mastitis. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México, D.F. 1966.
 17. Lagunes S. y Brewer H.: Mastitis causada por un hongo del género *Geotrichum*. XI Reunión anual del I.N.I.P. (memorias) México, D.F. (1974).
 18. Murillo SE.: Aislamiento e identificación de levaduras en leche de vacas clínicamente afectadas por mastitis. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1978.
 19. Félix JE.: Aislamiento e identificación de especies del género *Candida* en leche de vacas con mastitis subclínica y clínica de curso crónico. Tesis de Lic. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 1996.
 20. Freydere AM, Guinet R, Boirin P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med. Mycol.* 2001. 39:9-33.
 21. McGinnis MR. *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. New York, Academic Press. 1980.
 22. Linares SMJ, Solís CF. Identificación de levaduras. 2001. <http://www.guía.reviberoammicol.com/Capítulo11.pdf>.
-

-
-
23. Bonifaz A.: Micología Médica Básica. Editor Francisco Méndez Cervantes. México, 2002.
 24. Jawets E, Melnick JL, Adelberg EA. Microbiología Médica. 12a. edición. Ed. El Manual Moderno. Mexico, D.F. 1987.
 25. Kurtzman PC, Fell JW. The yeast, A Taxonomic study. 4th ed. Elsevier Science, Florida. U.S.A. 1998.
 26. Campbell CM, Stewart LJ. The Medical Mycology. John Wiley and Sons. INC. U.S.A. 1980.
 27. Pontón J. Diagnóstico microbiológico de las micosis. Rev. Iberoam Micol 2002; 19:25-29.
 28. Fujita S, Senda Y, Nakguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. J Clin Microbiol 2001; 39: 3617-3622.
 29. Esteve ZB, Belloch C, Uruburu F, Querol, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Internat. J System Bacteriol 1999; 49: 329-337.
 30. Guzmán DAM. Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras. Rev Chil Infect 2004; 21 (1): 39-47.
 31. Orberá RT. Molecular identification methods of yeasts of biotechnological interest. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 15-19.
 32. Thanos M, Schönian J, Meyer W, Schweynoch C, Gräcer Y, Mitchell TG, Presber W, Tietz HJ. Rapid identification of *Candida*
-

-
-
- species by DNA fingerprinting with PCR. J Clin Microbiol 1996; 34:615-621.
33. Steffan P, Vazquez JA, Boikov D, Xu C, Sobell JD, Akins RA. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. J Clin Microbiol 1997; 35:2031-2039.
34. Sullivan DJ, Bennett D, Henman M, Harwood P, Flint S, Mulcahy F, Shanley D, Coleman D. Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. J Clin Microbiol 1993; 31: 2124-2133.
35. Bautista MC, Boldo MX, Villa TL, Hernández-R C. Identification of *Candida* spp by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR Methods. J Clin Microbiol 2003; 41: 414-420.
36. Campos di Pinho, RJ, Regina FG, Augusto RC, Christine HR, Soares HJ. Phenotypic and genotypic identification of *Candida* spp. isolated from hospitalized patients. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 24-28.
37. Colom FM, Jover A, Ferrer C. Biología molecular en el diagnóstico de la candidiasis profunda en el paciente crítico no neutropénico. Rev Iberoam Micol 2006; 23: 26-28.
-

-
-
38. Odds CF, Bognoux ME, Shaw DJ, Bain MJ, Davidson DA, Diogo D, Jacobsen DM, Lecomte M, Li Shu-Ying, Tavanti A, Maiden CJM, Gow ARN, d Enfert, C. Molecular Ohylogenetics of *Candida albicans*. Eukaryot Cell 2007; 6 (6): 1041-1052.
 39. Sorrel CT, Chen SCA, Ruma P, Meyer W, Pfeiffer TJ, Ellis DH, Brownlee AG. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by Random Amplification of Polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. J Clin Microbiol 1996; 34 (5): 1253-1260.
 40. Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ, Vilgalys. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 1993; 31 (9): 2274-2280.
 41. Torres-Rodríguez JM, Morera Y, López O. *Candida glabrata*: Un patógeno emergente. 2004. Control Calidad SEIMC. http://www.seimc.org/control/revi_Mico/cglabra.htm.
 42. Alvarado PD, Díaz JMC, Silva V. Identificación y susceptibilidad antifúngica de *Candida* spp aisladas de micosis invasora. Influencia del porcentaje de inhibición del crecimiento para la determinación de CIM. Rev Méd Chile 2002; 130 (4).
 43. Moran PG, Sullivan JD, Coleman CD. Emergence of Non-*Candida albicans* *Candida* Species as Pathogens. *Candida and Candidiasis*. Chapter 4. 2002. Ed. ASM Press, Washington, D.C. pp 37-48.
-

-
-
44. Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad?. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 133-138.
 45. Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Reviews 1999; 12 (1): 80-96.
 46. Perea S. Resistencia de *Candida albicans* a los azoles. Rev. Esp. Quimio. 13(3):2007.
http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0300/revista.html.
 47. St-Germain M, Laverdiere M, Pelletier R, Bourgault ML, Lemeiux C, Noel G. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2 year (1996-1998) multicenter surveillance study in Quebec, Canada. J Clin Microbiol 2001; 39 (3):949-953.
 48. Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. Rev Iberoam Micol 2006; 23: 39-49.
 49. Ghannoum MA, Rex JR, Galgiani JN. Susceptibility testing of fungi: current status of correlation of in vitro data with clinical outcome. J Clin Microbiol 1996; 34: 489-495.
 50. Francis P, Walsh TJ. Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: new insights into safety, pharmacokinetics and antifungal therapy. Clin Infect Dis 1992; 15: 1003-1018.
 51. <http://www.vet.k-state.edu/depts/fahm/fam/mammar/mam.htm>.
-

-
-
52. Schalm OW, Carroll EJ, Jain NC. Bovine mastitis. USA: Lea and Febige.1971.
<http://vie.dis.strath.ac.uk/vie/CaDDiS/docs/Mastitis.html>.
 53. Arenas R.: Micología Médica Ilustrada. Editor Interamericana-McGraw-Hill. México, 2003.
 54. Segundo ZC. 1991. Manual teórico-práctico de micología médica para la carrera de Q.F.B. (prácticas y alternativas). Tesis de licenciatura. FES-Cuautitlán. UNAM.
 55. Barnett JA, Payne RW, Yarrow, D. Yeast: Characteristics and Identification. Cambridge University Press. Gran Bretaña. 1983.
 56. MacFaddin, F.J. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2d edition. Ed. Williams and Wilkins. 1980. USA.
 57. López MR, Méndez TLJ, Hernández HF, Castañón OR. Micología Médica Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. Trillas. México, D.F. 178-180. 1995.
 58. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-second edition. CLSI document M27-A2 ISBN 1-56238-469-4. USA. 2002.
 59. Ausubel FM. Editor. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley and Sons, Inc. 1994.
 60. Lockhart RS, Joly S, Pujol C, Sobel DJ, Pfaller AM, Soll RD. Development and verification of fingerprinting probes for *Candida glabrata*. Microbiology 1997; 143: 3733-3746.
-

-
-
61. Roostita R, Fleet GH. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *Int J Food Microbiology*. 1996; 31:205-219.
 62. Farnsworth, R.J. and D. K. Sorensen. Prevalence and species distribution of yeast in the mammary gland of dairy cows in Minnesota. *Can J Comp Med*. 1972; 36:329-332.
 63. Farnsworth, R.J. and D. K. Sorensen. The effect of penicillin, dihydrostreptomycin and prednisolone treatment of experimental *Candida krusei* infections of the mammary glands of dairy cattle. *Can J Comp Med* 1974; 39:340-348.
 64. Silva, V.V., Díaz, J.M.C., Febré, N. 2002. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infect* 19 (Supl. 2): S 149-156.
 65. Moretti A, Pasquali P, Mencaroni G, Boncio L, Piergili F. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria). *Zentralbl Veterinarmed B* 1998; 45 (3): 129-32.
 66. Holm C, Jepsen L, Larsen M, Jespersen L. Predominant microflora of downgraded danish bula tank milk. *J. Dairy Sci* 2004; 87: 1151-1157.
 67. Panizo MM, Reviákina V, Flores Y, Montes W, González, G. Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislados clínicos de *Candida* spp. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*. 2005; 5 (2): 64-71.
-

-
-
68. White TC, Marr KA, Borden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Reviews* 1998; 11 (2): 382-402.
 69. Kennedy HF, Shankland GS, Bagg J, Chalmers EA, Gibson BES, Williams CL. Fluconazole and itraconazole susceptibilities of *Candida* spp. Isolated from oropharyngeal specimens and blood cultures of paediatric haematology/oncology patients. *Mycoses* 2006; 49: 457-462.
 70. Ceballos SA, Gaitán CLA, Orihuela CF, Olea BD, Ceballos GL, Quindós G. Resistencia in vitro a los antifúngicos en *Candida albicans* de pacientes infectados por el VIH con y sin candidosis oral. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 194-197.
 71. Sheehan JD, Hitchcock AC, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Reviews* 1999; 12 (1): 40-79.
 72. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Casta-Cruz M, López-Ribot JL, Gaitán-Cepeda LA, Quindós G. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 83-92.
 73. Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra TM, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Flucytosine primary resistance in *Candida* species and
-

-
-
- Cryptococcus neoformans*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 276-279.
74. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, Messer SA, The SENTRY participant group. International surveillance of bloodstream infections due to candida species: frequency of occurrence and In Vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. J Clin Microbiol 2001; 39 (9): 3254-3259.
75. Sansinforiano ME, Rabasco A, Martínez-Trancón M, Parejo JC, Hermoso MM, Padilla JA. Optimización de las condiciones RAPD-PCR en *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 65-69.
76. Guzmán AM. Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras. Rev Chil Infect 2004; 21 (1): 39-47.
-