



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CARACTERIZACIÓN MICOLÓGICA DE LEVADURAS EN
MUESTRAS DE LECHE DE BOVINOS CLÍNICAMENTE SANOS
Y CON MASTITIS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

ISRAEL BECERRIL CASTAÑEDA

ASESORES:

DRA. CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA

DR. DAVID ALEJANDRO CONTRERAS CARO DEL
CASTILLO



Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Enero 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que desde el bachillerato me abrió las puertas y me ha ofrecido de todo: amigos, colegas, compañeros, historias, aventuras y enseñanzas.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a sus centros de enseñanza, que me dieron y brindaron la información con la cual no estaría hoy aquí, y que me dio un segundo hogar.

Al Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME, DGAPA-UNAM) PE206819 titulado “Desarrollo de estrategias multimedia para la elaboración, la adecuación y mejora de los recursos didácticos en Micología Veterinaria”, que sin su financiamiento no sería posible este proyecto.

A mi familia y amigos que siempre estuvieron ahí, apoyándome a lo largo del camino de la vida, quienes siempre me han impulsado a mejorar tanto profesionalmente como personalmente.

A mis asesores que estuvieron ahí en las buenas y en las malas, apoyándome y brindándome su apoyo y conocimientos, para realizar este proyecto, uno de tantos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, en especial a mis padres Noe y Magdalena, por siempre estar ahí en mis momentos mas complicados, que sin importar los problemas o diferencias que tengamos siempre han estado ahí para apoyarme y ayudar para salir adelante como persona. A mi hermana Noemi, por ser parte de mi vida y ser cómplice durante toda mi vida y guiarme por buen camino, a cometer errores en la vida y que, si se cometen, todo tiene solución y no complicarse la vida. A todos que, sin importar diferencias, gustos, disgustos, momentos hermosos, peleas y discusiones, siempre los voy a amar y querer, sin importar nada, son una parte muy importante en mi vida.

A mis abuelos, tíos y primos, con quienes he compartido experiencias y aventuras, y que espero seguir compartiendo durante toda la vida, porque a pesar de que la familia no se escoge, agradezco la familia que me tocó.

A mis asesores, la doctora Carolina Segundo Zaragoza y el doctor David Alejandro Caro Contreras Caro del Castillo, por impulsarme a seguir adelante, a todas la enseñanzas y aprendizajes que me brindaron, pero en especial a la paciencia que se me dio a lo largo de todo este nuevo proceso.

A los amigos que hice en el bachillerato y que siguen conmigo: María Fernanda, Miguel, Daniel, David, Salvador, Paulet, Benjamin y demás que no terminaría la lista, por brindarme su amistad y seguirlo haciendo sin importar la distancia, puesto que es una amistad fuerte y duradera, por ser ellos la familia que escogí.

A los amigos de la Facultad: Saida, Rosa, Fernando y Guillermo, por seguirme alentando en este duro camino, haciendo que el difícil camino de la vida tiene solución y que se puede disfrutar del camino. En especial a Guillermo Segura, quien ha sido pieza fundamental en mis últimos años de la carrera, porque hizo de mis últimos días los mejores, y que lo seguirá siendo por el resto de la vida, porque nunca dejó que me rindiera, siempre me apoyo en las buenas y en las malas, que a pesar de que no exprese con palabras mis sentimientos, siempre sabrá que lo amó, al igual que a mis amigos y familia.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Importancia de la leche de vaca	3
1.2. Clasificación de la mastitis	4
1.2.1. Conteo de células somáticas.....	6
1.2.2. Prueba de tazón de fondo oscuro.....	7
1.2.3. Prueba de California (CMT).....	7
1.3. Mastitis micótica.....	8
1.3.1. Identificación clásica o tradicional	9
1.3.2. Morfología	10
1.3.2.1. Macroscópica	10
1.3.2.2. Microscópica	10
1.3.3. Características bioquímicas y enzimáticas.....	11
1.3.3.1. Susceptibilidad a la ciclohexamida al 0.1%.....	11
1.3.3.2. Prueba de ureasa.....	11
1.3.3.3. Producción de película en caldo Sabouraud	11
1.3.3.4. Asimilación y fermentación de carbohidratos	11
1.3.4. Métodos selectivos y diferenciales	12
1.3.4.1. Agar Biggy.....	12
1.3.4.2. Medios fluorogénicos y cromogénicos	13
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivos específicos	14

4. MATERIAL Y MÉTODOS	15
4.1. Colección y conservación de muestras.....	15
4.2. Aislamiento de levaduras	16
4.3. Identificación de las levaduras	17
4.3.1 Tinción de Gram	17
4.3.2. Formación de pseudohifa	18
4.3.3. Cultivo en agar Biggy y CHROMagar <i>Candida</i>	18
4.3.4. Susceptibilidad a la ciclohexamida al 0.1%	18
4.3.5. Producción de ureasa.....	19
4.3.6. Producción de película	19
4.3.7. Asimilación y fermentación de carbohidratos.	19
4.3.8. Cuadro de identificación de levaduras.....	20
4.4. Conservación de levaduras.....	21
4.5. Captura y análisis de la información	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Aislamiento de levaduras.....	22
5.2. Pruebas de identificación	23
6. DISCUSIÓN.....	31
7. CONCLUSIONES.....	34
8. ANEXOS.....	35
9. BIBLIOGRAFÍA.....	48

INDICE DE FIGURAS

No de Figura	Descripción	Página
1	Morfología macroscópica de levaduras	22
2	Aislamiento de levaduras a partir de leche de bovinos	23
3	Morfología microscópica de levaduras	23
4	Cultivos de cepas de referencia del género <i>Candida</i> en agar Biggy y CHROMagar <i>Candida</i>	24
5	Cultivos de algunas muestras de leche en medios diferenciales	25
6	Formación de pseudohifa en agar arroz	26
7	Prueba de producción de ureasa	26
8	Desarrollo en ciclohexamida al 0.1%	27
9	Producción de película en caldo dextrosa Sabouraud	27
10	Fermentación de carbohidratos	28
11	Asimilación de carbohidratos	28
12	Asimilación de carbohidratos aislado de <i>C. krusei</i>	28
13	Fermentación de carbohidratos aislado de <i>C. krusei</i> .	28

ÍNDICE DE CUADROS

No de cuadro	Descripción	Página
1	Límites máximos de contenido microbiano para leche y sus derivados	5
2	Interpretación de la prueba de California	8
3	Características de desarrollo de especies del género <i>Candida</i> en agar Biggy	12
4	Diferenciación de las colonias de <i>Candida</i> y otras levaduras en CHROMagar <i>Candida</i> .	13
5	Identificación de levaduras de muestras de leche de glándulas mamarias de bovinos con diferente estado sanitario	30

RESUMEN

BECERRIL CASTAÑEDA ISRAEL. Caracterización micológica de levaduras en muestras de leche de bovinos clínicamente sanos y con mastitis (bajo la dirección de: Dra. Carolina Segundo Zaragoza y el Dr. David Alejandro Contreras Caro del Castillo).

La leche es un producto de interés en México y el mundo, siendo la de bovino la de mayor importancia e impacto económico. El objetivo del presente trabajo fue aislar hongos levaduriformes de muestras de leche provenientes de bovinos clínicamente sanos y con mastitis, para conocer las levaduras presentes en algunos bovinos y que puedan causar problemas en la salud del animal. Los métodos usados para la identificación de levaduras incluyeron características macroscópicas, microscópicas y fisiológicas. Se trabajaron un total de 385 muestras de leche de bovinos, 156 con mastitis subclínica, 117 con mastitis clínica y 112 clínicamente sanos. Las muestras fueron cultivadas en caldo YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) al 2%, y resembradas en SDA (Agar Dextrosa Sabouraud) adicionado con cloranfenicol, kanamicina y ampicilina. La morfología microscópica de las levaduras se confirmó utilizando la tinción de Gram. La identificación incluyó su desarrollo en agar Biggy y CHROMagar *Candida*, formación de pseudohifa, susceptibilidad a la ciclohexamida al 0.1%, formación de película en caldo Sabouraud, prueba de ureasa y, asimilación y fermentación de carbohidratos. Se obtuvieron 25.71% (99/385) de aislados levaduriformes, en su mayoría del género *Candida*. De la leche de bovinos con mastitis subclínica se obtuvieron 46 aislados, 82.61% *C. glabrata*, 8.70% *C. krusei*, 4.35% *C. guilliermondii* y 4.35% *Rhodotorula rubra*. De los bovinos clínicamente sanos se obtuvieron 28 aislados: 75% *C. glabrata*, 7.14% *C. famata*, 7.14% *C. kefir*, 3.57% *C. lusitaniae*, 3.57% *C. krusei* y 3.57% *C. guilliermondii*. Mientras que de las muestras de bovinos con mastitis clínica se obtuvieron 25 aislados, de los cuales predominó con un 48% *C. krusei*, seguido de 20% *C. glabrata*, 12% *C. tropicalis*, 8% *C. parapsilosis*, 4% *C. famata*, 4% *C. guilliermondii* y 4% *C. lusitaniae*.

Comparando con otros trabajos, se observó que existe una prevalencia del género *Candida*, de entre los cuales los más comunes que se comparan con anteriores estudios está *Candida krusei* y *C. glabrata*, como principales agentes causales de la mastitis micótica, aunque no se ha descartado a otras especies de *Candida*.

Por lo tanto, con la metodología aplicada, se pudo aislar levaduras de entre las cuales la mayoría pertenecen al género *Candida*, predominando *C. glabrata* en muestras de mastitis subclínica, y a *C. krusei* en muestras de mastitis clínica.

1. INTRODUCCIÓN

La leche constituye una fuente abundante de nutrientes, por eso es importante garantizar su inocuidad a fin de proteger la salud de los consumidores y facilitar el comercio. Los animales productores de leche pueden ser portadores de agentes patógenos para el ser humano, y la leche al ser una fuente rica en nutrientes, es el medio idóneo para su desarrollo. En las producciones se deben asegurar las buenas prácticas agrícolas y de cría de animales, para reducir al mínimo la contaminación de la leche cruda, procedente de los animales o del medio ambiente. La carga microbiana de la leche debe ser lo más baja posible utilizando las buenas prácticas de producción, la limpieza y desinfección del área de ordeño y de los equipos que tengan contacto con la leche y con los animales. Es necesario que se garantice la salud de los animales con la finalidad de mantener la inocuidad del producto final (FAO / OMS, 2009).

1.1. Importancia de la leche de vaca

La leche como parte de la nutrición humana se basa en la calidad de sus proteínas, su alta digestibilidad y alto valor biológico según el Consejo para el fomento de la calidad de la leche y sus derivados (COFOCALEC) (COFOCALEC, 2012). La composición de la leche varía de una especie animal a otra, ya que está relacionada a los requerimientos nutricionales de los recién nacidos de cada especie (Xin, et al., 2019).

La leche puede proporcionar nutrientes como proteínas de alta calidad y grasas, además de ser fuente de energía, vitaminas y minerales como vitamina B12, ácido pantoténico, riboflavina, calcio, magnesio y selenio. La calidad de la leche varía según el animal, su raza, edad y dieta, junto al estado de lactancia, el número de partos, sistema de producción, el entorno físico y la estación del año. Esto puede influir en el color, sabor y composición de la leche, características que permiten la obtención de una gran variedad de productos lácteos (FAO, 2019).

A la fecha, la leche que se consume más es la de origen bovino, por encima de la de caprino y ovino. La composición nutricional de la leche de vaca incluye de

3 a 4% de grasas, cerca de 3.5% de proteínas y un 5% de carbohidratos (lactosa), la composición química bruta varía según la raza (FAO, 2019).

Por sus características fisicoquímicas y de composición, la leche tiende a ser susceptible a contaminantes perdiendo así su inocuidad y calidad por la alteración en las condiciones higiénicas y sanitarias de su manejo, ya sea durante el ordeño, su almacenamiento y transporte (COFOCALEC, 2012).

En la Norma Oficial Mexicana 243 de la Secretaría de Salud en su versión 2010 (NOM-243-SSAI-2010) vigente hasta la fecha, se mencionan los límites máximos de contenido microbiológico de la leche de vaca y sus derivados (Cuadro 1) (Secretaría de Gobernación, 2012).

1.2. Clasificación de la mastitis

Uno de los principales problemas que afectan la calidad de la leche, se debe a la salud del animal, y de estos el más importante es la mastitis. Es un problema de distribución mundial y que afecta la economía de los ganaderos, porque disminuye el rendimiento, altera la composición de la leche y aumentan los costos de producción, al sumar el tratamiento clínico (Dodd y Booth, 2000; Yamaguchi, et al., 2019).

La mastitis puede tener su origen por factores físicos como traumatismos, humedad e higiene, por factores químicos como el uso de desinfectantes o antisépticos y por último los agentes infecciosos como virus, bacterias y hongos.

La mastitis de origen infeccioso es resultado de una reacción inflamatoria de los tejidos secretores de la glándula mamaria como respuesta a una infección bacteriana, y en menor proporción por hongos. El sistema inmunológico actúa sobre el tejido afectado para eliminar o neutralizar a los microorganismos y reparar el daño causado por los agentes infecciosos, para así restablecer la función normal de la glándula (Saran y Chaffer, 2000; Foster, 2017).

Cuadro 1. Límites máximos de contenido microbiano para leche y sus derivados.

Microorganismo	Límite máximo	Productos
Organismos Coliformes totales	≤ 100 UFC/g o mL	Helados y sorbetes. Quesos de suero
	≤ 50 UFC/g o mL	Bases o mezclas para helados.
	≤ 20 UFC/g o mL	En punto de venta: Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados.
	≤ 10 UFC/g o mL	En planta: Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados o deshidratados. Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche.
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤ 10 UFC/ mL por siembra directa	Leche, fórmula y producto lácteos combinado pasteurizado.
	≤ 100 UFC/g o mL	Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche. Quesos madurados y quesos procesados
	1000 UFC/g	Quesos frescos y quesos de suero
<i>Salmonella spp</i>	Ausente en 25g o mL	Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado: pasteurizados y deshidratados. Quesos frescos, madurados y procesados. Quesos de suero. Cremas, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche*, helados, sorbetes y bases para helados. Mantequillas.
<i>Escherichia coli</i>	100 UFC/g o mL	Quesos frescos.
	≤ 3 NMP/g o mL	Leche utilizada como materia prima para la elaboración de quesos. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; deshidratados.
	≤ 10 NMP/g	Quesos madurados y procesados.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente en 25g o mL	Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados ** Quesos. Quesos de suero. Helados, bases para helados y sorbetes. **.
<i>Vibrio cholerae</i> ***	Ausente en 25g	Quesos frescos. Helados, sorbetes y bases para helados.
	Ausente en 50g	Quesos de suero.
Enterotoxina estafilococcica	Negativa	Leche, fórmula y producto lácteos combinado; deshidratados y la que se emplee como materia prima para elaboración de quesos. Quesos frescos, madurados y procesados. Helados, sorbetes y bases para helados.
Toxina botulínica**	Negativa	Quesos frescos, madurados y procesados, envasados al alto vacío.
Mohos y levaduras	500 UFC/g o mL	Quesos frescos, madurados*** y quesos de suero.
	100 UFC/g o mL	Quesos procesados.
	50 UFC/g o mL	Bases o mezclas para helados.
Mesofílicos aerobios	200,000 UFC/g o mL	Helados y sorbetes.
	100,000 UFC/g o mL	Bases para helado.

Tomado de: Secretaría de Gobernación, 2012. *Diario Oficial de la Federación*. [En línea] Disponible en: <http://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>

La mastitis dependiendo de la signología y el grado de reacción ante la infección o al traumatismo, se divide en:

- a) Mastitis clínica, se caracteriza por presentar signos como inflamación observable, dolor a la palpación, hipertermia (fiebre) y letargo, además de cambios macroscópicos en la leche, como cambio de color, de consistencia y presencia de grumos (Underwood, et al., 2015). La mastitis clínica, a su vez se divide según su severidad en mastitis clínica subaguda, aguda e hiperaguda; en la presentación subaguda se ven anormalidades en la leche como coágulos, descamaciones o suero descolorido, sin signos aparentes o leves de inflamación; mientras que en la presentación aguda, además de ver alteraciones en la leche, la mama afectada muestra signos de inflamación; en la mastitis clínica hiperaguda, además de los signos anteriores se suma hipertermia (fiebre), deshidratación, anorexia y dolor.
- b) Mastitis subclínica, la cual no presenta signos observables, y tanto el animal como la ubre y la leche parecen normales. Este tipo de mastitis es prolongada o crónica (lactancias continuas), y la detección se realiza mediante pruebas de campo como: la prueba de tazón de fondo oscuro para el diagnóstico temprano de mastitis clínica y la prueba de California (CMT, por sus siglas en inglés) y junto con estas, también se realiza el conteo de células somáticas (Saran y Chaffer, 2000; Fariñas Guerrero, et al., 2016).

1.2.1. Conteo de células somáticas

Las células somáticas son células blancas propias del organismo que sirven como mecanismo de defensa contra organismos patógenos.

El conteo de células somáticas (CCS) es el número de células por mililitro de leche, por lo tanto, es un buen indicador para la concentración de leucocitos en leche. El CCS es un medio auxiliar de diagnóstico para juzgar el estado de salud de la ubre y la calidad de la leche (Hernández & Bedolla, 2008).

Esta evaluación se realiza a través de una serie de métodos, los cuales se clasifican de acuerdo con su forma de medición: directa (recuento de partículas) e indirecta (interacción ADN-agente tensoactivo). Los métodos de medición directa son: Recuento Microscópico Directo (RMD), Recuento Celular Electrónico mediante el contador de partículas Coulter Counter y el Fossomatic; mientras que los métodos de medición indirecta se encuentran la prueba de California (CMT), prueba de Wisconsin (WMT), viscosímetro y ADN-filtro (Melo, 1998).

1.2.2. Prueba de tazón de fondo oscuro

Es una prueba rápida y se realiza antes del ordeño de los bovinos, consiste en la detección de grumos (tolondrones) en la leche haciendo pasar de 2 a 4 chorros de la leche a través de una malla negra y recibiendo la leche en un tazón (Blanco, 2018). Los coágulos, escamas, hilos, materia fibrosa, secreciones acuosas o color anormal son indicativos de problemas en la glándula mamaria (Bedolla, et al., 2007).

En campo, se hace la observación y palpación de la ubre, se realiza primeramente alguna prueba física como por ejemplo la prueba de tazón de fondo oscuro, las cuales ayudan a un diagnóstico temprano de mastitis clínica y subclínica, después se pueden realizar las pruebas químicas como son la prueba de conductividad eléctrica de la leche (aumento de conductividad eléctrica de la leche debido a su mayor contenido electrolítico especialmente iones de sodio y de cloro, que se mide con un aparato eléctrico y portátil), el papel indicador de mastitis y la prueba de Whiteside, que sirven para diagnosticar mastitis clínicas y subclínicas. Después, se realizan las pruebas biológicas, como son la prueba de California, la prueba de Wisconsin, el monitoreo de células somáticas y el diagnóstico bacteriológico (aislamiento, cultivo, tinción, pruebas bioquímicas e identificación, así como el conteo de células somáticas por microscopía directa) (Bedolla, 2018).

1.2.3. Prueba de California (CMT)

La prueba de California (CMT) es cualitativa, y ayuda en el diagnóstico oportuno de mastitis subclínica, principalmente en rumiantes (Firth, et al., 2019). Consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquil-aril sulfonato de sodio, el cual lisa las células (principalmente neutrófilos) causando la liberación del ADN, y al

combinarse con los agentes proteicos de la leche forma un gel. Cuando hay inflamación, en la leche se eliminan una gran cantidad de células somáticas, y a mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto, mayor será el gel producido. Además, la prueba posee un colorante (púrpura de bromo-cresol) que indica los cambios de pH ocurridos en la leche a raíz de la inflamación. La interpretación de los resultados va desde negativo a trazas y niveles 1, 2 y 3 (Cuadro 2) (Saran & Chaf fer, 2000).

Cuadro 2. Interpretación de la prueba de California.

Cantidad de células somáticas	Escala	Estado sanitario
<200,000	Negativo	Sano
150,000-500,000	Trazas	Ligera mastitis
400,000-1,500,000	1	Mastitis severa
800,000-5,000,000	2	
>5,000,000	3	

Se considera como animal sano si la prueba es negativa, si se obtiene como resultado trazas y hay presencia de pequeños grumos, se considera que hay un grado ligero de mastitis. Entre mayor número de células somáticas, la mastitis es más severa (COFOCALEC, 2012).

1.3. Mastitis micótica

La mastitis micótica se ha relacionado con diversos factores que favorecen la colonización de las levaduras en la ubre, tales como: lesiones en los pezones, el abuso en el uso de antibacterianos, contaminantes en los equipos de ordeño y en las manos de los ordeñadores, y en general a la falta de higiene en el área de ordeño (Dworecka-Kaszak, et al., 2012; Sartori, et al., 2014; Du, et al., 2018).

En bovinos se han reportado una variedad de hongos filamentosos y levaduriformes presentes en casos de mastitis, tales como: *Aspergillus fumigatus*, *Geotrichum spp*, *Rhodotorula spp*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon spp* y *Candida spp* (Akdouche, et al., 2018).

Las levaduras han adquirido una singular importancia en varios países incluyendo México, en particular del género *Candida*, debido al incremento en su aislamiento de casos de mastitis bovina subclínica y clínica.

En México, a partir de muestras de leche de bovinos sanos y con mastitis subclínica y clínica, se reportaron al menos 20 especies del género *Candida*, las más frecuentes fueron *C. krusei* y *C. glabrata* (Segundo, et al., 2011). Otro estudio realizado en Polonia sobre mastitis micótica bovina se aisló e identificó a: *Candida parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *Cryptococcus genus*, *Trichosporon genus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum spp* y *Rhodotorula spp* (Dworecka-Kaszak et al, 2012).

En India, en 2013, reportaron a *C. albicans*, *A. fumigatus* y *A. niger* (Pachauro et al, 2013). Por su parte, Sartori y col, en Brasil aislaron a *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. rugosa* y *Candida spp* (Sartori et al, 2014). Situación semejante se presentó en Algeria, donde se reportó a *C. keyfir*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. tropicalis*, *C. colliculosa*, *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. inconspicua* (Ksouri, et al., 2015).

Otro estudio realizado en 2017, en Colombia a partir de muestras de leche cruda de bovinos clínicamente sanos, mencionan la presencia de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Aspergillus nidulans* (Ortiz-Durán et al, 2017).

Uno de los estudios más recientes, llevado a cabo en China en 2018, reporta también en casos de mastitis bovina, el aislamiento e identificación de nueve especies del género *Candida* siendo las más frecuentes *C. krusei* y *C. parapsilosis*, y en menor proporción *C. lipolytica* y *C. lusitaniae* (Du, et al., 2018)

1.3.1. Identificación clásica o tradicional

Las levaduras son hongos unicelulares y pleomórficos, es decir, tienen diferentes formas y tamaños, pueden ser esféricas, elípticas y tener formas alargadas. En medios de cultivos sólidos, las colonias levaduriformes pueden ser secas, cremosas

o mucoides, de color blanco a beige y en algunos casos de color anaranjado (St-Germain & Summerbell, 2011; Samanta, 2015).

La identificación de los hongos levaduriformes se basa en características morfológicas y bioquímicas (Bou, et al., 2011).

Como se mencionó, los problemas de mastitis por hongos en los bovinos son ocasionados principalmente por especies del género *Candida*, por lo que en el presente trabajo la descripción de los métodos de identificación se basa en la caracterización de este género micótico.

1.3.2. Morfología

1.3.2.1. Macroscópica

Las levaduras se desarrollan bien en agar dextrosa Sabouraud (SDA), de 24 a 72 horas a temperaturas de 30 a 37°C, las colonias son de color blanco o crema, y de consistencia cremosa, generalmente redondas, elevadas, lisas, brillantes o mates (Castro Méndez & Martín Mazuelos, 2010; Pohlman & Chengappa, 2013).

1.3.2.2. Microscópica

En general los hongos levaduriformes se caracterizan por la presencia de estructuras de reproducción asexual llamadas blastoconidios, los cuales dependiendo del género y/o especie pueden ser redondos o esféricos, ovalados cortos y alargados, cilíndricos o elipsoidales. En el caso del género *Candida*, la presencia de pseudohifas es una herramienta útil en su identificación, esta estructura es una proyección alargada no septada de la levadura, la forman la mayoría de las especies del género, a excepción de *C. glabrata*. En el caso de *C. albicans* además la formación del tubo germinal y los clamidoconidios son útiles en su identificación (Pohlman & Chengappa, 2013). El tubo germinal, es 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 es tres o cuatro veces mayor que la célula madre. Los clamidoconidios son estructuras de reproducción asexual de la fase filamentosa de *C. albicans*, son redondos, de pared gruesa y miden de 6 a 12 μm de diámetro, a lo largo de la hifa se localizan laterales,

intercalares, centrales o terminales (Castro & Martín, 2010; Méndez Tovar, et al., 2012).

1.3.3. Características bioquímicas y enzimáticas

1.3.3.1. Susceptibilidad a la ciclohexamida al 0.1%

Esta prueba es usada para observar la resistencia que tienen las levaduras a este quimioterapéutico, diferenciando a *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* de *C. albicans* y *C. guilliermondii*, estos dos últimos no son susceptibles a la ciclohexamida (Kurtzman, et al., 2011).

1.3.3.2. Prueba de ureasa

La capacidad de las levaduras de hidrolizar la molécula de urea en dos moléculas de amonio se debe a la acción de la enzima ureasa, generando un incremento del pH del medio. Esta prueba permite diferenciar los géneros *Cryptococcus*, *Trichosporon* y *Rhodotorula*, los cuales son ureasa positivos, de *Candida* y *Geotrichum* que son negativos, salvo algunas excepciones como *C. krusei*, la cual puede o no presentarla (Mendoza, 2005; Kurtzman, et al., 2011).

1.3.3.3. Producción de película en caldo Sabouraud

El uso primario de esta prueba es para diferenciar a *C. krusei* y *C. tropicalis*, especies que producen una película característica (observable en tubos de ensaye) y gas cuando se desarrollan en caldo Sabouraud de otras especies del género *Candida* que no la presentan (Kurtzman, et al., 2011).

1.3.3.4. Asimilación y fermentación de carbohidratos

Las pruebas de asimilación y fermentación de carbohidratos son útiles para identificar a la mayoría de las especies de diferentes géneros levaduriformes.

En el proceso de asimilación (auxonograma) de carbohidratos, es parte del metabolismo aerobio de las levaduras dependiente de los niveles de concentración de oxígeno y dióxido de carbono (CO₂); mientras que el proceso de la fermentación

(zimograma) se lleva a cabo la degradación de azúcares en condiciones de anaerobiosis (Campbell y Reece, 2007; Méndez Tovar, et al., 2012).

1.3.4. Métodos selectivos y diferenciales

En la identificación de levaduras, incluyendo al género *Candida*, se han desarrollado medios selectivos y diferenciales que facilitan la identificación rápida de las especies aisladas con mayor frecuencia.

1.3.4.1. Agar Biggy

El agar Biggy, también conocido como medio de Nickerson, es considerado un medio selectivo y diferencial útil en el primoaislamiento e identificación de especies del género *Candida*. Su utilidad se basa en la capacidad de las levaduras de realizar una reducción extracelular del sulfito de bismuto, transformándolo en sulfuro de bismuto (sustancia insoluble de color negro). Las colonias desarrolladas en este medio, adquiere diferentes tonalidades de color café (Cuadro 3) (MCD LAB, 2019; Gil, 2019).

Cuadro 3. Características de desarrollo de especies del género *Candida* en agar Biggy

Especie	Características de colonias
<i>C. albicans</i>	Colonias lisas, circulares, café oscuro con ligero borde micelial. El oscurecimiento no difunde al medio
<i>C. tropicalis</i>	Colonias pequeñas, café oscuro con prominencia negra central y ligero borde micelial. El oscurecimiento difunde al medio después de las 72 horas de incubación.
<i>C. krusei</i>	Colonias grandes, rugosas y planas, con periferia café negruzco y halo amarillo.
<i>C. parapsilosis</i>	Colonias medianas, planas, de color café rojizo oscuro y brillante a café rojizo claro; borde micelial amarillento.
<i>C. kefyr</i>	Colonias grandes de color rojo oscuro amarronado, planas con ligero crecimiento micelial.
<i>C. famata</i>	Colonias medianas de color café a rojo oscuro brillantes con ligero crecimiento micelial.
Otros géneros levaduriformes	Colonias grandes blanquecinas a color crema. Sin producción de pigmento.

Tomado de: MCD LAB, s.f.; Gil, 2019

1.3.4.2. Medios fluorogénicos y cromogénicos

El fundamento de estos medios se basa en la detección de ciertas actividades enzimáticas de las levaduras por la hidrólisis de sustratos específicos. Ejemplos de este tipo de medios son los fluorogénicos, llamados así porque posterior a la reacción enzimática los productos fluorescen, y los medios cromogénicos en los cuales las colonias de levaduras adquieren un color característico en presencia de una mezcla cromogénica.

Los medios cromogénicos, son los más utilizados, porque no requieren del uso de luz ultravioleta para la observación de las colonias (como en el caso de los fluorogénicos) y además permiten identificar un mayor número de especies. Algunos ejemplos de medios cromogénicos son: CHROMagar *Candida*, Colorex *Candida*, Cromogen Albicans, Albicans ID2, Candida ID, VCandida IDZ (CAN2), CandiSelect y Fluroplate Candida (Castro Méndez y Martín Mazuelos, 2010). El CHROMagar *Candida* ha sido una herramienta que facilita la identificación de algunas especies de *Candida*, debido a la coloración de sus colonias, identifica bien a *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* y *C. krusei* (Cuadro 4) (Alfonso, et al., 2010).

Cuadro 4. Diferenciación de las colonias de *Candida* y otras levaduras en CHROMagar *Candida*

Género y especie	Característica de la colonia	Color
<i>C. albicans</i>	Lisa, crece a 45°C	Verde esmeralda
<i>C. dubliniensis</i>	Lisa, no crece a 45°C	Verde esmeralda
<i>C. tropicalis</i>	Lisa y cremosa	Azul oscuro con halo marrón
<i>C. krusei</i>	Rugosa seca	Rosa con halo blanco
<i>C. glabrata</i>	Brillante y cremosa	Violeta
<i>C. kefyr</i>	Lisa	Beige a rosa claro
<i>Trichosporon spp.</i>	Cerebriforme con micelio aéreo	Azul claro
<i>Saccharomyces spp.</i>	Lisa cremosa	Violeta
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Lisa y mucoso	Beige
Otras especies de <i>Candida</i>		Blanca

Tomado de: Alfonso, et al., 2010

2. HIPÓTESIS

Los principales hongos levaduriformes presentes en la leche de bovinos clínicamente sanos y con mastitis pertenecen al género *Candida*.

3. OBJETIVOS

Aislar e identificar los hongos levaduriformes presentes en muestras de leche de bovinos clínicamente sanos y con mastitis, para conocer los agentes que puedan causar mastitis.

3.1. Objetivos específicos

- Colectar muestras de leche de bovinos clínicamente sanos y con mastitis.
- Aislar los hongos levaduriformes presentes en las muestras de leche colectadas.
- Identificar mediante características morfológicas y bioquímicas a las levaduras aisladas.
- Conservar las levaduras aisladas e identificadas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Colección y conservación de muestras

Se colectaron un total de 385 muestras de leche que provenían de 98 bovinos productores de leche de raza Holstein, Jersey, cruce de Holstein con Jersey, Pardo suizo y Montbeliarde, obtenidas entre Agosto del 2019 y Enero del 2020, de los cuales 68 animales son del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA), 12 Holstein y Jersey de la comunidad de Colón en el estado de Querétaro, 8 de la cuenca lechera de Tizayuca de raza Holstein, Pardo suizo y Montbeliarde, 7 del Colegio de Bachilleres para Técnicos Agrónomos (CBTA) de raza Holstein, y 3 bovinos de raza Jersey de pequeñas producciones cercanas a la localidad de Ezequiel Montes. De los 98 animales: 38 animales del CEIEPAA presentaban mastitis subclínica, 30 bovinos del CEIEPAA clínicamente sanos y 30 con mastitis clínica: 12 de la comunidad de Colón, 8 de la cuenca de Tizayuca, 7 del CBTA y 3 de pequeñas producciones de Ezequiel Montes. De estos animales, se colectaron 156 muestras de leche con mastitis subclínica de las cuales, 4 de estas muestras fueron tomadas de un solo cuarto por vaca, porque los otros cuartos no eran funcionales debido a la edad de estas 4 vacas, que tenían en promedio 15 años de edad, estas vacas se clasificaron de acuerdo a la prueba de california realizada a las glándulas que tuvieran funcionales; 117 con mastitis clínica y 112 muestras de glándulas mamarias clínicamente sanas. Solo se muestreo una vez, es decir, una muestra por cuarto por vaca. De las vacas con mastitis subclínica y clínica, tenían tratamientos previos con antibacterianos, de los cuales se trataron con oxitetraciclina y penicilina por infecciones previas al muestreo en el CEIEPAA, del CBTA y Colón.

Los criterios de inclusión se basaron en el estado sanitario de los animales, de acuerdo con los resultados de las pruebas de Tazón de fondo oscuro y de California, realizadas previamente por los trabajadores y médicos veterinarios de cada lugar. Una vez identificados los animales y su estado sanitario, se procedió a la toma de muestras de leche, la cual se realizó en el horario de ordeño de cada lugar, posterior al lavado, desinfección de los pezones y al despunte. Se colectaron de 20 a 50 mL

de leche de cada cuarto en tubos estériles de 50 mL con tapón de rosca (muestra de cada cuarto por tubo).

Una vez obtenidas las muestras, se conservaron a 4°C y se transportaron al laboratorio de Micología Veterinaria de la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación (USEDICO) del CEIEPAA para su procesamiento.

4.2. Aislamiento de levaduras

Las muestras de leche se incubaron a 37°C durante 15 a 20 minutos, para liberar a las levaduras que se encuentran dentro de las partículas de grasa. El procedimiento de aislamiento fue el siguiente:

- a) Posterior a la incubación, los tubos se agitaron fuertemente y 2 mL de leche fueron transferidos a tubos de ensaye de 13x100 mm, una muestra por tubo, y se centrifugaron a 4000rpm (3,050 RCF (Fuerza centrífuga relativa)) durante 10 minutos.
- b) El sobrenadante se decantó, y a la pastilla se le adicionaron 2 mL de caldo YEPD al 2% (peptona-dextrosa-extracto de levadura) (anexo 1) adicionado con cloranfenicol, kanamicina y ampicilina (anexo 3). Los tubos se incubaron a 37°C por 7 días.
- c) Para detectar el desarrollo levaduriforme, se realizó la tinción de Gram (anexo 2) de los cultivos a las 24 horas, 48 horas y a los 7 días.
- d) Los tubos con desarrollo levaduriforme fueron centrifugados a 4000 rpm (3,050 RCF) durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y a la pastilla se le realizó la tinción de Gram para verificar la presencia y pureza de las levaduras. Se tomó una asada del cultivo y se realizó una resiembra en cultivo puro en cajas de Petri con Agar Dextrosa Sabouraud (SDA, por sus siglas en inglés) (anexo 1) adicionado con cloranfenicol, kanamicina y ampicilina (anexo 3). Las placas se incubaron a 37°C de 48 a 72 horas.

4.3. Identificación de las levaduras

Para la realización de las pruebas de identificación, se utilizaron como controles las siguientes cepas de referencia: *Candida albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. guilliermondii* ATCC 04121, *C. kefyr* ATCC 041219, *C. glabrata* (Instituto Pasteur), *C. lusitaniae* ATCC 34449, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258, cultivo comercial de *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodotorula rubra* aislado de queso panela fresco.

Posterior al tiempo de incubación y desarrollo de las levaduras en las placas de Petri con SDA, se observó el color, forma, consistencia, tamaño y relieve de las colonias y se procedió a realizar las siguientes pruebas:

4.3.1 Tinción de Gram

Se realizó la tinción de Gram a las colonias jóvenes y puras de los aislados en SDA, para revisar su morfología microscópica, es decir, describir su forma (redondas u ovaladas) y tamaño (largas o cortas, gruesas o delgadas).

En un portaobjetos limpio y desengrasado se colocó una gota de agua destilada estéril, y con un asa microbiológica se tomó una colonia del cultivo, mezclando de forma circular con la gota de agua destilada estéril. El frotis se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó al calor. El frotis se tiñó de acuerdo con el protocolo actualizado de la tinción de Gram desarrollada por Christian Gram en 1884 (anexo 2), donde se cubre el frotis con el colorante primario (cristal violeta) y se deja actuar de 30 a 60 segundos, se lava con agua destilada. Después, se cubre el frotis con una solución de Lugol de 30 a 60 segundos, nuevamente se lava con agua destilada. Posteriormente, se cubre el frotis con una solución decolorante (alcohol-acetona) de 1 a 3 segundos, se lava con agua destilada, y finalmente se le adiciona el colorante secundario (safranina) de 30 a 60 segundos, para después lavar con agua destilada. Se deja secar el frotis a temperatura ambiente (McGinnis, 1980). Una vez seco, se revisa en el microscopio óptico, primero con el objetivo seco fuerte (40X) y después con el objetivo de inmersión (100X).

4.3.2. Formación de pseudohifa

La formación de pseudohifa se realizó en agar arroz (anexo 1). Con un asa microbiológica, se tomó una colonia del cultivo desarrollado a 37°C durante 24 horas en SDA, y se sembró por estría continua en el centro de una caja de Petri estéril de 15 x 60 mm que contenía el agar arroz. El cultivo se cubrió con un cubreobjetos previamente flameado en alcohol y enfriado, presionando suavemente para eliminar las burbujas de aire. Las placas se incubaron a 37°C de 24 a 48 horas. La observación del desarrollo de las pseudohifas se visualiza como filamentos alrededor de la colonia, esta se realizó de dos formas: a) a simple vista, colocando la placa en un haz de luz y; b) al microscopio con el objetivo 10X.

4.3.3. Cultivo en agar Biggy y CHROMagar *Candida*

Los aislados de levaduras provenientes de un cultivo en SDA de 24 horas a 37°C, se resembraron por estría continua en cajas de Petri estériles que contenían el agar Biggy y CHROMagar *Candida* por separado. Las placas se incubaron a 37°C de 24 a 48 horas.

4.3.4. Susceptibilidad a la ciclohexamida al 0.1%

La prueba se llevó a cabo en medio líquido YNB (Yeast Nitrogen Base. Difco) adicionado con ciclohexamida a una concentración final de 0.1% (anexo 1). De un cultivo de levaduras con 24 horas de desarrollo a 37°C, se preparó un inóculo al tubo 0.5 de McFarland en SSF estéril (anexo 3). De esta suspensión se inocularon 100 µL en 1 mL del caldo de YNB con 0.1% de ciclohexamida. Se incubó a 37°C y se realizó la lectura cada 24 horas por 7 días.

La interpretación de la prueba es:

- Resistencia a la ciclohexamida = Turbidez del medio líquido
 - Susceptibilidad a la ciclohexamida = Ausencia de turbidez
- (Barnett, et al., 1983; Kurtzman, et al., 2011)

4.3.5. Producción de ureasa.

Esta prueba evalúa la capacidad de la levadura de hidrolizar la molécula de urea en dos moléculas de amonio por la acción de la enzima ureasa generando un incremento del pH del medio utilizado (Mendoza, 2005).

Se utilizaron tubos de ensaye que contenían 1 mL de caldo urea (Bioxon) esterilizado por filtración. De un cultivo de levaduras de 24 horas de desarrollo en SDA, se preparó un inóculo al tubo 0.5 de McFarland en SSF estéril (anexo 3). De esta suspensión se inocularon 100 μ L en el caldo urea (anexo 3) y se incubó a 37°C de 24 a 72 horas.

Interpretación de la prueba:

- Positiva = cambio del color del medio a color fucsia.
- Negativa = medio sin ningún cambio de color (amarillo o naranja claro).

4.3.6. Producción de película

En tubos de ensaye estériles de 13 x 100 mm se adicionaron 2 mL de caldo dextrosa Sabouraud (anexo 1), al cual se le añadieron 100 μ L de una suspensión de levaduras al tubo 0.5 de McFarland en SSF. Los tubos se incubaron a 37°C de 24 a 72 horas.

Interpretación de la prueba:

- Formación de la película = turbidez del medio, en la superficie y en las paredes del tubo se forma la película.
- No formación de película = turbidez del medio, no hay película en la superficie ni en las paredes del tubo.

(Campbell & Stewart, 1980)

4.3.7. Asimilación y fermentación de carbohidratos.

Para las pruebas de asimilación, se utilizaron tubos de ensaye de 13 x 100 mm que contenían 1 ml de caldo rojo de fenol, en el caso de los tubos para fermentación se

colocaron 5 ml del mismo caldo, además de colocar un tubo invertido (Tubo de Durhman). Los medios fueron esterilizados en autoclave. Por otro lado, se prepararon las soluciones de cada carbohidrato de prueba al 10% y se esterilizaron por filtración. Los carbohidratos se adicionaron a los tubos que contenían el caldo rojo de fenol en condiciones de esterilidad, considerando una concentración final de 1% para glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, galactosa y rafinosa, y del 0.5% para galactosa, melobiosa, celobiosa, xilosa, rafinosa, rhamnosa y trealosa. Los tubos para asimilación y fermentación con los carbohidratos incluidos fueron inoculados con 100 µL de una suspensión de levaduras al tubo 0.5 de Mc Farland e incubados a 37°C durante 7 días.

Interpretación de la prueba de asimilación:

- Positiva = acidificación del medio, hay un cambio de color de rojo a amarillo
- Negativa = no hay acidificación del medio, sin cambio de color.

Interpretación de la prueba de fermentación:

- Positiva
 - a) Acidificación del medio, cambio de color de rojo a amarillo sin producción de gas.
 - b) Acidificación del medio, cambio de color de rojo a amarillo con producción de gas.
- Negativo = sin cambio de color del medio y ni producción de gas.

(Campbell & Stewart, 1980; Barnett, et al., 1983; MacFaddin, 2000; Kurtzman, et al., 2011)

4.3.8. Cuadro de identificación de levaduras.

Con base en la información de diversos autores, y tomando en cuenta las pruebas realizadas, se generaron nuevos cuadros para la identificación final de las levaduras aisladas en el presente trabajo (Anexo 4 y 5) (Kurtzman, et al., 2011; St-Germain y Summerbell, 2011; López, 2012; Arenas, 2014).

4.4. Conservación de levaduras

Los aislados levaduriformes se conservaron mediante dos métodos:

- a) A corto plazo (refrigeración a 4°C), las levaduras fueron sembradas por estría continua en tubos de ensaye que contenían SDA inclinado, incubándose a 37°C durante 24 horas. Después se almacenaron en refrigeración a 4°C, este método permite la viabilidad de las levaduras aproximadamente por 6 meses (López Martínez, et al., 2012).
- b) A largo plazo (congelación a -20°C). Se utilizaron tubos de ensaye de 13 x 100 mm, adicionado con SDA inclinado, el cual fue inoculado con cada una de las levaduras aisladas, las cuales se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se adicionó 1 mL de glicerol estéril al 50% (anexo 3) y con la ayuda de un asa microbiológica se mezcló el cultivo con el glicerol y esta suspensión se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se refrigeraron a 4°C por 24 horas. Después de este tiempo, se almacenaron en congelación a una temperatura de -20°C. La viabilidad de las levaduras por este medio es de al menos 5 años (López Martínez, et al., 2012).

4.5. Captura y análisis de la información

Los resultados de las pruebas realizadas en la identificación de las levaduras se registraron en hojas de datos del programa de Microsoft Excel, en la cual se analizó la frecuencia en las que se obtenían diferentes géneros y especies levaduriformes.

5. RESULTADOS

5.1. Aislamiento de levaduras

De las 385 muestras de leche trabajadas, se obtuvieron 99 aislados con características levaduriformes. Se observaron diversas consistencias coloniales predominando las secas, cremosas y mucoides. Con respecto al color, hubo colonias de color blanco a beige, y en algunos casos de color anaranjado. En la Figura 1 se muestran los desarrollos de las colonias de algunas de las cepas utilizadas de referencia. En la Figura 2 se ejemplifican algunos de los cultivos de las levaduras obtenidas de las muestras de leche trabajadas, y la morfología macroscópica de las colonias.

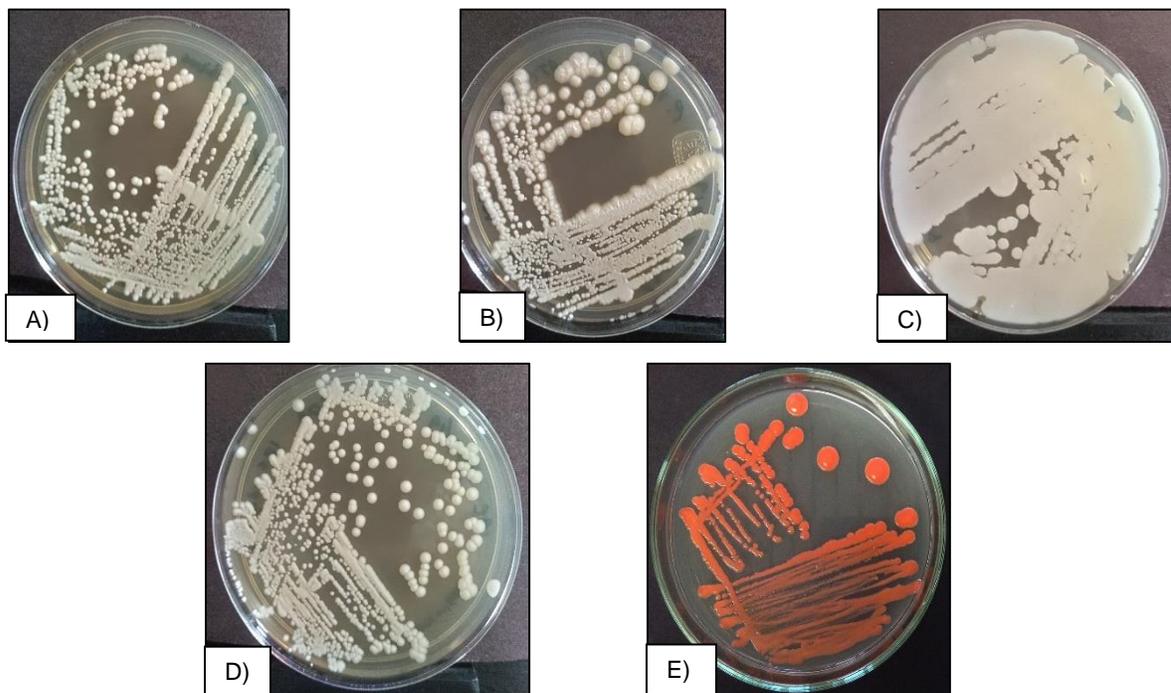


Figura 1. Morfología macroscópica de levaduras. Morfología de levaduras en SDA adicionado con antibióticos desarrolladas de 24 a 48 h a 37°C. A) *Candida albicans* ATCC 10231, colonias pequeñas, redondas, mucoides y de color blanco; B) *C. tropicalis* ATCC 750, colonias blancas, pastosas con elevación central; C) *C. krusei* ATCC 6258, colonias blancas a beige, de consistencia seca; D) *Saccharomyces cerevisiae* (comercial), colonias blancas, de consistencia pastosa; E) *Rhodotorula rubra* (caso diagnóstico), colonias mucoides de color anaranjado.



Figura 2. Aislamientos de levaduras a partir de leche de bovinos. Las colonias levaduriformes desarrolladas en SDA de 24 a 48 h a 37°C, mostraron diversas morfologías macroscópicas. Donde: 1 = Colonia blanca de consistencia seca, 2 a 6 colonias blancas, cremosas.

5.2. Pruebas de identificación

a) Morfología microscópica. Las diferentes morfologías microscópicas tanto de las cepas de referencia como de los aislados obtenidos, se realizaron con la tinción de Gram, y se observaron levaduras redondas, ovaladas cortas y alargadas, elipsoidales, entre otras (Figura 3).

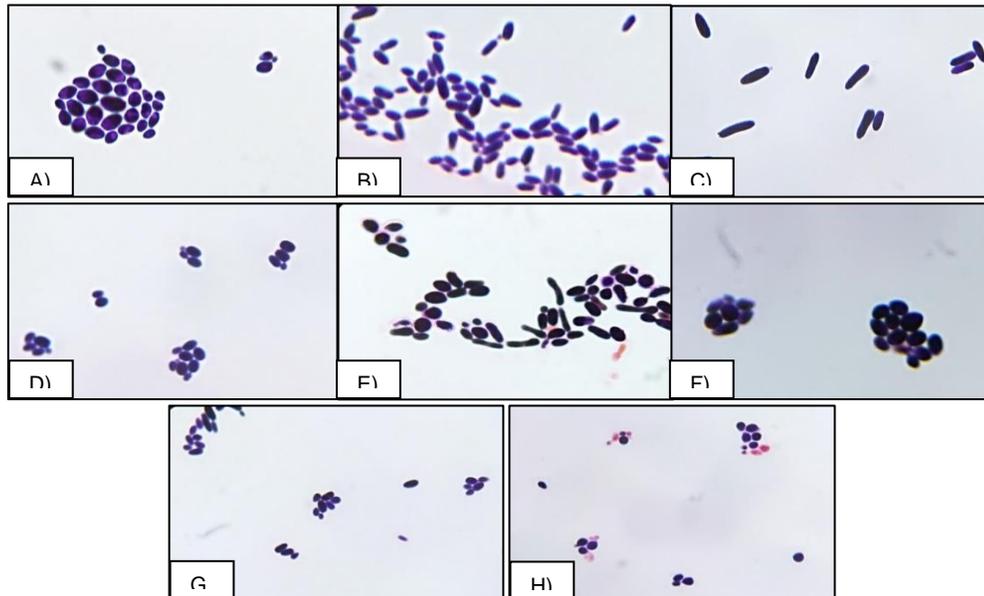


Figura 3. Morfología microscópica de levaduras. Se muestran la morfología de cultivos de referencia de levaduras: A) *Candida albicans* (redonda); B) *C. guilliermondii* (elíptica); C) *C. krusei* (alargada); D) *C. glabrata* (redonda); E) *C. tropicalis* (elíptica a ovalada corta) las alargadas son levaduras en gemación; F) *Saccharomyces cerevisiae* (elíptica); G) *C. parapsilosis* (ovaladas cortas); H) *C. kefyr* (elíptica).

b) Cultivo en agar Biggy y CHROMagar *Candida*.

Con relación al desarrollo en los medios diferenciales de agar Biggy y CHROMagar, en la Figura 4 se muestran los resultados de las diferentes cepas utilizadas de referencia para comparar con los cultivos de las levaduras obtenidas en el presente trabajo.

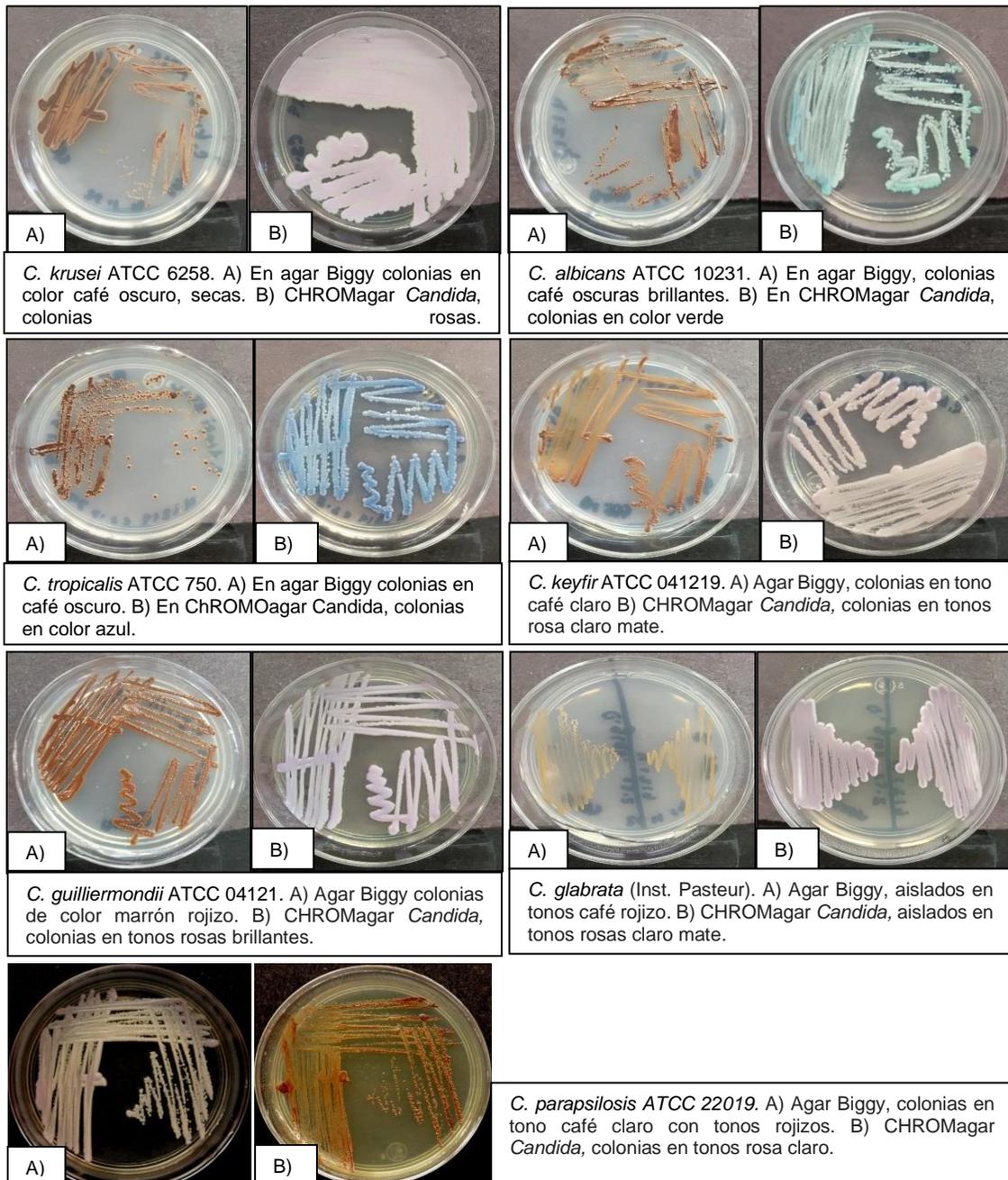


Figura 4. Cultivos de cepas de referencia del género *Candida* en agar Biggy y CHROMagar *Candida*.

Con relación al desarrollo de las colonias en el medio de Biggy de los 99 aislados, en 95 se observaron colonias con diferentes tonalidades de café, lo cual indicaban que las levaduras presentes pertenecían al género *Candida*. Con relación al CHROMagar de los 99 aislados: 64 presentaban coloración lila claro sugerente a *C. glabrata*, 17 color rosa con borde rugoso sugerente a *C. krusei* y 3 color azul sugestivo a *C. tropicalis*. (Figura 5).

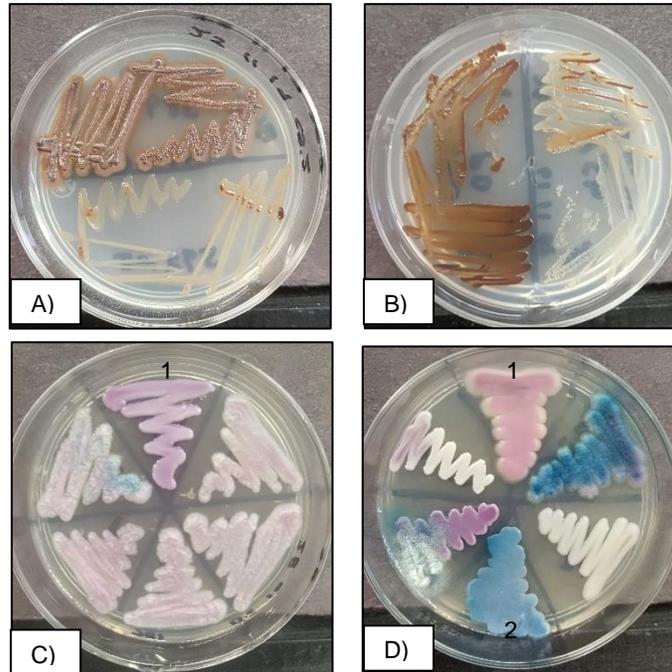


Figura 5. Cultivos de algunas muestras de leche en agar Biggy y CHROMagar.
 En agar Biggy: A) colonias sugerentes a *C. tropicalis* (superior) y *C. glabrata* (inferior); B) colonias de *C. krusei* (izquierda) y *C. glabrata* (derecha). En CHROMagar *Candida*: C) colonias sugerentes a *C. glabrata* (1), y las demás de *C. krusei*; D) colonias sugerentes a *C. krusei* (1) y de *C. tropicalis* (2).

c) Producción de pseudohifa

De los 99 aislados en agar arroz, 35 fueron negativos a la formación de pseudohifa, confirmando que esos aislados se trataban de *C. glabrata*, ya que es la única especie del género *Candida* que no la forma. En la Figura 6, un control positivo de la formación de pseudohifa y un control negativo.

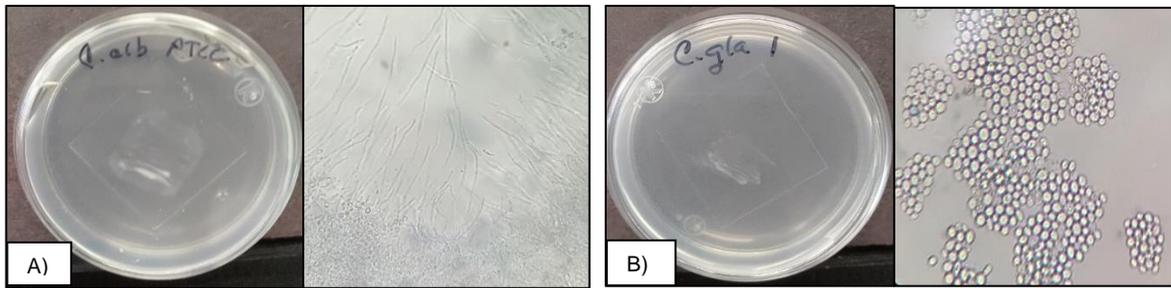


Figura 6. Formación de pseudohifa en agar arroz. A) Cultivo de *C. albicans* ATCC 10231 con formación de filamentos y observación microscópica de las pseudohifas. B) Cultivo de *C. glabrata* (Inst. Pasteur) sin formación de filamentos alrededor de la colonia, en el examen microscópico solo se observan los blastoconidios. (40X)

d) Producción de ureasa

De los 99 aislados, 88 fueron positivos y 11 negativos a esta prueba. Esta no es concluyente, porque de acuerdo con la literatura consultada, no se cuenta con el resultado de esta prueba en varias de las especies del género *Candida*, solo se menciona como positiva a algunos aislados de *C. krusei* (Figura 7).

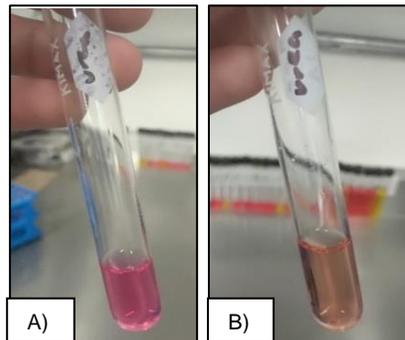


Figura 7. Prueba de producción de ureasa. La prueba se realizó para el control positivo (A) con uno de los cultivos obtenidos sugerente a *C. krusei* y para el control negativo (B) con uno sospechoso de *C. glabrata*.

e) Desarrollo en ciclohexamida al 0.1%

La prueba se realizó a los 99 aislados, los cuales fueron susceptibles y no se desarrollaron en la ciclohexamida (Figura 8).

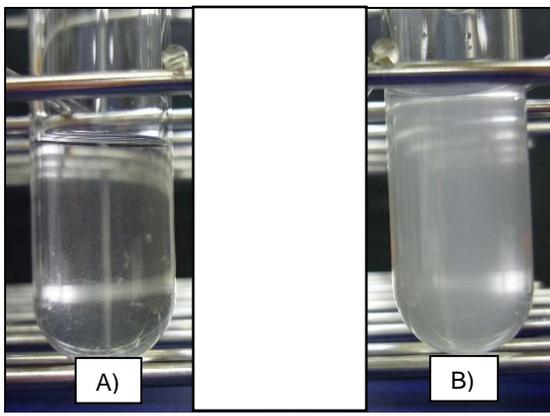


Figura 8. Desarrollo en ciclohexamida al 0.1%. Prueba realizada en caldo YNB adicionado con 0.1% de ciclohexamida. Donde: A) Cultivo de uno de los aislados obtenidos sin desarrollo; B) Cultivo de *C. albicans* ATCC 10231 con turbidez producida por el desarrollo de la levadura.

f) Producción de película en caldo Sabouraud

Se realizó a los 99 aislados obtenidos, de los cuales 32 fueron positivos a la producción de película y 67 negativos (Figura 9).

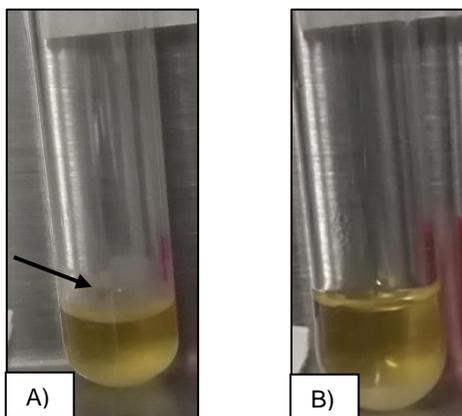


Figura 9. Producción de película en caldo dextrosa Sabouraud. A) Cultivo de uno de los aislados sugerentes a *C. krusei*, la flecha indica la película que se forma en las paredes del tubo; B) Cultivo de uno de los aislados sugerentes a *C. kefyr* sin formación de película.

g) Asimilación y fermentación de carbohidratos

Las pruebas de asimilación y fermentación se realizaron solo a 35 aislados. Lo anterior, porque de los 99 cultivos obtenidos y de acuerdo con las pruebas anteriores realizadas (tinción de Gram, cultivo en agar Biggy y CHROMagar, formación de pseudohifa, prueba de ureasa y desarrollo en ciclohexamida), 64 fueron identificados como *C. glabrata*.

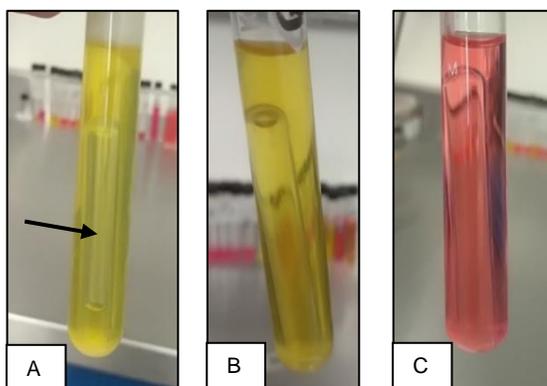


Figura 10. Fermentación de carbohidratos. A) acidificación del medio (cambio del color del medio a amarillo) y producción de gas en el tubo de Durham (señalado con la flecha), prueba ácido-gas positiva; B) acidificación del medio (cambio en el color del medio a amarillo) sin producción de gas, prueba ácido positivo; C) no hay cambio de color del medio ni producción de gas, prueba negativa.

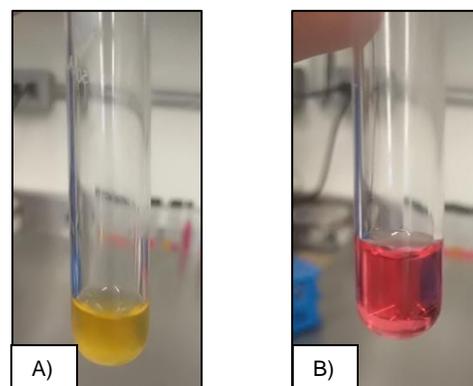


Figura 11. Asimilación de carbohidratos. A) prueba positiva, cambio de color del medio a amarillo; B) prueba negativa, medio sin cambio de color.

En la Figura 12 y 13 se ejemplifican los resultados de estas pruebas en uno de los aislados sugerente a *C. krusei*.



Figura 12. Asimilación de carbohidratos aislado *C. krusei*. Resultados de un aislado sugerente a *C. krusei*. De izquierda a derecha: Melobiosa (Mel) negativo, Arabinosa (Ara) negativo, Manosa (Man) positivo, Celobiosa (Cel) negativo, Sacarosa (Sac) negativo, Galactosa (Gal) negativo, Lactosa (Lac) negativo, Xilosa (Xil) negativo, Glucosa (Glu) positivo, Rafinosa (Raf) negativo, Trealosa (Trea) ligeramente positivo, Rhamnosa (Rha) negativo, Maltosa (Mal) negativo.



Figura 13. Fermentación de carbohidratos aislado *C. krusei*. Resultados de un aislado sugerente a *C. krusei*. De izquierda a derecha: Lactosa (Lac) negativo, Rafinosa (Raf) ligeramente positivo, Sacarosa (Sac) negativo, Galactosa (Gal) negativo, Maltosa (Mal) negativo, Glucosa (Glu) positivo y positivo a producción de gas.

La identificación final de los 99 aislados levaduriformes se realizó considerando los resultados de las pruebas realizadas y comparando con los cuadros de identificación previamente diseñados y adaptados.

De las 385 muestras de leche analizadas, se obtuvo 25.71% (99/385) de aislados levaduriformes. El grupo con mayores aislados fue el de los bovinos con mastitis subclínica con un 11.94% (46/385), seguido de los animales clínicamente sanos 7.27% (28/385) y por último de los casos con mastitis clínica con un 6.49% (25/385).

Las especies que se encontraron con mayor frecuencia en los diferentes grupos de estudios fueron *C. glabrata* con un 64.65% (64/99) y *C. krusei* con un 17.17% (17/99) (Cuadro 5).

De las muestras de leche de bovinos con mastitis subclínica se aislaron 29.49% (46/156), de los cuales el 28.21% (44/156) pertenecen al género *Candida* y un 1.28% (2/156) al género *Rhodotorula*. Se identificaron 3 especies del género *Candida*, de estos predomina *C. glabrata* en un 82.61% (38/46), seguida de *C. krusei* en un 8.70% (4/46) y *C. guilliermondii* en un 4.35% (2/46). El 4.35% (2/46) de los aislados se identificaron como *Rhodotorula rubra*.

De las muestras de leche de bovinos con mastitis clínica, se aislaron 21.37% (25/117), de los cuales el 21.37% (25/117) pertenecen al género *Candida*. Se identificaron 7 especies, *C. krusei* en un 48.0% (12/25), seguida de *C. glabrata* en un 20.0% (5/25), *C. tropicalis* 12.0% (3/25), *C. parapsilosis* en un 8.0% (2/25), *C. famata* en un 4.0% (1/25), *C. guilliermondii* en un 4.0% (1/25) y *C. lusitaniae* en un 4.0% (1/25).

Con relación a las muestras de bovinos clínicamente sanos se aislaron levaduras en un 25% (28/112), todas del género *Candida*. Se identificaron 6 especies, predominando *C. glabrata* en un 75% (21/28), seguida de *C. famata* en un 7.14% (2/28) y *C. kefir* en un 7.14% (2/28), *C. lusitaniae*, *C. krusei* y *C. guilliermondii* en un 3.57% (1/28) cada una.

Cuadro 5. Identificación de levaduras de muestras de leche de glándulas mamarias de bovinos con diferente estado sanitario.

Género y especie	Estado sanitario			Frecuencia de aislado	
	Clínicamente sanos n= 112	Mastitis subclínica n= 156	Mastitis clínica n= 117	n	%
<i>Candida glabrata</i>	21	38	5	64	64.65
<i>Candida krusei</i>	1	4	12	17	17.17
<i>Candida guilliermondii</i>	1	2	1	4	4.04
<i>Candida famata</i>	2	0	1	3	3.03
<i>Candida tropicalis</i>	0	0	3	3	3.03
<i>Candida kefyr</i>	2	0	0	2	2.02
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	2	2	2.02
<i>Candida lusitaniae</i>	1	0	1	2	2.02
<i>Rhodotorula spp</i>	0	2	0	2	2.02
TOTAL	28	46	25	99	100

6. DISCUSIÓN

Aun cuando las mastitis en bovinos causadas por levaduras suelen ser esporádicas, y se asocian con frecuencia al uso indiscriminado de antibacterianos y condiciones deficientes de higiene en la rutina de ordeño; es factible que haya otros factores que incrementen su incidencia, como la zona geográfica, ya que se ha observado que climas tropicales favorecen la presencia de las levaduras debido a la humedad y temperatura, además si las levaduras cuentan con un pH idóneo en los diversos sustratos en los que se encuentran, se propicia su presencia y desarrollo en la glándula mamaria de los bovinos (Krukowski, et al., 2020). En el presente estudio, se realizó en el altiplano central de México, en donde las condiciones climáticas son de semiseco templado con ligeras lluvias en otoño e invierno.

Diversos estudios sobre mastitis micótica en diferentes países han reportado en leche de bovinos la presencia de hongos filamentosos y levaduriformes. Estos últimos de mayor relevancia, y en particular del género *Candida*. De este género micótico los reportes mencionan varias especies no-albicans que han tomado relevancia en los últimos años al ser aisladas a partir de la leche de animales clínicamente sanos, y con mastitis subclínica o clínica.

En un estudio realizado por Segundo y col. en 2011 en el Altiplano Mexicano, reportaron un 25.75% de aislados levaduriformes, en su mayoría del género *Candida* a partir de muestras de leche de bovinos sanos y con mastitis. Lo anterior es consistente con lo encontrado en el presente estudio, al obtener un 25.71% de levaduras a partir de las muestras trabajadas. Entonces en comparación al estudio presente se encontró en una mayor proporción levaduras del género *Candida*, de los cuales se encontró en mayor frecuencia a *C. glabrata* (75%) y *C. krusei* (3.57%) en vacas clínicamente sanas en comparación con Segundo, y col. (2011) donde se encontró en *C. glabrata* (58.75%) y *C. krusei* (11.25%). Con respecto a las muestras de mastitis subclínica, en el presente estudio se obtuvo *C. glabrata* (82.61%) y de *C. krusei* (8.70%), en cuanto Segundo y col. (2011) se reportó a *C. krusei* (7.89%). Y para las muestras de mastitis clínica *C. krusei* (48%) y *C. glabrata* (20%), mientras que, Segundo y col. aislaron en un 40.23% y 23.17% respectivamente.

Con relación al estado sanitario, en este estudio se encontraron mayores aislados de levaduras en las mastitis subclínicas con un 11.94%, en segundo lugar, los aislados de animales sanos con un 7.27% y finalmente un 6.49% en las mastitis clínicas, al respecto Segundo y col, (2011) reportaron mayores aislamientos a partir de los animales con mastitis clínica (43.57%) y en menor proporción en las mastitis subclínicas (9.92%). Se observa una clara tendencia de encontrar a *C. glabrata* en diferentes estatus sanitarios de los animales, esta levadura por un buen tiempo fue considerada inocua, pero en este estudio se aisló en mayor proporción en mastitis subclínica de grado 1 y 2 en la escala de la prueba de California, y en segundo lugar en la leche de animales sanos. Otra especie del género *Candida* que con el tiempo ha tomado importancia es *C. krusei*, esta especie ha sido reportada en los estados sanitarios mencionados, en particular en mastitis clínica. Es necesario realizar más estudios para determinar con certeza, cuáles son las condiciones que han influido para que se incremente su presencia en bovinos clínicamente sanos y con mastitis, y que hayan rebasado a *C. albicans*, especie que por mucho tiempo se consideró la principal especie del género *Candida* con mayor potencial patogénico, debido a la falta de información que había acerca de otros géneros y especies levaduriformes que tuvieran potencial patogénico.

En el presente estudio, se aislaron e identificaron a *C. glabrata* y *C. krusei* en los tres grupos muestreados, y de los diferentes lugares de muestreo. La presencia de estas dos especies en la leche de animales clínicamente sanos es relevante, ya que en condiciones favorables para su desarrollo tienen la capacidad de provocar mastitis en los animales, debido a que se conoce que hay levaduras que forman parte de la microbiota normal de los animales y que son oportunistas para causar un problema. El conocer las especies de *Candida* involucradas, puede ayudar a implementar medidas de prevención y tratamiento en este proceso infeccioso. Aunque también se encontró agentes filamentosos como fueron *Aspergillus* y *Penicillium*, solo en 10 muestras y una muestra respectivamente, no es el objetivo del estudio, pero es importante mencionar que además de agentes levaduriformes, también se pueden tener hongos filamentosos causando mastitis.

Por lo que se refiere a las otras especies del género *Candida* identificadas en el presente estudio, además de *C. glabrata* y *C. krusei*, también *C. guilliermondii* fue aislada en los tres grupos de estados sanitarios. Otras especies identificadas en menor proporción fueron *C. famata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* y *C. lusitaniae*.

Lo anterior es semejante a lo reportado por diversos autores, quienes en casos de mastitis micótica, reportan el aislamiento de especies del género *Candida*, entre las que se pueden mencionar *Candida glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *C. albicans*, *C. lipolytica*, *C. sphaerica*, *C. utilis*, *C. zeylanoides* y *C. kefyr* (Dworecka-Kaszak, et al., 2012; Yulong, et al., en 2013; Sartori, et al., en 2014; Du, et al., 2018; Akdouche, et al., 2018).

Además del género *Candida*, otros géneros levaduriformes reportados con menor frecuencia son *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Geotrichum*, y *Rhodotorula* (Dworecka-Kaszak, et al., 2012; Yulong, et al., en 2013; Kalińska, et al., 2017; Akdouche, et al., en 2018). En el presente estudio, como se ha mencionado se aislaron primordialmente diversas especies del género *Candida* y se obtuvo un 4.35% de aislados de *Rhodotorula rubra*.

Aun cuando las mastitis en bovinos tienen como primera causa a los agentes bacterianos, los casos por hongos y en particular las levaduras deben ser tomados en cuenta, toda vez que ocasionan una afección en la glándula mamaria de los bovinos, lo que repercute en la calidad y cantidad de su producción de leche, y esto a su vez ocasiona importantes pérdidas económicas al no poder comercializar la leche, además del incremento en los costos de tratamiento de los animales, que en ocasiones puede llegar a la pérdida del animal. La detección del agente causal en casos de mastitis es primordial, toda vez que es necesario salvaguardar la salud, el bienestar animal, así como los consumidores de productos lácteos.

7. CONCLUSIONES

- La metodología utilizada permitió la adecuada y correcta identificación de levaduras del género *Candida*.
- Se encontró que la mastitis micótica uno de sus principales agentes causales son levaduras del género *Candida*.
- En la leche de animales clínicamente sanos y con mastitis subclínica la especie más frecuente fue *C. glabrata*, y en el caso de mastitis clínica fue *C. krusei*, y de esto es importante resaltar que la literatura menciona que *C. krusei* es un agente patógeno causal de mastitis, mientras que *C. glabrata* solo se ha reportado en escasos casos que causa mastitis subclínica pero no es el único agente involucrado, y no se ha reportado que cause mastitis de grado clínico.
- La presencia de especies del género *Candida* no-albicans es cada vez más relevante en leche de animales clínicamente sanos y con mastitis.

8. ANEXOS

1. Medios de cultivo

1.1. Caldo dextrosa-peptona-extracto de levadura al 2%

Este caldo es usado para el cultivo y aislamiento de hongos filamentosos y levaduriformes, en donde la dextrosa es la fuente de energía, la peptona y el extracto de levadura proporcionan factores de crecimiento y la fuente necesaria de nitrógeno.

Componentes	
Reactivo	Cantidad
Dextrosa	2.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Peptona	2.0 g
Agua destilada	100 mL

Modo de preparación

En 100 mL de agua destilada se añaden: 1g de extracto de levadura, 2g de peptona y 2g de dextrosa. Se mezclan todos los reactivos hasta tener una mezcla homogénea. El medio es esterilizado en autoclave a 121°C, a 15 lb durante 20 minutos (Microbiology notes by Sagar Aryal, 2019).

Puede añadirse una solución con antibióticos (anexo 3) una vez que se haya enfriado el caldo.

1.2. Agar Dextrosa Sabouraud (SDA)

Este medio se recomienda para el cultivo de hongos filamentosos y levaduriformes. Los altos niveles de glucosa y el pH ácido del medio favorecen el crecimiento de los hongos. Esta capacidad selectiva puede ser reforzada adicionando antibacterianos como el cloranfenicol, ciclohexamida, ambos u otros antibacterianos (Arenas Guzmán, 2014).

Componentes	
Reactivo	Cantidad
Dextrosa	40.0 g
Mezcla de peptona	10.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Modo de preparación

Suspender 65g del medio en un litro de agua destilada. Calentar con agitación constante hasta obtener una mezcla homogénea y dejar hervir durante 1 minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb durante 20 minutos. Dejar enfriar el medio a temperatura ambiente entre los 45 a 50°C, aquí se puede adicionar una solución con antibióticos (anexo 3). posteriormente, servir en las cajas de Petri estériles (preparación bajo las indicaciones del fabricante MCD-LAB).

1.3. CHROMagar *Candida*

Es un medio selectivo cromogénico para la identificación de algunas especies de *Candida*, debido a la coloración de las colonias. El fundamento se basa en la inclusión de sustratos cromogénicos, que, ante la presencia de actividad enzimáticas de las levaduras, se produce un color determinado.

Componentes	
Reactivo	Cantidad
Dextrosa	10.2 g
Agar	15.0 g
Peptona	3.0 g
Mezcla cromogénica	22.0 g
Cloranfenicol	0.5 g
Agua destilada	1000 mL

Modo de preparación

Suspender 47.7g del medio en un litro de agua destilada. Calentar de 90 a 100°C con agitación constante hasta el primer hervor y conseguir una disolución completa del medio. Enfriar a temperatura ambiente hasta una temperatura de 45 a 50°C del medio. Servir en placas de Petri estériles. Se recomienda su uso no más de 15 días de su preparación. (preparación bajo indicaciones del fabricante CHROMagar™ *Candida*)

1.4. Agar Biggy

También llamado agar de Glicina, Glucosa, Levadura y sulfito de Bismuto (Biggy, por sus siglas en inglés) es útil para el aislamiento e identificación de diferentes especies de *Candida*, debido a una reacción de reducción del sulfito a sulfuro, y la sal de bismuto a bismuto, los cuales se combinan y forman una precipitación negra o café que pigmenta las colonias y puede difundir en el medio (MCD LAB, s.f.).

Componentes	
Reactivo	Cantidad
Citrato de amonio y Bismuto	5.0 g
Sulfato de sodio	3.0 g
Dextrosa	10.0 g
Glicina	10.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Agar bacteriológico	16.0 g
Agua destilada	1000 mL

Modo de preparación

Suspender 45g del medio en 1 litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta la completa disolución del polvo y hervir no más de 1 minuto. Enfriar a una temperatura entre 45 a 50°C y servir en placas de Petri estériles. (preparación bajo indicaciones del fabricante MCD LAB).

1.5. Medio líquido Yeast Nitrogen Base (YNB) adicionado con ciclohexamida (sigma) al 0.1%

La base nitrogenada de levadura es un medio que contiene una mezcla bien definida de aminoácidos, vitaminas, micronutrientes y sales, que aportan lo necesario para el crecimiento de las levaduras, exceptuando la fuente de carbono.

Composición para 100 mL en una solución 10x

Reactivo	Cantidad
Sulfato de amonio	5.0 g
Fosfato monopotásico	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Cloruro de sodio	0.1 g
Cloruro de calcio	0.1 g
Monocloruro de Histidina	20.0 mg
Metionina	20.0 mg
Triptófano	20.0 mg
Inositol	2000.0 µg
Ácido Bórico	500.0 µg
Niacina	400.0 µg
Sulfato de magnesio	400.0 µg
Hidrocloruro de piridoxina	400.0 µg
Sulfato de zinc	400.0 µg
Hidrocloruro de Tiamina	400.0 µg
Pantotenato de calcio	400.0 µg
Cloruro de hierro	200.0 µg
Molibdato de sodio	200.0 µg
Riboflavina	200.0 µg
Ácido Paraminobenzoico	200.0 µg
Yoduro de potasio	100.0 µg
Sulfato de cobre	40.0 µg
Ácido fólico	2.0 µg
Biotina	2.0 µg
Dextrosa	8.0 g
Agua destilada	100.0 mL

Modo de preparación

Se pesan 6.7 g del medio en 100 mL de agua destilada en una solución 10x, de preferencia debe ser agua destilada estéril, se agrega la dextrosa y se homogeniza la muestra. Posteriormente se le añade 0.1g de ciclohexamida a la solución y se homogeniza hasta su disolución. La solución se esteriliza por filtración, y si se requiere se puede alicuotar bajo completa esterilidad (preparación bajo indicaciones del fabricante, Becton Dickinson (BD), Difco™).

1.6. Agar Arroz

Cuando son incubadas levaduras individuales de *Candida* en agar arroz, se producen pseudohifas en un tiempo de 24 a 48 horas, de las cuales, *C. glabrata* no la produce, siendo esta una prueba para diferenciar a esta especie de las demás.

Componentes

Reactivo	Cantidad
Granos de arroz	20.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g
Agua destilada	1000.0 mL

Modo de preparación

Se pesan 20 g de arroz y se ponen en 1000 mL de agua destilada, se pone a hervir durante 30 minutos. Con ayuda de un embudo y una gasa, se filtra el medio. Del volumen obtenido, se completa el volumen inicial con agua destilada. A este se le añade el agar bacteriológico y se mezcla hasta disolver completamente el polvo. Se esteriliza el medio en autoclave a 121°C a 15 lb durante 20 minutos. Se reparte en placas de Petri, y una vez solidificado, se mete a prueba de esterilidad de 37°C por 24 horas. Una vez pasado la prueba de esterilidad, se refrigera las placas a 4°C (Arenas Guzmán, 2014).

1.7. Caldo Dextrosa Sabouraud

Medio utilizado para el crecimiento de hongos por su alto contenido de dextrosa, la cual aporta energía, y de una base peptonada, la cual es una fuente rica de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. Ayuda a diferenciar especies de *Candida*, puesto que algunas generan una película característica.

Componentes

Reactivo	Cantidad
Dextrosa	40.0 g
Peptona	10.0 g
Agua destilada	1000.0 mL

Modo de preparación

Se pesan los ingredientes y se añaden a 1000 mL de agua destilada. Se calienta hasta que comienza a hervir por 1 minuto, por agitación constante. Una vez hervido, se pasa 2 mL por cada tubo de ensayo y se esteriliza en autoclave a 121°C a 15 lb durante 20 minutos (preparación bajo indicaciones del fabricante, Becton Dickinson (BD), Bioxon).

2. Tinciones.

2.1. Tinción de Gram

Es definida como una tinción diferencial, ya que usa dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: gran positivas y Gram negativas. Los principios de la tinción de Gram, según el protocolo desarrollado primeramente por Christian Gram en 1884, están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. Para el caso de levaduras y debido a la composición de su pared celular que contiene una alta cantidad de carbohidratos y proteínas (mananas y glucanas)

tienen una reacción tintorial de gran positivas (color morado) (McGinnis, 1980; Segundo Zaragoza, et al., 2014).

Componentes

Solución de Cristal violeta

Solución A

Reactivo	Cantidad
Cristal violeta	2.0 g
Alcohol etílico	30.0 mL

Solución B

Reactivo	Cantidad
Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	20.0 mL

Modo de preparación

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

Solución de Lugol

Reactivo	Cantidad
Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 mL
Agua destilada	200.0 mL

Decolorante

Reactivo	Cantidad
Alcohol etílico de 95°	50.0 mL
Acetona	50.0 mL

Contraste Solución de Safranina

Reactivo	Cantidad
Safranina	0.20 g
Agua destilada	200.0 mL

3. Soluciones y reactivos diversos

3.1. Solución de antibióticos

Cloranfenicol

Reactivo	Cantidad
Cloranfenicol	50.0 mg
Agua destilada	1000.0 mL

Por cada 200 mL de cualquier medio (YEPD, SDA), se le añade 200 μ L de la solución de cloranfenicol.

Kanamicina

Reactivo	Cantidad
Kanamicina	50.0 mg
Agua destilada	1000.0 mL

Por cada 200 mL de cualquier medio (YEPD, SDA), se le añade 200 μ L de la solución de kanamicina.

Ampicilina

Reactivo	Cantidad
Ampicilina	50.0 mg
Agua destilada	1000.0 mL

Por cada 200 mL de cualquier medio (YEPD, SDA), se le añade 400 μ L de la solución de Ampicilina.

3.2. Solución Salina Fisiológica (SSF)

Componentes

Reactivos	Cantidad
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua destilada	1000.0 mL

Modo de preparación

Incorporar los ingredientes hasta tener una mezcla homogénea, alicuotar si es necesario y esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121°C con 15 lb de presión.

3.3. Caldo urea

Esta prueba mide la capacidad de la levadura de hidrolizar la molécula de urea en dos moléculas de amonio por la acción de la enzima ureasa; esto genera un incremento del pH del medio y en consecuencia el cambio de color de naranja a fucsia.

Composición

Reactivo	Cantidad
Caldo urea deshidratado	3.85 g
Agua destilada	100.0 mL

Modo de preparación

Se pesa la urea y se le añade a 100 mL de agua destilada en un vaso de precipitado o en un matraz. Se esteriliza por filtración con una membrana de preferencia de 0.40 μm de diámetro, y se pasa a un recipiente estéril. Se pone a prueba de esterilidad metiendo a incubar a 37°C por 24 horas (preparación bajo indicaciones del fabricante, Condalab (Condalab, 2019)).

3.4. Glicerol al 50%

Ayuda a mantener las cepas para crioconservación, puesto que funge como un crioprotector, ya que ayuda a reducir al mínimo el contenido de agua intracelular, evitar la vitrificación y proteger las macromoléculas en el ambiente interno de la célula.

Composición

Reactivo	Cantidad
Glicerol	50.0 mL
Agua destilada	50.0 mL

Modo de preparación

Se añade ambas partes a un frasco, y se agita para conseguir una mezcla lo más homogénea posible. Se manda a esterilizar en autoclave a 121°C a 15 lb de presión durante 20 minutos.

ANEXO 4. Tabla de características de levaduras para su identificación

LEVADURA	MORFOLOGÍA		DESARROLLO		PELÍCULA SABOURAUD	AGAR BIGGY	CHROMagar	PSEUDOHIFA
	MICROSCOPICA	MACROSCOPICA	30°C	37°C				
<i>C. albicans</i>	Ovales, de tamaño mediano (3.5-6 x 4-8 µm)	Colonias suaves, blancas a color crema	+	V+	-	Colonias lisas, circulares, café oscuro con ligero borde micelial. El oscurecimiento no difunde al medio	Lisa, verde esmeralda	+
<i>C. bombi</i>	Ovoides (2-4 x 4-6 µm), se pueden encontrar solas, en pares o en pequeños grupos	Colonias suaves, de color crema a bronceado claro, con margen irregular	SD	SD	SD	SD	SD	+
<i>C. brumpti</i>	Ovoides a cilíndricas (1.5-4.5 x 4-12 µm). Pueden estar solas, en pares o en cadena.	Colonias de color gris a crema, algo tenue, Suave y arrugada.	SD	SD	SD	SD	SD	-
<i>C. cantarelli</i>	Ovoides cortas a elipsoidales (3-4 x 4-8 µm). Pueden estar solas, en pares o en racimos	Colonias de color crema, parece mantequilla, tenue y arrugada	SD	SD	SD	SD	SD	-
<i>C. dubliniensis</i>	Ovales de tamaño mediano (3.5-6 x 4-8 µm)	Colonias suaves, blancas a color crema	+	V-	-	SD	Lisa, verde esmeralda	+
<i>C. famata</i>	Esférica de tamaño mediano (3.5-5 x 2-3.5 µm)	Colonia pastosa, suave, blanca a color crema,	V	V+	SD	Colonias medianas de color café a rojo oscuro brillantes con ligero crecimiento micelial.	Lisa, blanca a rosa pálido	V +
<i>C. glabrata</i>	Ovales pequeñas (3.4 x 2.0 µm)	Colonias pastosas, suaves y blancas	+	+	-	SD	Brillante y cremosa de color violeta	-
<i>C. guilliermondii</i>	Ovales a elipsoidales (1.5-4.8 x 2-15 µm)	Colonias pastosas, suaves a arrugadas, color crema	V	V+	-	SD	Rosa claro brillante	V
<i>C. incommunis</i>	Elongadas a cilíndricas (1.5-2.5 x 6-12 µm) y pueden estar solas o en cadena	Colonias de color blanco y arrugado al centro, periferia suave	SD	SD	SD	SD	SD	+
<i>C. intermedia</i>	Ovoides (2-4 x 3-6 µm). Pueden estar solas y en pares, también se presentan alargadas	Colonias de color blanco a crema, suave y ligeramente arrugada	SD	SD	SD	SD	SD	+
<i>C. kefyri</i>	Ovales, elipsoidales a cilíndricas (3-11 x 2-6 µm)	Colonias pastosas, suaves, blancas a color crema	+	V+	-	Colonias grandes de color rojo oscuro amarronado, planas con ligero crecimiento micelial.	Lisa, de color beige a rosa claro	+
<i>C. krusei</i>	Ovaladas, elongadas a cilíndricas (2-5 x 4-15 µm)	Colonias pastosas, suaves, color crema	+	V+	+	Colonias grandes, rugosas y planas, con periferia café negruzco y halo amarillo	Rugosa seca, de color rosa con halo blanco	+
<i>C. lambica</i>	Ovoide a elíptica (1.9-6.5 x 4-14.4 µm). Pueden estar solas, en pares y en cadenas cortas.	Colonias de color blanco a crema, suaves.	SD	SD	SD	SD	SD	-
<i>C. lipolytica</i>	Ovoides, elipsoidales a elongadas (3.0-3.5 x 3.3-15.0 µm)	Colonias pastosas, suaves, color crema	V-	+	SD	SD	SD	+
<i>C. lusitaniae</i>	Ovales a elongadas (3.5-6 x 4-8 µm)	Colonias pastosas, suaves, blancas a color crema	+	+	SD	SD	Lisa, rosa a púrpura grisáceo	V
<i>C. norvegica</i>	Globosa a casi globosa (3-6 µm). Pueden estar solas o en pares	Colonias blancas, parece mantequilla, suave, brillante y enteras	SD	SD	SD	SD	SD	-
<i>C. parapsilosis</i>	Oval, elipsoidal a elongadas (3-4 x 5-8 µm)	Colonias pastosas, suaves, color crema	+	V+	-	Colonias medianas, planas, de color café rojizo oscuro y brillante a café rojizo claro; borde micelial amarillento.	Lisa, blanca a rosa pálido	+

ANEXO 4 (Continuación).

<i>C. rugosa</i>	Alargadas (1.5-2.5 x 5-11 µm). Pueden estar solas o en pares	Colonias arrugadas de color blanco a crema	SD	SD	SD	SD	SD	-
<i>C. slooffiae</i>	Esféricas (4-11 µm) a elíptica (3-11.5 x 4.8-14 µm). Pueden estar solas o en pares, y poco frecuente en cadenas cortas	Colonias blancas y casi brillante, con textura de mantequilla. Planas, con margen ligeramente lobulado	SD	SD	SD	SD	SD	-
<i>C. tropicalis</i>	Ovalas a elipsoidales (3.5-7 x 5.5-10 µm)	Colonias pastosas, suaves, color crema	+	V+	+	Colonias pequeñas, café oscuro con prominencia negra central y ligero borde micelial. El oscurecimiento difunde al medio después de las 72 horas de incubación.	Lisa y cremosa, de color azul oscuro con halo marrón	+
<i>C. viswanathii</i>	Globosas, ovoides a cilíndricas	No tiene morfología típica definida	SD	SD	SD	SD	SD	+
<i>C. zeylanoides</i>	Ovoides a alargadas (2.5-7 x 4-10 µm). Pueden estar solas o en pares y en cadenas cortas	Colonias lisas sin brillo, de color blanco a crema	SD	SD	SD	SD	SD	-
<i>Cryptococcus gattii</i>	Haploides y globosas (2.5-8 µm), ovoides a piriformes, rodeado de una cápsula de polisacáridos	Colonias suaves, blancas a color crema. Mucosas.	SD	SD	SD	SD	SD	+
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Principalmente esféricas (3-8 µm)	Colonias pastosas, suave a mucoide, color crema	+	V+	-	SD	Lisa y mucosa de color beige	V
<i>Prototheca zopfii</i> var. <i>Zopfii</i>		Pastosa, suave a rugosa o arrugada, color crema	SD	SD	SD	SD	SD	-
<i>S. cerevisiae</i>	Ovaladas largas a elongadas (3-8 x 5-10 µm)	Colonias pastosas, suaves, color crema	V+	V+	SD	SD	Lisa de consistencia cremosa y color violeta	V

NOTA: S/D= Sin Dato; (+) = positivo; (-) = negativo; V= variable

Fuente: Adaptación obtenidas de:

* Arenas Guzmán, R., 2014. *Micología médica ilustrada*. 5a ed. Ciudad de México: McGrawHill Education.

* Kurtzman, C., Fell, J., Boekhout, T., 2011. *The yeast. A taxonomic study*. Fifth ed. ELSEVIER.

* López, R., Méndez, L. J., Hernández, F., Castañón, L. R., 2012. *Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. 3a ed. Ciudad de México: Trillas.

* St-Germain, G., Summerbell, R., 2011. *Identifying fungi. A clinical laboratory handbook*. second ed. Belmont: Star publishing company, Inc.

ANEXO 5. Características bioquímicas de levaduras.

LEVADURA	PRODUCCIÓN USEASA	SUSCEPTIBILIDAD CICLOHEXAMIDA	ASIMILACIÓN											FERMENTACIÓN							
			Glu	Mal	Sac	Gal	Lac	Raf	Cel	Tre	Xil	Rha	Ara	Man	Mel	Glu	Mal	Sac	Gal	Lac	Raf
<i>C. albicans</i>	S/D	+	+	+	V	+	-	-	-	V	+	-	V	SD	-	+	+	V	V	-	-
<i>C. bombi</i>	S/D	-	+	-	+	-	-	+	-	V	-	-	-	SD	-	+	-	+	-	-	-
<i>C. brumpti</i>	S/D	+	+	V	-	+	-	-	-	V	V	-	-	SD	-	V	V	-	V	-	-
<i>C. cantarelli</i>	S/D	+	+	-	-	V	-	-	-	+	V	-	-	SD	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	SD	-	+	+	-	+	-	-
<i>C. famata</i>	S/D	S/D	+	+	+	+	V	+	+	+	+	V	+	SD	V	V	V	V	V	-	V
<i>C. glabrata</i>	-	-	+	-	-	-	-	V-	-	V	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	V-
<i>C. guilliermondii</i>	S/D	S/D	+	+	+	+	-	+	+	+	+	V	+	SD	+	+	-	+	V	-	+
<i>C. incommunis</i>	S/D	+	+	+	+	V	-	-	+	+	V	-	-	SD	-	+	-	V	-	-	-
<i>C. intermedia</i>	S/D	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	V	SD	-	+	V	+	+	-	V
<i>C. kefyri</i>	S/D	S/D	+	-	+	+	V	+	V	-	V	-	V	SD	-	+	-	+	+	V	+
<i>C. krusei</i>	S/D	S/D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SD	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. lambica</i>	S/D	S/D	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	SD	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. lipolytica</i>	-	S/D	+	-	-	V	-	-	V	-	-	-	-	SD	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lusitanae</i>	S/D	S/D	+	V	V	V	-	-	+	+	+	+	-	SD	-	+	V	V	V	-	-
<i>C. norvegica</i>	S/D	V	+	-	-	-	-	-	+	-	V	V	-	SD	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	SD	-	+	V	V	V	-	-
<i>C. rugosa</i>	S/D	-	+	-	-	V	-	-	-	-	V	-	-	SD	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. slooffiae</i>	S/D	S/D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SD	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	S/D	+	+	+	V	+	-	-	V	+	+	-	-	SD	-	+	+	V	+	-	-
<i>C. viswanathii</i>	S/D	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	V	SD	-	+	+	V	+	-	-
<i>C. zeylanoides</i>	S/D	+	+	-	-	-	-	-	V	V	-	-	-	SD	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus gatti</i>	+	S/D	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	SD	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	S/D	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	SD	-	-	-	-	-	-	-
<i>Prototheca zopfii</i> <i>var. Zopfii</i>	S/D	S/D	+	+	-	-	V	V	-	-	-	-	-	SD	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	S/D	S/D	+	V	+	V	-	+	-	+	-	-	-	SD	-	+	+	+	V	-	+

NOTA: S/D= Sin Dato; (+) = positivo; (-) = negativo; V= variable; Glu= Glucosa; Mal= Maltosa; Sac= Sacarosa; Gal= Galactosa; Lac= Lactosa; Raf= Rafinosa; Cel= Celobiosa; Tre= Trealosa; Xil= Xilosa; Rha= Rhamnosa; Ara=Arabinosa; Man= Manosa; Mel= Melobiosa.

Fuente: Adaptación obtenidas de:

* Arenas Guzmán, R., 2014. *Micología médica ilustrada*. 5a ed. Ciudad de México: McGrawHill Education.

* Kurtzman, C., Fell, J., Boekhout, T., 2011. *The yeast. A taxonomic study*. Fifth ed. ELSEVIER.

* López, R., Méndez, L. J., Hernández, F., Castañón, L. R., 2012. *Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. 3a ed. Ciudad de México: Trillas.

* St-Germain, G., Summerbell, R., 2011. *Identifying fungi. A clinical laboratory handbook*. second ed. Belmont: Star publishing company, Inc.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Akdouche, L., Aissi, M., Saadi, A., 2018. Prevalence and identification of yeasts responsible for mastitis in dairy cattle farms in the Sidi Lahcene Region in the Wilaya of Sidi Bel abbes- Algeria. *Advances in Dairy Research*, 6(2), pp. 1-6.
2. Alfonso, C., López, M., Arechavala, A., Perrone, M., Guelfand, L., Bianchi, M., 2010. Identificación presuntiva de *Candida spp.* y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance *Candida* Agar. *Revista Iberoamericana médica*, 27(2), pp. 90-93.
3. Arenas, R., 2014. *Micología médica ilustrada*. 5a ed. Ciudad de México: McGrawHill Education.
4. Barnett, J., Payne, R., Yarrow, D., 1983. *Yeast: Characteristics and Identification*. Gran Bretaña: Cambridge University Press.
5. BD, 2011. *BD*. [En línea] Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8799> [Último acceso: 15 Enero 2020].
6. Bedolla, C., 2018. Pruebas y métodos para el diagnóstico de mastitis. *Entorno ganadero*.
7. Bedolla, C., Castañeda, H., Wilfried, W., 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 8(9), pp. 1-17.
8. Blanco, M. Á., 2018. *Calidad sanitaria de la leche*. Ciudad de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
9. Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., Valdezate, S., 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *ELSEVIER*, 29(8), pp. 601-608.
10. Campbell, M. C., Stewart, J. L., 1980. *The Medical mycology handbook*. Michigan: University of Michigan.

11. Campbell, N. A., Reece, J. B., 2007. Respiración celular. Obtención de energía química. En: A. Alcocer, ed. *Biología*. Madrid: Editorial Médica panamericana, pp. 160-180.
12. Carter, G., Wise, D. J., 2004. Infections caused by yeasts and yeastlike fungi. En: *Essentials of veterinary bacteriology and micology*. Ames: blackwell, pp. 257-261.
13. Castro, C., Martín, E., 2010. *Diagnóstico de la infección fúngica por levaduras del género Candida: Candida dubliniensis*. [En línea] Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/Cdublinien.pdf> [Último acceso: 15 Enero 2020].
14. COFOCALEC, 2012. *PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012 Sistema producto leche-alimento-lácteo-leche cruda de vaca-especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba*. Ciudad de México: Organismo Nacional de Normalización del COFOCALEC.
15. Condalab, 2019. *Condalab*. [En línea] Available at: https://www.condalab.com/int/en/index.php?controller=attachment&id_attachment=8466 [Último acceso: 30 Mayo 2020].
16. Dodd, F., Booth, J., 2000. Mastitis y producción de leche. En: A. H. Andrews, ed. *Sanidad del ganado vacuno lechero*. Zaragoza: Acribia, pp. 239-286.
17. Du, J., Wang, X., Luo, H., Wang, Y., Liu, X., Zhou, X., 2018. Epidemiological investigation of non-*albicans* *Candida* species recovered from mycotic mastitis of cows in Yinchuan, Ningxia of China. *BMC Veterinary Research*, 14(251).
18. Dworecka-Kaszak, B., Krutkiewicz, A., Szopa, D., Kleczkowski, M., Bieganska, M., 2012. High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *The Scientific World Journal*, 1(196347), pp. 1-5.

19. FAO, 2019. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Portal lácteo*. [En línea] Available at: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/> [Último acceso: 19 Noviembre 2019].
20. Fariñas, F., Pedreira, J., Diéguez, F. J., 2016. Mastitis bovina. En: *Inmunología y enfermedades infecciosas en vacunos*. Zaragoza: Servet, pp. 109-114.
21. Firth, C. L., Laubichler, C., Schleicher, C., Fuchs, K., Käsbohrer, A., Danner, C., 2019. Relationship between the probability of veterinary-diagnosed bovine mastitis occurring and farm management risk factors on small dairy farms in Austria. *Journal of Dairy Science*, 102(5), pp. 4452-4463.
22. Foster, R., 2017. Female reproductive system and mammae . En: J. Zachary, ed. *Pathologic basis of veterinary disease*. Saint Louis: ELSEVIER, pp. 1147-1193.
23. Gil, M., 2019. *Lifeder*. [En línea] Disponible en: <https://www.lifeder.com/agarbiggy/> [Último acceso: 15 Enero 2020].
24. Hernández, J. M., Bedolla, J. L. C., 2008. Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *REDVET. Revista Electrónica Veterinaria*, IX(9), pp. 1-34.
25. Kalińska, A., Gołębiowski, M., Wójcik, A., 2017. Mastitis pathogens in dairy cattle- a review. *World scientific news*, Volumen 89, pp. 22-31.
26. Krukowski, H., Lassa, H., Zastempowska, E., Smulski, S., Bis-Wencel, H., 2020. Etiological agents of bovine mastitis in Poland. *Medycyna Weter*, 76(4), pp. 221-225.
27. Ksouri, S., Djebir, S., Hadeif, Y., 2015. Survey of bovine mycotic mastitis in different mammary gland statuses in two North-Eastern regions of Algeria.. *Mycopathologia*, Volumen 179, pp. 327-331. DOI 10.1007/s11046-014-9845.

28. Kurtzman, C., Fell, J., Boekhout, T., 2011. *The yeast. A taxonomic study*. Quinta ed. s.l.:ELSEVIER.
29. López, R., Méndez, L. J., Hernández, F., Castañón, L. R., 2012. *Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. 3a ed. Ciudad de México: Trillas.
30. MacFaddin, J. F., 2000. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. third ed. Michigan: Jones & Bartlett Learning.
31. MCD LAB, 2019. *Ficha técnica*. [En línea] Disponible en: www.mcdlab.net/fichas%20Tecnicas/Agar%20%Biggy.pdf [Último acceso: 29 Enero 2020].
32. McGinnis, M., 1980. *Laboratory handbook of medical mycology*. first ed. New York: Academic Press.
33. Melo Poblete, G. A., Determinación de células somáticas en leche cruda recepcionada en plantas lecheras, mediante dos métodos de recuento [Licenciatura]. Valdivia (CHI): Universidad Austral de Chile; 1998.
34. Méndez, L. J., López, R., Hernández, F., 2012. *Actualidades en Micología médica*. Sexta ed. Distrito Federal: Sefirot.
35. Mendoza, M., 2005. Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la sociedad Venezolana de microbiología*, 25(1).
36. Microbiology notes by Sagar Aryal, 2019. *Online microbiology notes*. [En línea] Available at: <https://microbenotes.com/yeast-extract-peptone-dextrose-ypd-or-yepd-agar/> [Último acceso: 19 Agosto 2019].
37. Ortiz, E., Perez, R., Orozco, C., 2017. Identificación de agentes micóticos en muestras de leche obtenidas de tanques de enfriamiento.. *Revista de Ciencia y Agricultura*, Volumen 14, pp. 99-106.

38. Pachauri, S., Varshney, P., Dash, S. K., Gupta, M. K., 2013. Involvement of fungal species in bovine mastitis in and around Mathura, India. *Veterinary World*, 6(7), pp. 393-395.
39. Pohlman, L., Chengappa, M., 2013. Yeasts- *Cryptococcus*, *Malassezia* and *Candida*. En: S. McVey, M. Kennedy & M. Chengappa, edits. *Veterinary microbiology*. Ames: Wiley-Blackwell, pp. 313-320.
40. Samanta, I., 2015. *Veterinary micology*. First ed. Kolkata: Springer.
41. Saran, A., Chaffer, M., 2000. *Mastitis y calidad de leche*. primera ed. Buenos Aires: Inter-médica.
42. Sartori, L. C. A., Santos, R. C., Marin, J. M., 2014. Identification of *Candida* species isolated from cows suffering mastitis in four Brazilian states. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66(5), pp. 1615-1617.
43. Secretaria de Gobernación, 2012. *Diario Oficial de la Federación*. [En línea] Disponible en: <http://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm> [Último acceso: 14 Febrero 2020].
44. Segundo, C., Cervantes, R. A., Ducoing, A. E., de la Peña, A., Villa, L., 2011. Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Revista Iberoamericana de micología*, 28(2), pp. 79-82.
45. Segundo, C., Mena, R., Escalante, C., 2014. Principales tinciones para la identificación de bacterias y hongos.. En: *Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología veterinarias*. primera ed. Distrito Federal: Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, pp. 23-38.
46. Siller-Ruiz, M., Hernandez-Egido, S., Sánchez-Juanes, F., González-Buitrago, J. M., Muñoz-Bellido, J. L., 2017. Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-TOF, medios cromogénicos. *ELSEVIER*, 35(5), pp. 303-313.

47. St-Germain, G., Summerbell, R., 2011. *Identifying fungi. A clinical laboratory handbook*. second ed. Belmont: Star publishing company, Inc..
48. Tarazona, L. E., Villate, J. R., Forero, E. J., Grijalba, J. V., Vargas, J. C., Andrade, R. J., 2019. Presence of mycotic microorganisms in raw milk from cooling tanks in the Boyacense highlands (Colombia). *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 14(2), pp. 8-17.
49. UNAD. Escuela de ciencias básicas, tecnología e ingeniería., 2016. *Universidad Nacional Abierta y a Distancia*. [En línea] Disponible en: <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2016/01/301105>
LECTURA Revision de Presaberes.pdf [Último acceso: 10 Enero 2020].
50. Underwood, W., Blauwiel, R., Delano, M., Gillesby, R., Mischler, S., Schoell, A., 2015. Biology and diseases of ruminants (Sheep, goats, and cattle). En: J. Fox, y otros edits. *Laboratory animal medicine*. s.l.:American college of laboratory, pp. 623-694.
51. Xin, L., Xin M., Na X., Wei L., Yong W., Ping T., Hongbing C., 2019. Change in chemical composition of Simmental crossbred cattle milk improved its physicochemical, nutritional, and processed properties. *Journal of food science*, 84(6), pp. 1322-1330.
52. Yamaguchi, S., Masuda, Y., Nakagawa, S., Abe, H., Gotoh, Y., Baba, T., Kawahara, T., 2019. Genetic parameters for mastitis incidence and its indicators based on somatic cell score for Holsteins in Hokkaido, Japan.. *Animal science journal*, 90(8), pp. 1-9.
53. Yulong, Z., Yachao, R., Chunling, F., Hong, S., Zecai, Z., Wenbin, M., *et al.*, 2013. Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. *Tropical Animal Health and Production*, Issue 45, pp. 1709-1714.