



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

**PATÓGENOS CAUSANTES DE MASTITIS EN
GANADO BOVINO LECHERO DEL MUNICIPIO
DE SAN SALVADOR EL SECO, PUEBLA.**

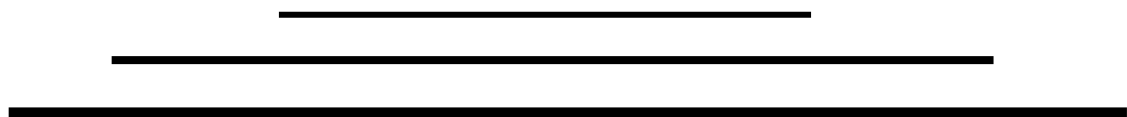
**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL
TÍTULO DE LICENCIATURA EN QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA
CRISTINA SÁNCHEZ PÉREZ**

DIRECTOR: DC. RICARDO MUNGUÍA PÉREZ.

ASESOR: MC. GLORIA LEÓN TELLO.

JUNIO 2016



Índice

1 Resumen	1
2 Introducción	2
3 Marco teórico	3
3.1 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria	3
3.2 Generalidades de la mastitis	4
3.3 Tipos de mastitis	4
3.4 Desarrollo de la infección	6
3.5 Mecanismo de transmisión	7
3.6 Etiología	8
3.7 Métodos para diagnosticar mastitis	8
3.8 Generalidades de bacterias causantes de mastitis con mayor frecuencia	9
3.9 Generalidades de levaduras causantes de mastitis.	10
4 Marco de referencia	13
5 Planteamiento del problema	15
6 Justificación	16
7 Objetivos	17
8 Diseño de estudio	18
9 Materiales y metodología	20
10 Diagrama general de trabajo	22
11 Resultados y discusión	29
11.1 Hongos y bacterias aislados en muestras de leche bovina.	30
11.2 Sensibilidad antifúngica.	32
11.3 Sensibilidad antimicrobiana	35
12 Conclusiones	40
13 Bibliografía	42
Anexo 1: Hongos filamentosos aislados en muestras de leche bovina.	46
Anexo 2: Antibióticos y antifúngicos utilizados para el antibiograma y antifungigrama	47

1. Resumen

La mastitis es una infección intramamaria que afecta al ganado bovino lechero y a la calidad de la leche, generando pérdidas económicas en los productores; las levaduras han incursionado como emergentes de esta infección, principalmente por un inadecuado tratamiento farmacológico. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar los agentes causales de mastitis y determinar la sensibilidad de los patógenos en las muestras frente a los diferentes antibióticos y antifúngicos utilizados en el tratamiento. Se recabaron 52 muestras de diferentes ranchos del municipio de San Salvador el Seco, Puebla. El aislamiento e identificación bioquímica de bacterias fueron por métodos microbiológicos convencionales, usando agar sal y manitol, agar sangre de carnero al 5 %, incubando a 37°C de 24 a 48-h en condiciones anaerobias y aerobias; la identificación de especies fue mediante pruebas bioquímicas. Para el aislamiento e identificación bioquímica de hongos levaduriformes por métodos convencionales, se utilizó agar dextrosa Sabouraud y micobiótico, incubando a 28 °C de 5 a 7 días. La identificación de especies se llevó a cabo por pruebas bioquímicas, CHROMagar Candida BD[®] y Auxocolor[®] Bio-Rad. Por último se realizó el antifungigrama y antibiograma de acuerdo a las especificaciones establecidas por el CLSI, para el método de Kirby-Bauer. Se identificaron levaduras como *Candida glabrata* (46 %), *C. cruzei* (25 %), y *C. lipolytica* (4%); *Rhodotorula rubra* (13 %) y *Rhodotorula glutinis* (4%). Así como *Staphylococcus saprophyticus* (29 %), *Staphylococcus aureus* (24%), *Staphylococcus hominis* (19%), *Staphylococcus epidermidis* (14%) y *Streptococcus disgalactiae* (14%). Las pruebas de sensibilidad, mostraron casi un cien por ciento de efectividad para anfotericina B, ketoconazol y nistatina ante las diferentes especies levaduriformes, sin embargo, fluconazol y 5-fluorocitocina no lograron causar ningún efecto sobre *Cryptococcus laurenty*, *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*. Respecto a las bacterias, *S. aureus* y *S. epidermidis*, mostraron resistencia a oxacilina y dicloxacilina, así como *S. hominis* a gentamicina y aun se siguen aplicando en la terapia bovina para mastitis, lo cual atenta directamente a la salud del ganado bovino y por ende al consumidor de leche cruda.

2. Introducción

La mastitis es una infección intramamaria de alta frecuencia en ganado lechero, que genera cuantiosas pérdidas económicas a los productores de leche así como también perjudica la calidad de la leche. Se estima que esta enfermedad ha dejado una pérdida total de \$30,966.34 anual a nivel nacional en el 2009.

Esta infección es causada por microorganismos que se encuentran en el ambiente y que son favorecidos gracias a las malas prácticas de ordeño, como es el sobre ordeño, no usar sellador, falta de higiene en los pezones, utilizar la misma jerga para secar los pezones, etc.

Los microorganismos causantes de esta infección son principalmente bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp*, *Mycoplasma spp*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus equinus*, especies del género *Enterococcus* y enterobacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella* por mencionar algunas. Sin embargo, en los últimos años se han presentado casos de mastitis causados por hongos como son *Candida sp*, *Cryptococcus sp*, *Trichosporon sp*, *Geotrichum sp*, *Aspegillus fumigatus*. Una de las causas de este problema, son los tratamientos antimicrobianos prolongados, al mismo tiempo la condicionante para generar resistencia a los diferentes tratamientos.

El personal que hace la labor de extracción de este alimento, es el afectado secundario puesto que se encuentra en contacto directo con el animal por lo que tiene una alta probabilidad de contagio.

3. Marco teórico

3.1 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria

La ubre de la vaca se encuentra localizada en la parte torácica, conformada por cuatro glándulas (cuartos), de tejido epitelial. Cada glándula se encuentra separada entre sí por una membrana delgada ubicada en el centro de la ubre unida al abdomen de la vaca. Por lo que cada cuarto es una unidad totalmente independiente unida a su pezón.

Tejido mamario

El parénquima está formado por una serie de estructuras huecas denominadas **alveolos**, cada alveolo está cubierto por una capa de células epiteliales que son las encargadas de secretar leche (figura 1). La parte externa del alveolo está formada por una capa de células mioepiteliales. Estos alveolos se agrupan en densos racimos dentro de una cápsula intersticial formando los **lobulillos** semejante a un racimo de uvas (contiene 150 a 220 alveolos aproximadamente) y estos se agrupan a la vez en **lóbulos** que se separan entre sí por septos fibrosos. Todos estos conductos colectores desembocan en la parte glandular de la cisterna donde se va almacenar parte de la leche producida, de aquí el conducto continuo al canal del pezón (Carvanca *et al*, 2005). Papila de la mama o pezón es un depósito con un hueco que comunica al exterior mediante el conducto papilar formado por pliegues mucosos en combinación con el esfínter papilar, que impide que la leche sea expulsada pasivamente (Carvanca *et al*, 2005). (Figura 2)

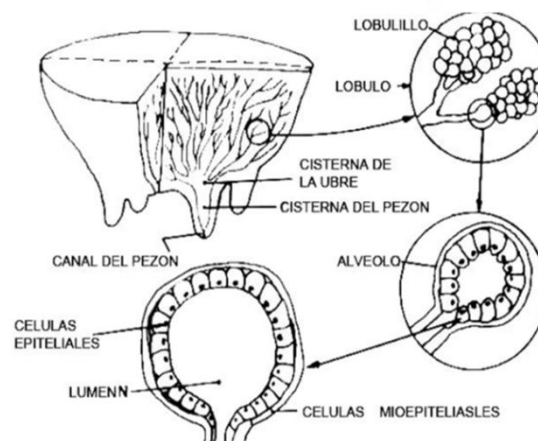


Figura 1. Estructura interna de la ubre
Fuente: (SENA, 2015)

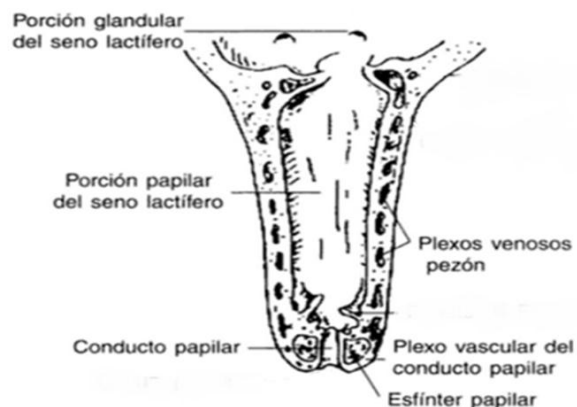


Figura 2. Estructura del pezón.
Fuente: (Carvanca y col, 2005)

3.2 Generalidades de la mastitis

Definición

El término mastitis se deriva de las palabras griegas “mastos”, que significa “pechos” e “itis” que quiere decir “inflamación de”. Se define a mastitis como un proceso inflamatorio de la glándula mamaria y sus tejidos secretores generando un descenso en la producción de leche con ello alterando su composición. Es probablemente la más costosa de las enfermedades infecciosas que afecta al ganado lechero (Pastor *et al*, 2008). Se caracteriza por la entrada de células somáticas, principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMN), a la glándula mamaria y por un aumento en el contenido de proteasa en la leche producida (Fernández *et al*, 2012). Esta enfermedad, es reconocida comúnmente por signos clínicos, principalmente por los cambios en la ubre y leche. Los síntomas incluyen la disminución de leche, el aumento en el número de leucocitos, composición, apariencia de la leche, cuartos mamarios enrojecidos, tumefacción y fiebre (Fernández *et al*, 2012).

3.3 Tipos de mastitis

La mastitis bovina en términos generales se clasifica por la intensidad de la infección.

Mastitis subclínica

La mastitis subclínica es una enfermedad altamente contagiosa en ganado lechero causante principal de pérdidas económicas (Fernández *et al*, 2012). La mastitis subclínica ocurre cuando un microorganismo patógeno infecta a uno o más cuartos; sin embargo, no dañan fácilmente los alveolos, por lo que es difícil detectar por el operario debido a que la ubre y la leche se ven sin ninguna alteración por lo que no se detecta de inmediato. Se puede identificar en la disminución en el volumen de la leche y conteo de células somáticas elevadas presentes en la leche.

Mastitis clínica

La mastitis clínica es una anormalidad en la glándula mamaria de la vaca y la leche, que puede ser fácilmente observada. Se caracteriza por la tumefacción o dolor en la ubre, enrojecimiento de la misma, la leche puede presentar una apariencia anormal y, en algunos casos, hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además, las bacterias

están presentes en la leche, lo que reduce el rendimiento y la calidad considerablemente (Acuña y Rivadeneira, 2008). La mastitis clínica clasifica en:

- ✓ **Mastitis moderadamente aguda.** La infección tiene más de 24 horas, la vaca presenta sus constantes fisiológicas y ubre totalmente normales, pero en la leche se observa natillas o tolondrones.(Figura 3)

- ✓ **Mastitis severamente aguda.** Es una infección de 72 horas, se aprecia la leche con tolondrones, la glándula esta dura y con fiebre. En esta forma de mastitis podrán presentarse signos sistémicos como septicemia, toxemia, fiebre, anorexia, depresión, movimientos rumiantes disminuidos, entre otros signos.

- ✓ **Mastitis crónica.** La infección tiene más de 5 días, toda la leche sale con tolondrones, la ubre está severamente inflamada, endurecida y caliente, la vaca tiene fiebre, taquicardia, atonía ruminal, anorexia.

- ✓ **Mastitis con glándula improductiva o glándula ciega.** La infección tiene en ocasiones semanas, la glándula se ve pequeña, está flácida y fría, no se obtiene leche sino exudados, las constantes fisiológicas están normales debido a que la fibrina aisló esta glándula provocando hipoxia y necrosis del parénquima con abscesos y exudados; inclusive el parénquima se puede desprender (Acuña y Rivadeneira, 2008).



Figura 3. Leche con grumos o tolondrones es señal de mastitis.
Fuente :(Simao y col, 2013)

3.4 Desarrollo de la infección

En principio se considera al pezón como primera línea de defensa contra la penetración de microorganismos al interior de la ubre, debido a que el esfínter cierra fuertemente el canal del pezón cuando la vaca no es ordeñada. Sin embargo, la infección puede iniciar al momento en que se lleva a cabo la ordeña ya que en ese momento el canal del pezón permanece parcialmente abierto. Si el pezón presenta lesiones lo hace más susceptible a contraer infecciones. Los organismos presentes en las lesiones del pezón o del ambiente (echaderos, materia fecal) pueden invadir fácilmente el canal. Cuando los microorganismos logran entrar al interior del pezón como primer paso es dañar los tejidos que recubren los tubos colectores de leche (Figura 4, 1). Los leucocitos se encuentran en la leche en bajas cantidades y son la segunda barrera de defensa después del pezón, éstos entran en función ante un microorganismo extraño debido a que éstos lo pueden destruir en su totalidad. (Figura 4, 2). Si esto no ocurre en su totalidad, el agente patógeno seguirá multiplicándose y comenzara a invadir los pequeños conductos y alveolos. (Figura 4, 3) (Ganadería, 2015).

Cuando los microorganismos no son eliminados totalmente, pueden continuar multiplicándose y comenzar a invadir los pequeños conductos y áreas alveolares (Figura 4, A). Las células secretoras de leche que son dañadas por las toxinas, liberan sustancias irritantes que conducen a un incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos (Figura 4, B). Leucocitos adicionales se mueven al lugar de la infección, penetrando el tejido alveolar en gran medida moviéndose entre el tejido secretor de leche dañado (Figura 4, C). Fluidos, minerales y factores de coagulación también se mueven dentro del área infectada. La leche coagulada también puede cerrar conductos afectados para aislar las regiones infectadas. (Ganadería, 2015).

Dstrucción del tejido alveolar. Algunas veces los microorganismos son eliminados rápidamente y la infección se aclara. En este caso, los conductos tapados se abren y la composición y producción de leche retorna a la normal en varios días. Aun así, a medida que la infección persiste y los conductos se mantienen tapados, la leche encerrada hace que las células secretoras pasen a una etapa de descanso (sin producir) y el alvéolo comienza a reducir su tamaño (Figura 4, D). Las sustancias liberadas por los leucocitos conducen a una destrucción completa de las estructuras alveolares, que son reemplazadas por tejido conectivo

y cicatriza (Figura 4, E y F). La destrucción del tejido secretor de leche es, en efecto, la tercera línea de defensa de la vaca para mantener a la infección bajo control, por lo tanto a medida que la enfermedad progresa el número de células somáticas en la leche se eleva y se asocia con una reducción (permanente), en la producción de leche (Ganadería, 2015).

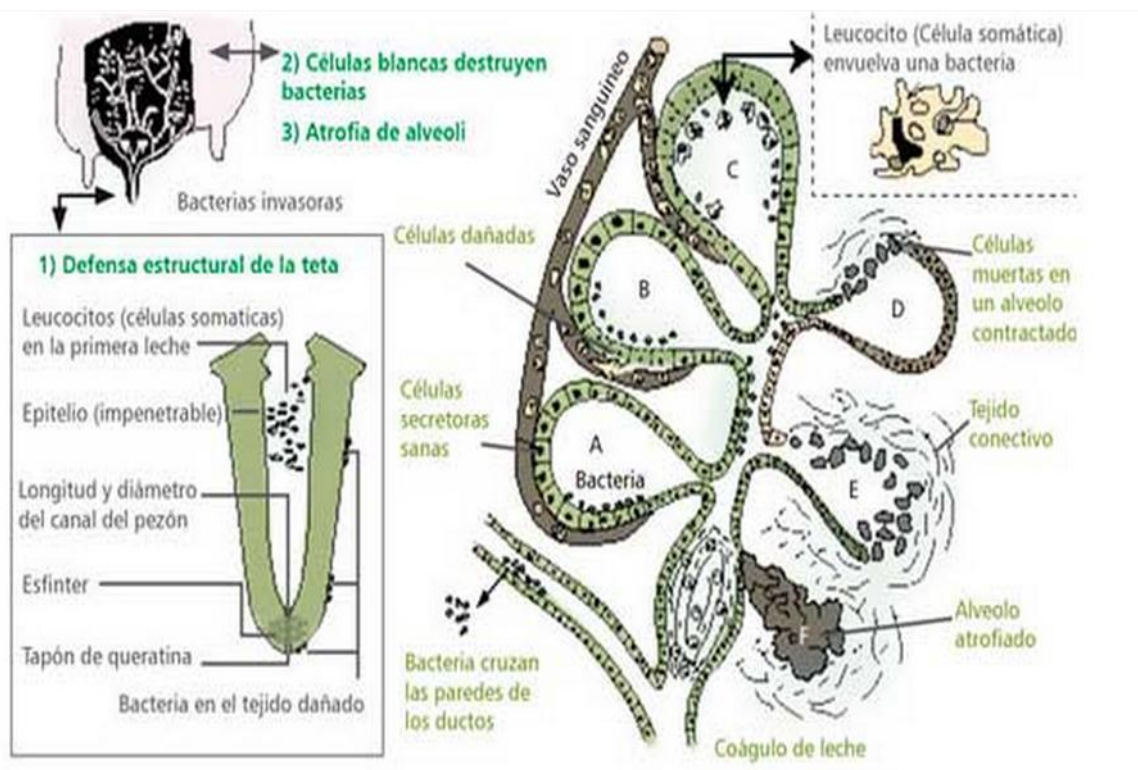


Figura 4. Desarrollo de la mastitis y de la defensa de la vaca contra la infección.
Fuente: (Carrión, 2013)

3.5 Mecanismo de transmisión

La falta de orientación en el manejo de la ordeña ha favorecido este tipo de infecciones. Puesto que los microorganismos causantes de mastitis se encuentran en el ambiente (materia fecal, establo, piel, etc.) (Porporato y Felipe, 2015). Los factores de transmisión por parte del ordeñador son; falta de aseo de las manos, secar con el mismo trapo todos los pezones, el sobre-ordeño, no lavar los pezones antes del ordeño, no utilizar sellador, etc. (Porporato y Felipe, 2015). (Figura 5)

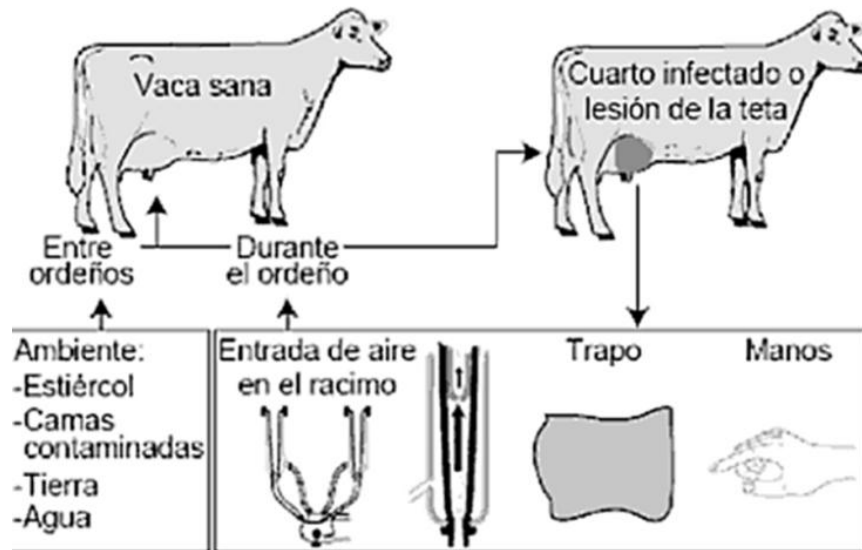


Figura 5. Principales rutas de transmisión durante el ordeño.
Fuente: (Porporato y Felipe, 2015)

3.6 Etiología

La principal causa de la mastitis es infecciosa, se han identificado aproximadamente 140 especies de los cuales se encuentran bacterias, algas y hongos. A continuación se mencionan algunos con mayor prevalencia (Celestino, 2014).

- Microorganismos causantes de la mastitis contagiosa. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp* y *Mycoplasma spp*.
- Microorganismos ambientales causantes de mastitis. Los principales microorganismos reconocidos dentro de este grupo son *Streptococcus uberis*, *Streptococcus equinus*, especies del género *Enterococcus* y *enterobacterias* como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, y especies de *Citrobacter*, *Serratia* y *Proteus*. *Streptococcus dysgalactiae*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, levaduras *Candida sp*. *Cryptococcus sp*. *Trichosporon sp*. *Aspegillus fumigatus*, y el alga incolora *Prototheca sp*, entre otros (Celestino, 2014).

3.7 Métodos para diagnosticar mastitis

En la mastitis subclínica la ubre de la vaca permanece aparentemente sana en contraste la mastitis clínica presenta una serie de síntomas, como fiebre, enrojecimiento de la ubre, la aparición de coágulos, etc. (Bermeo, 2014). Por lo anterior mencionado, hay una gamma de

métodos que diagnostican esta infección así como también permite llevar un control preventivo en la vaca.

- Pruebas de campo; palpación de la ubre, prueba de fondo negro.
- Pruebas químicas; conductividad eléctrica de la leche, papel indicador de mastitis y prueba de whiteside.
- Pruebas biológicas; prueba de California, prueba de Wisconsin, conteo de células somáticas y diagnóstico microbiológico (Fernández *et al*, 2012) (Celestino, 2014).
- Diagnóstico microbiológico basándose en métodos de aislamiento, tinciones, cultivos y pruebas bioquímicas e identificación (Bermeo, 2014).

3.8 Generalidades de las bacterias causantes de mastitis con mayor frecuencia.

Staphylococcus sp. Actualmente hay un aproximado de 42 especies diferentes, en la tabla 1 se muestra la taxonomía de ésta bacteria, algunas de ellas forman parte de la flora normal en humanos, animales mamíferos y aves. Son cocos grampositivos de 0.5 a 1.5 µm de diámetro, se agrupan de forma irregular (racimos de uvas), son bacterias inmóviles y no forman esporas, catalasa positivos, excepto por *S. aureus* sub sp. *anaerobius* y *S. saccharolyticus*, anaerobios facultativos, producen ácidos a partir de glucosa, tanto en aerobiosis como anaerobiosis, toleran altas concentraciones de NaCl (hasta un 10%), temperatura óptima de crecimiento entre 30-37°C. Las colonias son lisas, mucoides, redondas, ligeramente convexas, de 1 a 4 mm de diámetro, algunas cepas producen pigmentos que van desde el anaranjado al amarillo pálido (Koneman *et al*, 2008).

Dominio	<i>Bacteria</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Bacilliales</i>
Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
Género	<i>Staphylococcus</i>
Fuente: (Celestino, 2014)	

Streptococcus sp. Bacteria grampositiva esférica presenta una disposición en cadenas, contiene una alta variedad de especies hemofermentativas, es catalasa negativas, anaerobia facultativa,

generalmente inmóvil con metabolismo fermentativo debido a que producen ácido fórmico, láctico, etanol y CO₂, la temperatura óptima de crecimiento es 37°C. En la tabla 2 se describe

Tabla 2: Taxonomía <i>Streptococcus</i>	
Dominio	<i>Bacteria</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Bacilliales</i>
Familia	<i>Streptococcus</i>
Género	<i>Streptococcus</i>
Fuente: (Celestino, 2014)	

su taxonomía. Algunas especies de *Streptococcus* han sido clasificadas desde el punto de vista serológico sobre la base de los antígenos de la superficie celular formados por carbohidratos, son los llamados grupos de Lancefield, (A, B, C, D, F y G). Otra clasificación es de acuerdo con el tipo de hemólisis, (hemólisis completa, beta [β]; hemólisis incompleta, alfa [α] y ausencia de hemólisis, gamma [γ]) (Koneman *et al*, 2008).

3.9 Generalidades de las levaduras causantes de mastitis.

Candida sp. Su taxonomía se muestra en la tabla 3, comprende más de más 200 especies, son levaduras con ausencia de pigmentos, la forma celular es variable, elíptica, globosa, cilíndrica y triangular; aparecen como colonias grandes, redondas, blanco o crema; su reproducción es por gemación holoblástica o blastoconidios y forman pseudohifas e hifas a excepción de *C. glabrata* (López *et al*, 2012 y Bonifaz, 2010).

Tabla 3: Taxonomía del género <i>Candida</i>	
Clase	<i>Ascomycetes</i>
Subclase	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetes</i>
Género	<i>Pichia, Hansenula, Arxiozyma</i> (estado telomórficos)
Especies	Estados anamorficos se les denomina <i>Candida</i>
Fuente : (Bonifaz, 2010)	

Cryptococcus sp. Hongo levaduriforme que presenta capsula constituida por polisacáridos (xilosa, manosa y ácido glucorónico), los cuales determinan su virulencia por evasión de la fagocitosis y cambios fenotípicos (Arenas, 2011). Se desarrolla en 2- 3 días a temperatura ambiente o 37 °C, colonias limitadas, mucoides y convexas de color blanco- amarillento, microscópicamente miden de 5-10 µm. Presenta dos estados de

reproducción, la asexual (anamorfo) caracterizado por células gemantes y sexual (telomorfo) caracterizado por la producción de basidiosporas (López *et al*, 2012 y Bonifaz, 2010).

Geotrichum candidum y *G. capitatum*. Es un hongo levaduriforme aunque no se reproduce por blastoconidios se desarrolla rápidamente entre 25-37°C; presentan colonias blancas y blanco-amarillento, planas vellosas y húmedas. De forma microscópica se observan hifas macrisifonadas, septadas con arthroconidios rectangulares de aproximadamente 4-10 µm, en la tabla 4 se muestra la taxonomía de las dos especies de ésta levadura (Bonifaz, 2010).

Tabla 4: Taxonomía del género *Cryptococcus*

Phylum	<i>Basidiomycota</i>
Orden	<i>Tremellales</i>
Familia	<i>Tremellaceae</i>
Género	<i>Cryptococcus</i>
Fuente : (Bonifaz, 2010)	

Tabla 5: Taxonomía de *Geotrichum candidum* y *G. capitatum*

División	<i>Ascomycota</i>	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Hemiascomycetes</i>	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Dipodascaceae</i>	<i>Dipodascaceae</i>
Género	<i>Galactomices</i> (fase sexual)	<i>Dipodascus</i> (fase sexual)
Especie	<i>geotrichum</i>	<i>Capitatus</i>
Genero	<i>Geotrichum</i> (fase asexual)	<i>Geotrichum</i> (fase asexual)
Especie	<i>candidum</i>	<i>Capitatum</i>
Fuente: (Bonifaz, 2010)		

Rhodotorula sp. Esta levadura presenta una morfología colonial cremosa, ligeramente acuminada, lisa de pigmentos carotenoides (rosa-rojo) y en ocasiones presenta surcos o pliegues. Su taxonomía se describe en la tabla 5. Microscópicamente su reproducción es anamorfica; por blastoconidios que miden de 2-4 µm de diámetro y fase telomorfica por basidiospora (López *et al*, 2012).

Tabla 6: Taxonomía del *Rhodotorula* spp.

División	<i>Basidiomycota</i>
Clase	<i>Urediniomycetes</i>
Subclase	<i>Sporidiales</i>
Género	<i>Rhodotorula</i>
Fuente : (Bonifaz, 2010)	

Trichosporon sp. Es una levadura que crece a temperatura ambiente (25-28°C), las colonias crecen entre 5 a 8 días; son limitadas, cremosas, acuminadas, cerebriformes, de color blanco-amarillento y no presentan pigmentos. Microscópicamente compuestas por hifas tabicadas de 4 a 8 µm de diámetro; presentan arthroconidios ovales o rectangulares y blastoconidios. En la tabla número 5 muestra la taxonomía de *Trichosporon* (López *et al*, 2012 y Bonifaz, 2010).

Tabla 7: Taxonomía *Trichosporon* spp.

División	<i>Basidiomycota</i>
Clase	<i>Iremeliomycetes</i>
Subclase	<i>Tremelioles</i>
Familia	<i>Saccharomycetes</i>
Género	<i>Trichosporon</i>
Especies	<i>osahii, asteroides, cutaneum, dermatis, domestecum.</i>
Fuente : (Bonifaz, 2010)	

4. Marco de referencia

- ❖ Lassa, y Malinowski (2007), determinaron la resistencia a los antifúngicos de 319 cepas de *Candida*. sp y algas 168 cepas aisladas de leche con mastitis. El estudio se llevó a cabo en Polonia. Los cepas examinadas mostraron la resistencia a la anfotericina B (75,2%), fluconazol (66,8%), pimaricina (40,8%), y el itraconazol (38,9%). Y sensibles a tioconazol (91,2%), clotrimazol (84,0%), y 5-fluorocitosina (82,1%).
- ❖ Marcio y colaboradores (2008), en el estado de Minas Gerais, Brasil investigaron la frecuencia de infecciones intramamarias causadas por levaduras. El estudio se hizo en 1710 muestras de leche de las cuales se aislaron e identificaron 57 levaduras, 1 de *Trichosporon loubieri* y 56 del género *Candida*, *C. albicans*, fue la especie predominante, seguida por *C. parapsilosis*, *C. catenulata*, *C. glabrata*, y *C. tropicalis*. Por lo que concluyen que las levaduras han incursionado como agentes etiológicos ambientales causantes de mastitis.
- ❖ Gerlach y colaboradores (2009), analizaron el costo de la mastitis para el productor. El estudio se llevó a cabo en Sonora con la duración de un año, tomaron en cuenta la producción de leche, los costos de tratamientos y valor comercial de la leche. Concluyendo que el costo promedio mensual de cada animal con mastitis fue \$185.40; en total fueron \$30,966.34, correspondiendo \$12,470.75 (40.3%) a mastitis subclínica y \$18,459.59 (59.7%) a mastitis clínica.
- ❖ Segundo y colaboradores (2011), realizaron un estudio donde evaluaron la presencia de levaduras en 1095 muestras de leche de las cuales 342 fueron de animales sanos, 383 con mastitis subclínica y 370 con mastitis clínica. La identificación de levaduras fue realizada por métodos morfológicos y bioquímicos. Los resultados obtenidos fueron que en animales sanos y con mastitis clínica se encontraron con mayor frecuencia a *Candida glabrata* y *Candida krusei*, y de los animales con mastitis subclínica se encontraron con *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida novorgica*, *Candida albicans*. Esto se determinó por examen clínico y la prueba de California. Las muestras se recabaron del estado de Querétaro, Hidalgo, Puebla y la ciudad de México, Distrito Federal.

- ❖ Ibarra y colaboradores (2012), realizaron un estudio cuyo objetivo fue la formación de biopelículas individuales y mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. La formación se determinó por la actividad metabólica de las células en la biopelícula por medio de la reducción enzimática de una sal de tetrazolio (XTT). Los resultados obtenidos de la biopelícula mixta muestran que *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, incrementan la actividad metabólica y la complejidad de la biopelícula, lo que resulta un aumento de su virulencia. Por lo que concluyen una posible relación sinérgica entre estos microorganismos al desarrollar biopelículas.

- ❖ Langoni y colaboradores (2013), realizaron revisión bibliográfica así como el reporte de un caso de mastitis en São Pedro, Brasil. Donde se analizó la participación de microorganismos ambientales como causantes de mastitis muchas veces relacionados con tratamientos antimicrobianos por tiempo prolongado. Para el reporte del caso trabajaron con 119 muestras de leche. Los resultados finales lograron aislar a *Geotrichum* sp en muestras de leche con mastitis, Por lo que se considera a *Geotrichum candidum* como agente etológico causante de mastitis.

- ❖ Martínez y colaboradores (2015), realizaron un estudio en el municipio de Sotaquirá Colombia en el cual evaluaron el estado de resistencia de los agentes etiológicos de mastitis frente algunos antimicrobianos utilizados en el tratamiento. Se recabaron 390 muestras de las cuales 153 tuvieron mastitis subclínica. Se aislaron *Streptococcus bovis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus epidermidis*, etc. Los resultados indicaron que del grupo de β -lactámicos, mostro que *S. aureus* y *Enterococcus* spp revelo sensibilidad a la dicloxacina; *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp resultaron resistentes a las cefalosporinas. Del grupo de las quinolonas como, *S. aureus* presentó sensibilidad a la ciprofloxacina. La finalidad del estudio fue la orientación para un tratamiento más eficaz.

5. Planteamiento del problema

La mastitis es una enfermedad muy frecuente en ganado bovino productor de leche, que afecta la calidad de la leche en la industria, además de ocasionar cuantiosas pérdidas económicas a los productores lecheros debido a la reducción en el rendimiento, tratamiento clínico y desecho prematuro de vacas por lo que se considera una de las enfermedades más costosas en ganado bovino. La mastitis es un problema de salud en el ganado lechero, causado generalmente por bacterias; sin embargo, en los últimos años se han identificado a microorganismos ambientales como los hongos levaduriformes, *Candida* sp, *Geotrichum* sp, *Trichosporon* sp y *Rhodotorula* sp como causante de esta patología.

Por lo mencionado anteriormente, este estudio es importante para conocer la distribución de bacterias y hongos levaduriformes que afectan la salud de la vaca y la economía de los productores lecheros del municipio de San Salvador el Seco, Puebla. Por lo anterior se plantea la siguiente pregunta científica.

¿Cuáles son los géneros bacterianos y micóticos causantes de mastitis en muestras de leche procedentes del municipio de San Salvador el Seco, Puebla y qué tan importante es la identificación del agente etiológico(s) en el tratamiento?

6. Justificación

Los alimentos consumidos por el hombre son de origen agrícola o pecuario, en la que involucra a la leche bovina. En los hogares mexicanos este producto ocupa el tercer lugar de mayor presencia. Tan solo México participa con su producción con el 1.16% ocupando el lugar 16 en el mundo (Valencia *et al*, 2015). La leche es un alimento consumido a nivel mundial por su riqueza en nutrientes además de ser el primer alimento para los recién nacidos. Es un producto perecedero susceptible al ataque de microorganismos afectando la calidad de éste. Por otra parte algunos de estos microorganismos afectan la calidad de la leche desde el interior de la ubre, la cual si no es tratada de inmediato ocasionará que la vaca se enferme y con ello pérdidas económicas. Una de las enfermedades más frecuentes en ganado lechero es la mastitis producida por bacterias y hongos.

Los patógenos implicados en la mastitis pueden llegar a ser dañinos a los humanos si no se hace una correcta esterilización de la leche, o producción de diferentes quesos artesanales que no llevan una adecuada pasteurización, así como el uso de antibioterapia por tiempo prolongado pudiendo dejar residuos en la leche que puede llegar a ser un problema de salud pública. (Özlem *et al*, 2015). La mastitis ha generado considerables pérdidas económicas, tan solo en Sonora resultó un costo promedio mensual, de cada animal con mastitis fue de \$185.40; en total la mastitis tuvo un costo de \$30,966.34 anual. (Gerlach *et al*, 2009). Mientras que en la zona centro de Yucatán indica pérdida en un periodo de seis meses, de \$129, 600 por concepto de la disminución en la producción; \$11, 250 por el desecho de animales, leche, \$750 y \$313 por concepto de mano de obra extra (Pech *et al*, 2007).

Por ello el objetivo de este estudio es determinar la frecuencia de microorganismos causantes de mastitis en el ganado bovino ubicado en San Salvador el Seco y poder reducir los casos de mastitis, así como tomar medidas preventivas ante esta infección.

7. Objetivos

General:

- Establecer la frecuencia de microorganismos patógenos causantes de mastitis en ganado bovino lechero de tres ranchos del municipio de San Salvador el Seco, Puebla.

Específico:

- Aislar e identificar los géneros fúngicos a través métodos convencionales.
- Aislar e identificar los géneros bacterianos a través métodos convencionales.
- Realizar antifungigramas con los hongos identificados, siguiendo los lineamientos del documento M44-A (Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos).
- Realizar antibiograma con las bacterias identificadas, con base al CLSI.

8. Diseño del estudio

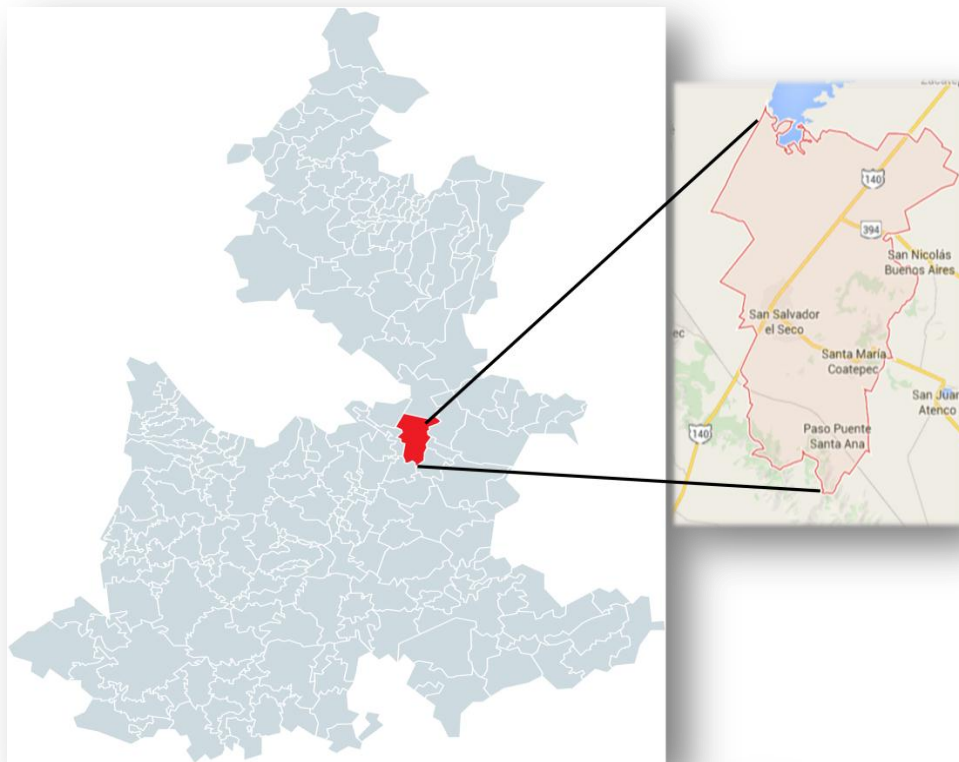
Tipo de estudio. Prospectivo, observacional, descriptivo y transversal.

Universo de estudio. Ganado bovino lechero que esté disponible para el análisis microbiológico en el periodo Marzo- Octubre de 2015.

Tamaño de la muestra. Se obtuvieron 52 muestras en el periodo Marzo- Octubre de 2015.

Sede y lugar del estudio

El muestreo se realizó en el municipio de San Salvador el Seco localizado en la zona centro-oeste en el estado de Puebla (ver mapa). Se encuentra ubicado entre las coordenadas cambiantes de 19° 04' 00" a 19° 15' 36" latitud norte respecto al trópico de cáncer y 97° 32' 54" a 97° 42' 54" longitud oeste respecto al meridiano de Greenwich. La extensión territorial es de 193.91 kilómetros cuadrados, el clima varía entre templado subhúmedo y semiseco, su economía se basa principalmente en ganadería, agricultura y cantería (INAFED, 2016).



Estado de Puebla muestra la posición geográfica de San Salvador el Seco. Fuente Google Maps, 2016.

El análisis de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Micología del Instituto de Ciencias Microbiológicas (ICUAP) y Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, estos edificios están ubicados en Ciudad Universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Ganado bovino que esté produciendo leche aparentemente sano.
- Ganado bovino que presente signos de mastitis.
- Ganado bovino registrado ante la SAGARPA, libre de brucelosis.
- Ganado bovino sin tratamiento farmacológico.
- Muestras tomadas y procesadas el mismo día.
- Permiso expreso para muestrear.

Criterios de exclusión.

- Ganado bovino que este en proceso de gestación finalizada.
- No dieron consentimiento para el muestreo del ganado.

Recursos humanos

- Director de tesis: Dr. Ricardo Munguía Pérez.
- Asesor de tesis: Mtra. Gloria León Tello.
- Tesista: Cristina Sánchez Pérez

Recursos financieros

- Para este estudio se contó con el financiamiento del Laboratorio de Micología que se encuentra a cargo el Dr. Ricardo Munguía Pérez del Instituto de Ciencias Microbiológicas (ICUAP) y el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas.

Diseño estadístico

- Los resultados obtenidos fueron analizados mediante una estadística paramétrica descriptiva, presentándose a través de gráficos y tablas.

9. Material y Metodología

Material biológico

- Muestras de leche procedente de ganado bovino lechero, recolectadas y transportadas de acuerdo a la NOM-109-SSA1-1994, en el periodo de marzo-octubre 2015 (Secretaría de Salud Pública, 1994).
- La cepa de referencia para la identificación de *S. aureus* fue la cepa ATCC 2308, y para la identificación de levaduras, las cepas de referencia fueron proporcionadas por el área de micología del Instituto de Ciencias Microbiológicas (CIM-ICUAP) aisladas de trabajos anteriores.

Metodología

Se seleccionaron vacas aleatoriamente, tanto sanas y que presentaran síntomas de mastitis clínica, para ello se realizó un examen físico (palpación de la ubre), en busca de síntomas típicos que genera la mastitis clínica. De manera general, en el diagrama 1 se muestra el camino que se siguió, para lograr los objetivos antes mencionados. El muestreo y transporte de leche se realizó de acuerdo al Proyecto de la Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994 (Diagrama 2).

El aislamiento de hongos levaduriformes se llevó a cabo por métodos convencionales, en medio dextrosa Sabouraud y micobiótico, las placas se incubaron a 28 °C de 5 a 7 días. Se realizó examen directo con azul de algodón y lactofenol para las colonias de posibles levaduras y después obtener cultivos axénicos. Para la identificación de especies de *Candida* sp, *Rhodotorula* sp, *Thychoспорon* sp, *Cryptococcus* sp y *Geotrichum* sp, se llevó a cabo por algoritmos de trabajo ya establecidos por López y col, 2012; Bonifaz, 2012 (Diagrama 3 y 4).

La realización del antifungigrama se llevó a cabo bajo los métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (M44-A), para ello se trabajó con 5-fluorocytocina, anfotericina B, nistatina, ketoconazol y fluconazol (Diagrama 5). Para el aislamiento de bacterias de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* se llevó a cabo por el método convencional en medio agar sangre de carnero al 5%, las placas se incubaron

a 37°C de 24 a 48 h en condiciones anaerobias y aerobias. Se realizó tinción de Gram, prueba de catalasa y oxidasa de las colonias de interés previamente aisladas. Para la identificación de especies se llevó a cabo por pruebas bioquímicas (tabla 8), (MacFaddin, J.F, 2013). Por último se realizó el antibiograma establecido por el CLSI, por lo que se trabajó con vancomicina, tetraciclina, gentamicina, eritromicina, oxilina y dicloxacilina (Diagrama 6) (CLSI, 2015).

10. Diagrama 1: Esquema general de trabajo.

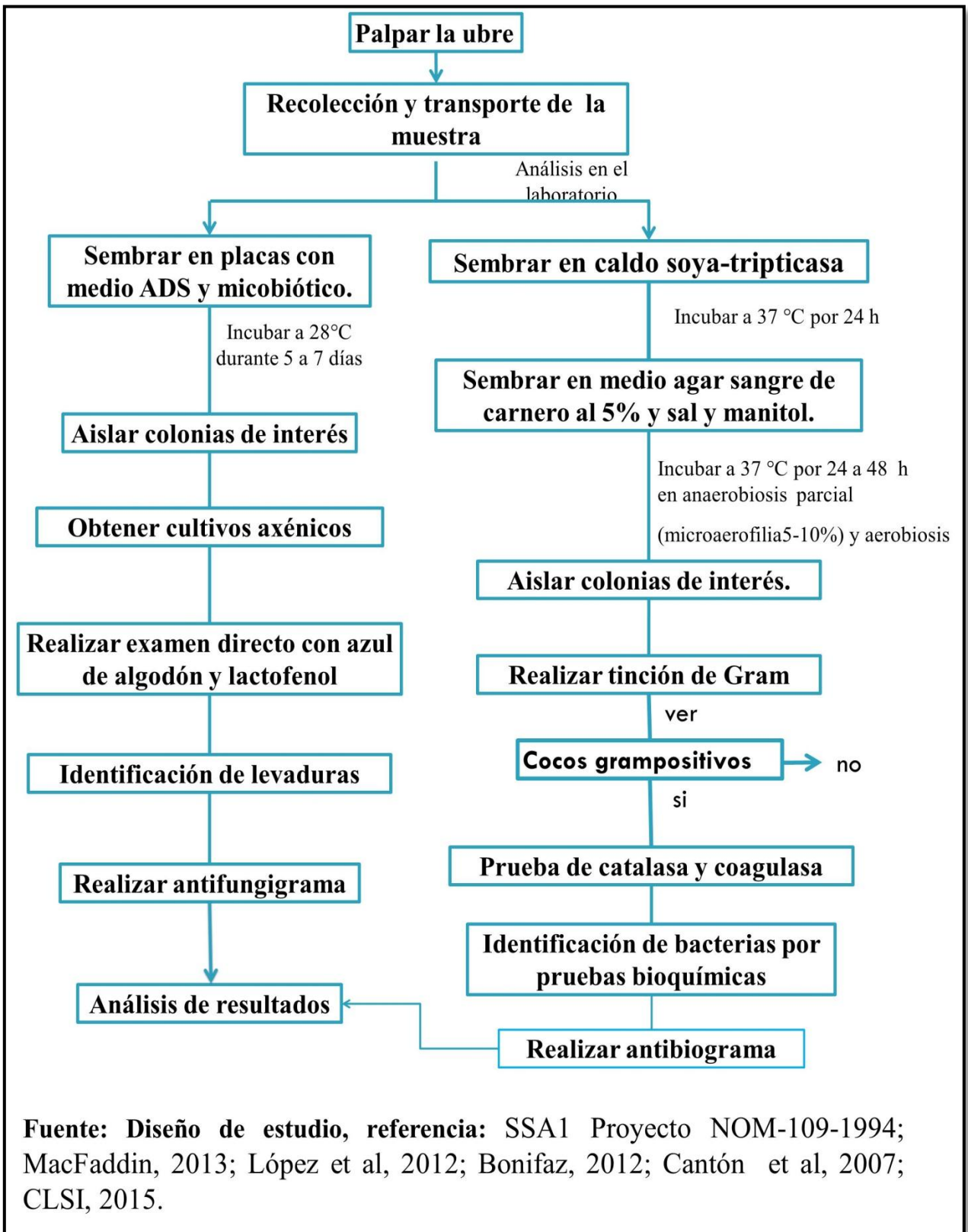
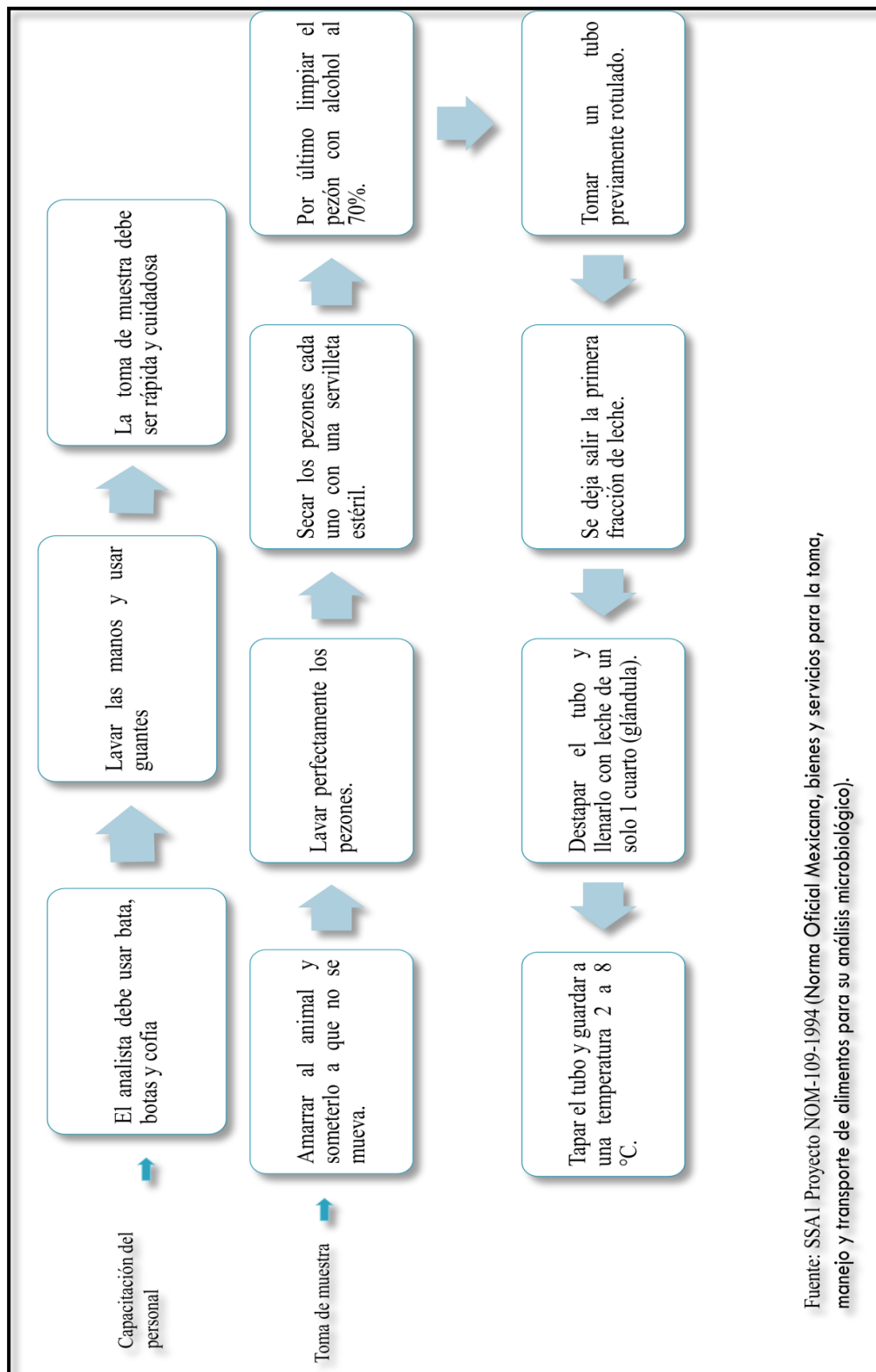
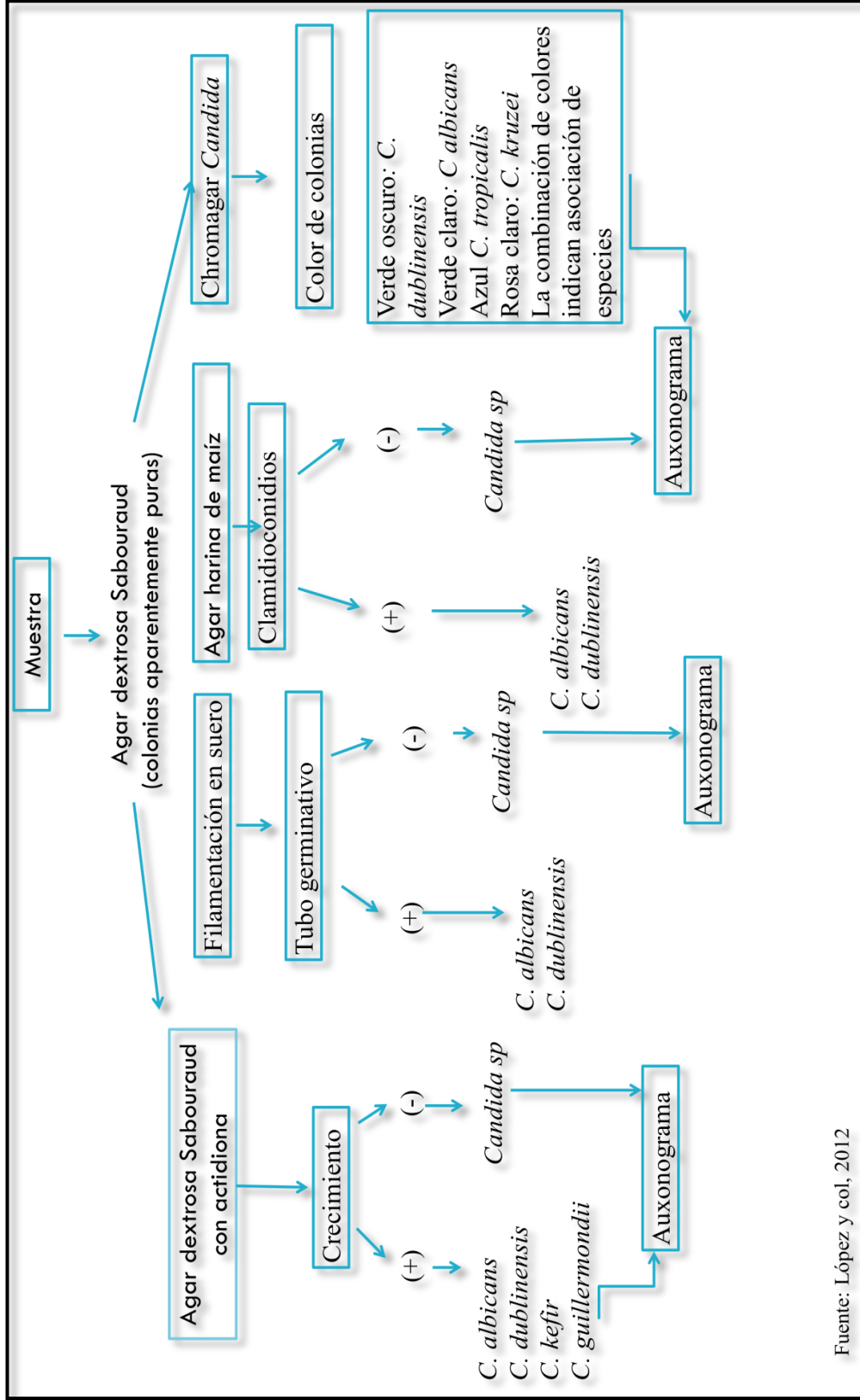


Diagrama 2: Toma de muestra



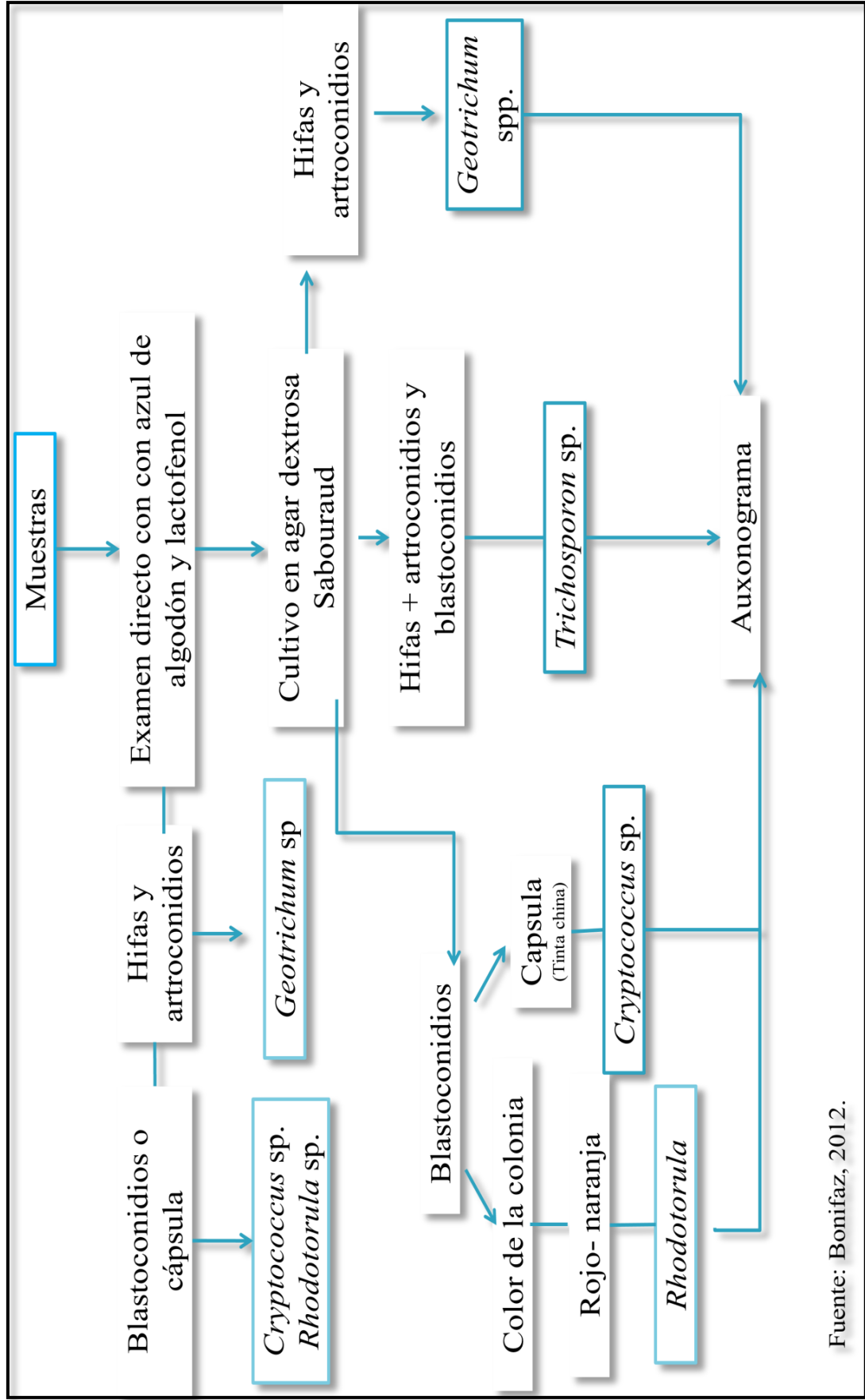
Fuente: SSA1 Proyecto NOM-109-1994 (Norma Oficial Mexicana, bienes y servicios para la toma, manejo y transporte de alimentos para su análisis microbiológico).

Diagrama 3: Identificación de especies de *Candida*.



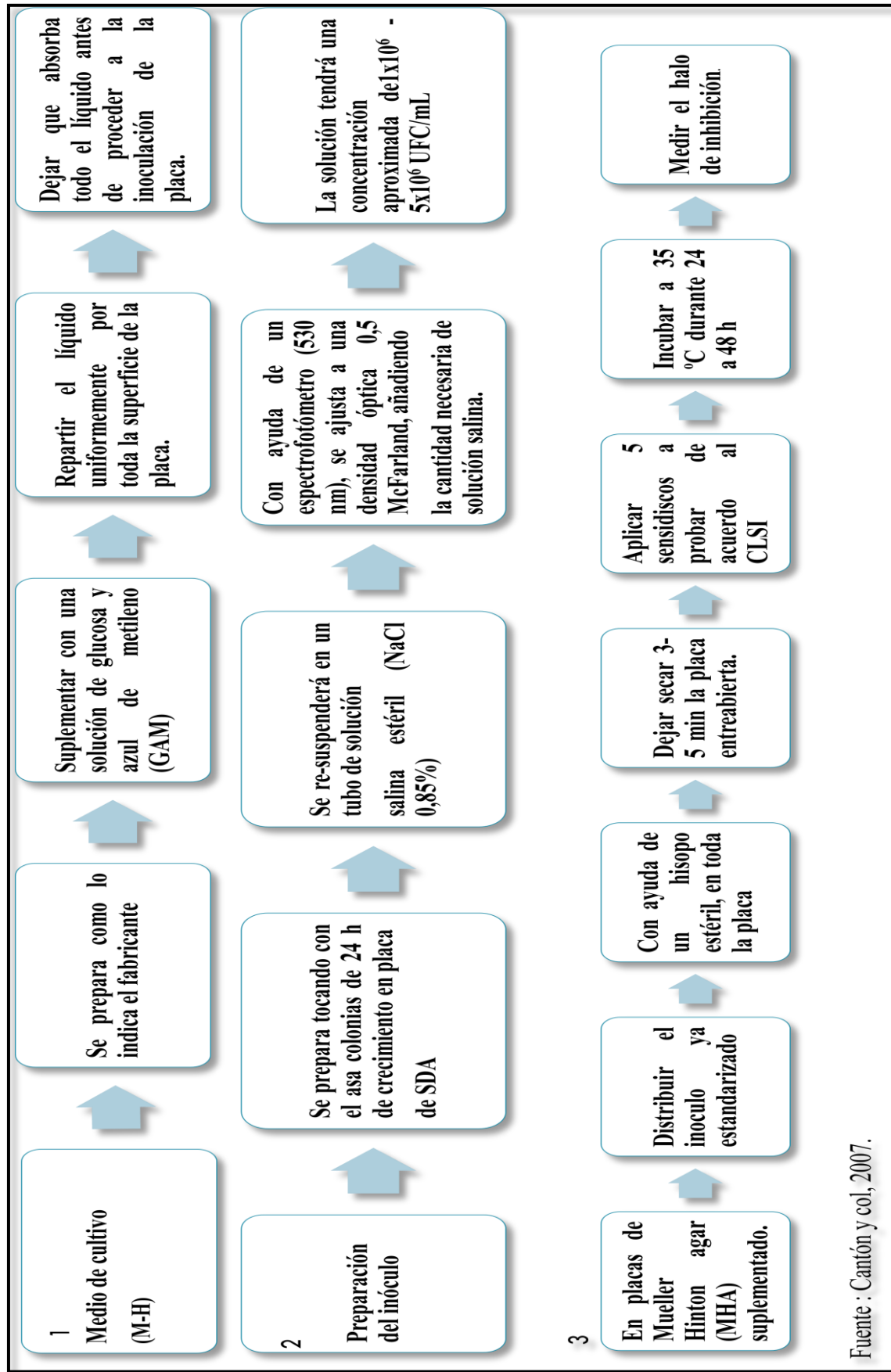
Fuente: López y col, 2012

Diagrama 4. Identificación de *Geotrichum* sp., *Rhodotorula* sp., *Trichosporon* sp y *Cryptococcus* sp.



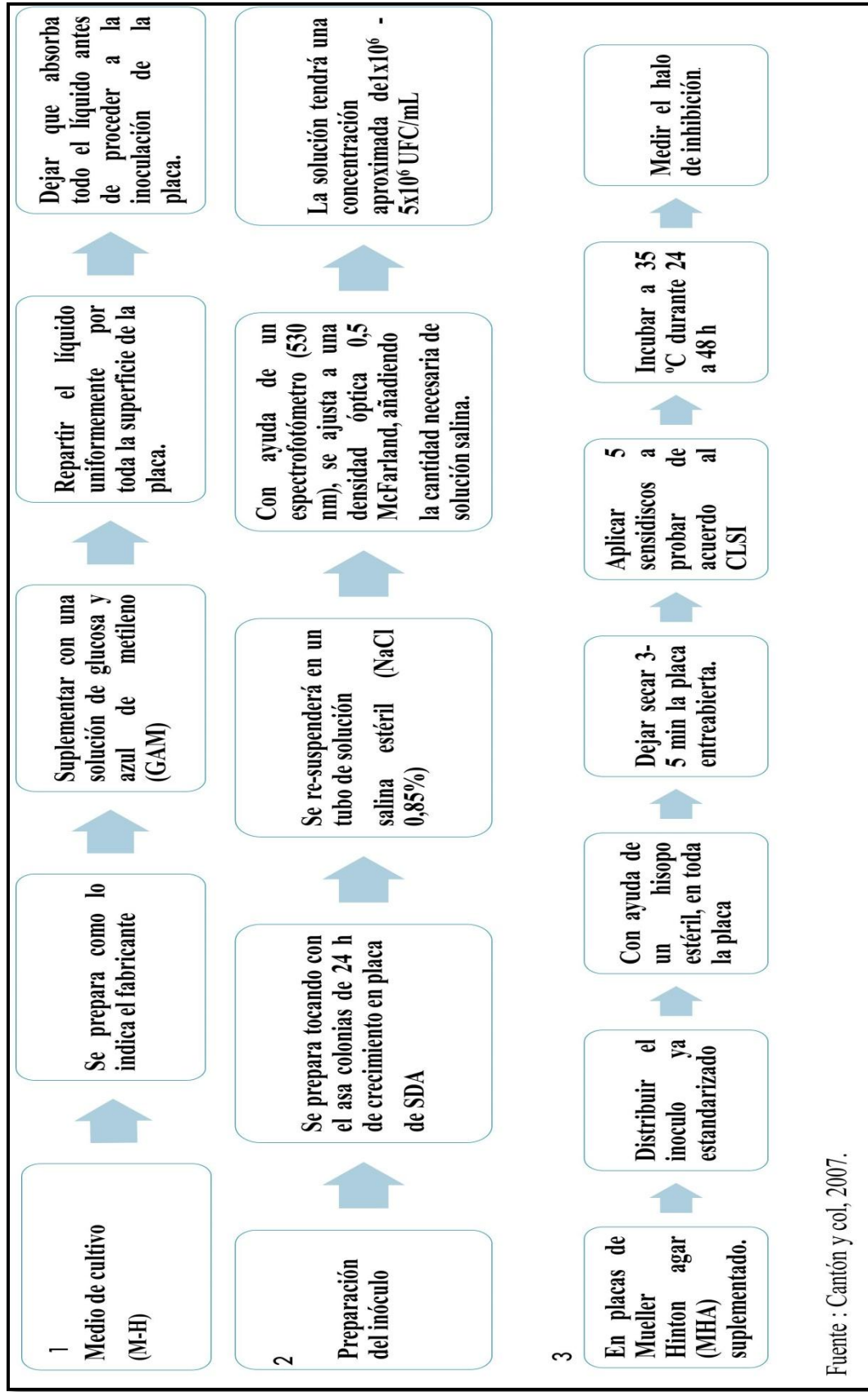
Fuente: Bonifaz, 2012.

Diagrama 5. Antifungigrama (Método de difusión en disco)



Fuente : Cantón y col, 2007.

Diagrama 6. Antibiograma (Método de difusión en disco)



Fuente : Cantón y col, 2007.

Tabla 8. Identificación de *Staphylococcus* spp y *Streptococcus* spp.

Prueba	<i>Staphylococcus</i> sp.				Prueba	<i>Streptococcus</i> sp.			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. huicis</i>	<i>S. intermedius</i>		<i>S. agalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	<i>S. bovis</i>	<i>S. uberis</i>
Catalasa	V	+	+	+	Hemolisis	β	αβα	α	αα
Oxidasa	-	-	-	-	Crecimiento en anaerobiosis	+	+	+	+
Crecimiento en NaCl al 15%	+	+	+	+	Fermentación de lactosa	v	-	A	A
Coagulasa	+	-	v	+	Fermentación de trealosa	A	-	v	A
DNasa	+	v	+	+	Fosfatasa alcalina	+	+	-	v
Ácido a partir de manitol	A	-	-	-	Hidrólisis de esculina	-	v	+	+
Fosfatasa alcalina	+	-	+	+	Resistencia a bacitracina	R	R		
Hidrólisis de esculina	-	-	-	-	CAMP	+	-	-	-
Ureasa	NR	+	v	+	Resistencia a optoquina	S	R	S	NR
Voges- Proskauer	-	v	v	-	Voges- Proskauer	+	-	+	NR
Resistencia a novobiocina	-	-	-	-	Grupo serológico de Lancefield	B	C,L	D	
Resistencia polimixina B	NR	-	+	-					

Fuente: MacFaddin, 2013.

Negativo: -
 Positivo: +
 No hay resultados: NR
 Variable: V
 Sensible: S
 Resistente: R

11. Resultados y discusión

Se obtuvieron 52 muestras de leche de ganado bovino, dónde 32 de ellas (61.5%) se lograron aislar microorganismos patógenos causantes de mastitis. Estas muestras de leche fueron obtenidas de 13 vacas de raza Holstein, procedentes de tres ranchos de San Salvador el Seco (tabla 9), en el rancho 1 hubo más animales disponibles para el análisis microbiológico de acuerdo con los criterios de inclusión establecidos previamente, para el caso del rancho 2 y 3 los animales no cumplían dichos criterios, esto se debe a que se encontraban en tratamiento farmacológico, en proceso de secado, etc. Es importante mencionar que el ganado de los diferentes ranchos esta estabulado y la ordeña es de forma manual.

A cada animal se le realizó un examen físico palpando la ubre, obteniendo que de los 13 animales examinados físicamente, ninguna glándula mamaria presentó signos ni síntomas de mastitis clínica como son: dolor al contacto, anorexia, hipertermia y grumos o tolondrones en leche. La muestra fue obtenida bajo las especificaciones de la SSA-1-NOM-109 (Norma Oficial Mexicana, bienes y servicios para la toma, manejo y transporte de alimentos para su análisis microbiológico). Se realizaron pruebas de laboratorio como tinciones (gram, azul de algodón y lactofenol), cultivos y pruebas bioquímicas para la identificación del agente causal.

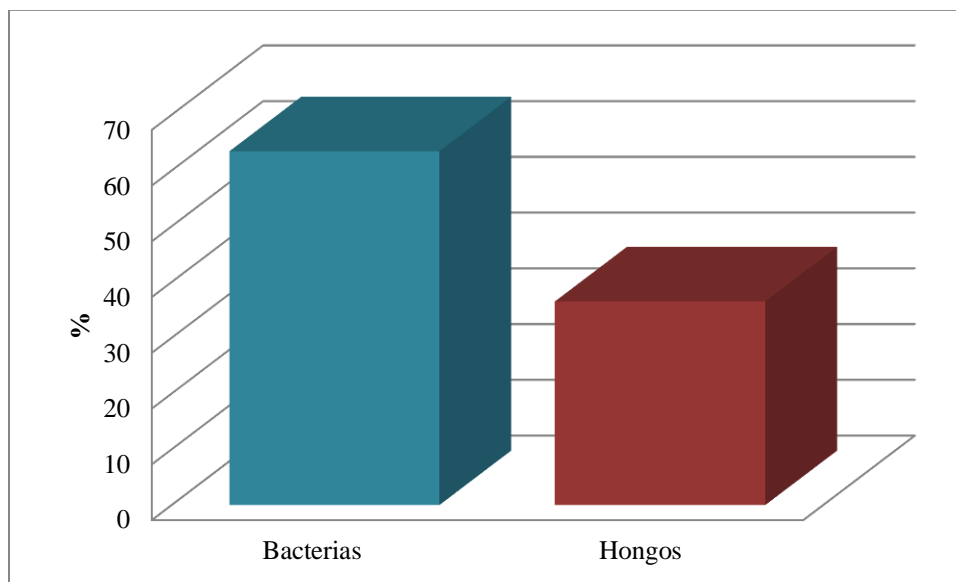
Tabla 9: Número de glándulas mamarias muestreadas por rancho.

Número del Rancho	Número de animales	Número de glándulas	Muestras positivas.
1	5	20	10
2	4	16	11
3	4	16	11
Total	13	52	32

Fuente: Resultados de laboratorio.

11.1 Hongos y bacterias aislados en muestras de leche bovina.

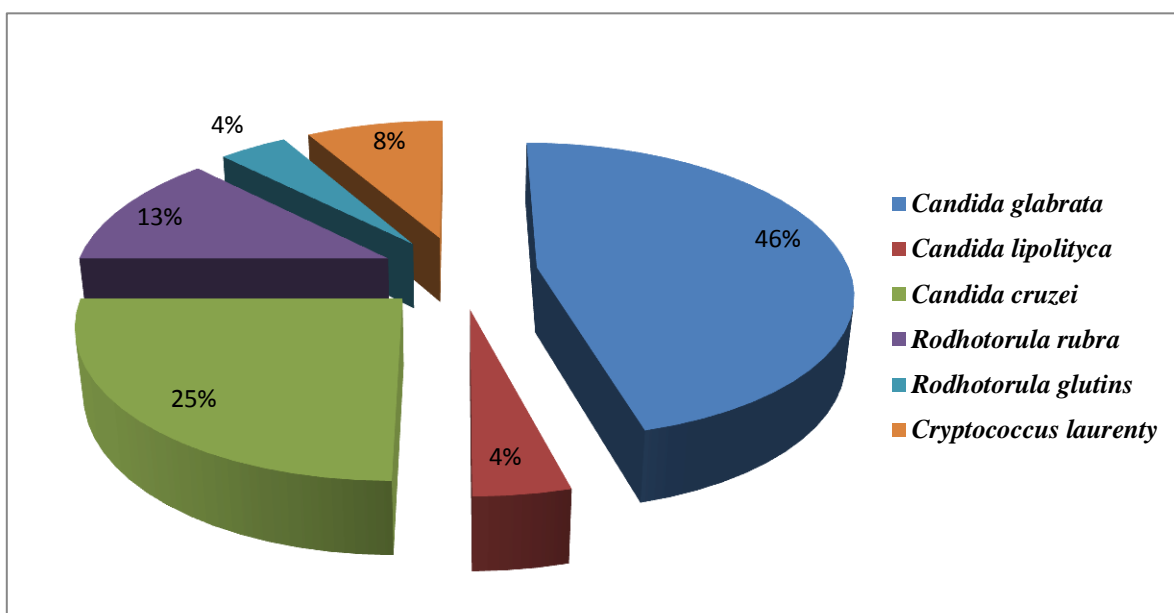
De las 52 muestras analizadas (Gráfica 1) se aislaron géneros bacterianos en un 63.46% (33/52) y géneros fúngicos en un 36.53% (19/52). De los aislados bacterianos se identificaron 18 especies de *Staphylococcus* y 3 de *Streptococcus*. De los aislados fúngicos se identificaron 18 especies de *Candida*, 4 de *Rodhotorula*, 2 de *Cryptococcus* y 2 de *Aspergillus*. Aunque *Staphylococcus* y *Streptococcus* son los principales patógenos causantes de mastitis, se han reportado estudios donde manifiesta la emergente participación de los hongos como agentes etiológicos (Marcio y col, 2008 y Segundo y col, 2011). Esto se debe principalmente al tratamiento prolongado por antibióticos, generando que el sistema inmunológico del animal sea más susceptible a otros microorganismos, como los hongos.



Gráfica 1. Porcentaje de hongos y bacterias aisladas en leche de ganado bovino.
Fuente: Resultados de laboratorio.

La gráfica 2 muestra las diferentes especies de hongos identificados, de la cuál *Candida glabrata* fue aislada en un 46%, *C. kruzei* 25%, *C. lipolytica* 4%, *Rodhotorula rubra* 13%, *Rodhotorula glutins* 4% y *Cryptococcus laurenty* 8%. El género *Candida* es una levadura cosmopolita, lo que hace posible aislarlas en cualquier ambiente, con respecto a su participación como patógeno causal de mastitis, se encuentra con mayor presencia a *C. kruzei* y *C. glabrata* aunque en la actualidad se desconoce el mecanismo de patogenicidad, con exactitud, por lo que se puede deducir que estas especies están ganando terreno en esta

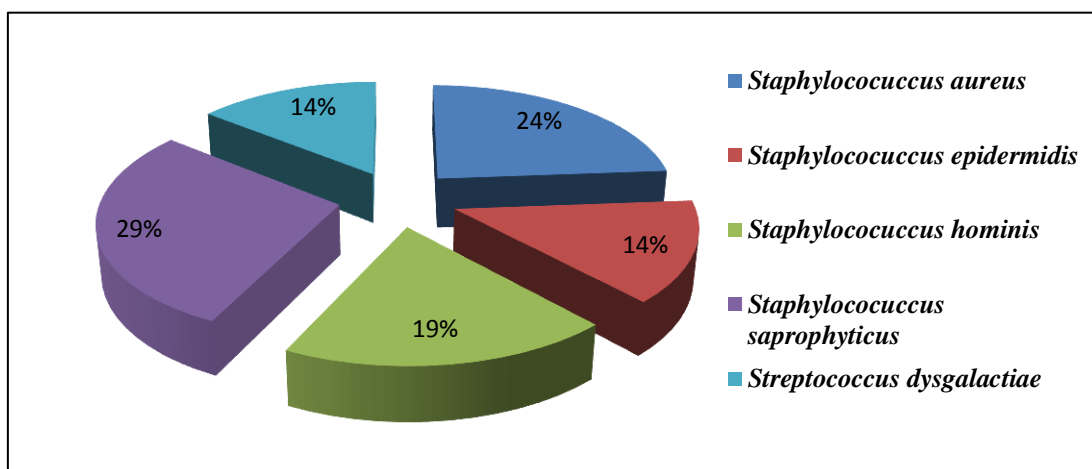
patología aunque no se ha investigado con más detalle. Esto coincide con estudios de Segundo y col. 2011, en la que encontraron especies de *Candida*, donde predomina, *C. glabrata* (30.14%) y *C. kruzei* (27.65%). Sin embargo, para *C. lipolytica* es escasa la información donde se le asocie como patógeno de la mastitis bovina como a *C. kruzei* y *C. glabrata*, pero se le podría considerar como especie patógena causante de esta infección. *Rodhotorula*, se encuentra en la microflora de las uñas, piel, productos lácteos, ambiente como el aire, en el que está adoptando un papel como patógeno en animales y humanos inmunocomprometidos, por esto se le considera una levadura emergente causante de mastitis en ganado bovino.



Gráfica 2: Frecuencia de levaduras presentes en leche de ganado bovino.
Fuente: Resultados de laboratorio.

Los géneros bacterianos identificados en este trabajo son *Staphylococcus* y *Streptococcus*, cuyo aislamiento más frecuente fue de *Staphylococcus saprophyticus* (29%), seguido de *Staphylococcus aureus* (24%), *Staphylococcus hominis* (19%), *Staphylococcus epidermidis* (14%) y *Streptococcus disgalactiae* (14%), (Gráfica 3). *Staphylococcus aureus* es un importante patógeno a nivel mundial causante de mastitis, así como también de mayor prevalencia como agente causal de esta infección manteniéndose epidemiológicamente activa, como menciona Moroni, (2014) en su estudio. Esto se debe a su complejo mecanismo de patogenicidad, lo que es difícil erradicarlo por completo,

asimismo de contagiar fácilmente a animales sanos, la presencia de este microorganismo en el ganado bovino de San Salvador el Seco indica una amenaza constante, por su difícil control. Los microorganismos ambientales comienzan a ser partícipes de múltiples patologías generalmente en organismos inmunocomprometidos. La identificación de *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. epidermidis* en la leche de este poblado, muestra la constante problemática de salud en el ganado bovino y por ende su transmisión al humano cuando consume leche cruda. Respecto al género de *Streptococcus* como causante de mastitis, se tiene en primer lugar a *S. agalactiae* seguido de *S. bovis*, *Streptococcus dysgalactiae*, indicando así que *S. dysgalactiae* reporta baja frecuencia, como lo indica Calderón, y Rodríguez, 2008 en donde *S. dysgalactiae* obtuvo una frecuencia de 2.62%.



Gráfica 3: Frecuencia las. especies aisladas de las bacterias de interés
Fuente: Resultados de laboratorio.

11.2 Sensibilidad antifúngica.

Es importante saber si el tratamiento es efectivo ante el microorganismo que se quiere eliminar, sin embargo, el uso indiscriminado de medicamentos así como el tiempo de su administración, han generado una multirresistencia por parte de los microorganismos teniendo como consecuencia un fracaso en la farmacoterapia. Los resultados obtenidos del antifungigrama (tabla 10), muestra la susceptibilidad y resistencia a diferentes antifúngicos, frente a las cepas aisladas en leche bovina, manifestándose a través de los halos de inhibición.

Tabla 10. Susceptibilidad y resistencia a antifúngicos *in vitro* de levaduras

# Id	No. Glándula	Cepas aisladas	5-Fluorocitocina		Fluconazol		Anfotericina B		Ketoconazol			Nistatina	
			> 20	<10	>19	<14	>10	<10	>20	20-10	<10	>10	<10
1219	4	<i>C. glabrata</i>	S		S		S		S			S	
1219	3	<i>C. glabrata</i>	S			R	S		S			S	
1219	2	<i>C. glabrata</i>	S			R	S		S			S	
1212	3	<i>C. glabrata</i>	S		S		S		S			S	
1360	1	<i>C. glabrata</i>		R		R	S		S			S	
1360	3	<i>C. glabrata</i>		R		R	S				R	S	
1368	1	<i>C. glabrata</i>		R	S		S		S				R
1374	2	<i>C. glabrata</i>	S		S		S		S			S	
1360	4	<i>C. glabrata</i>		R	S		S		S			S	
1357	2	<i>C. glabrata</i>	S		S		S		S			S	
1374	1	<i>C. glabrata</i>		R	S		S		S			S	
1374	4	<i>C. kruzei</i>		R	S		S		S			S	
1212	4	<i>C. kruzei</i>		R	S		S		S			S	
1360	1	<i>C. kruzei</i>	S		S		S		S			S	
1368	1	<i>C. kruzei</i>	S		S		S		S			S	
1368	2	<i>C. kruzei</i>	S			R	S		S			S	
1357	3	<i>C. kruzei</i>		R	S		S		S			S	
7523	1	<i>C. laurenty</i>		R		R	S		S			S	
1219	1	<i>C. laurenty</i>		R		R	S		S			S	
7522	4	<i>R. rubra</i>		R		R	S		S			S	
1368	2	<i>R. rubra</i>		R		R	S		S			S	
1368	2	<i>R. glutins</i>		R		R	S		S			S	
1368	2	<i>C. lipolytica</i>	S		S		S			I		S	
7522	1	<i>Saccharomyces cereales</i>		R		R	S		S			S	

S: Sensible, I: intermedio, R: resistente, # Id: Número de identificación.

Fuente: Resultados de laboratorio.

Para corroborar la sensibilidad o resistencia de las cepas probadas ante los antifúngicos utilizados en este estudio se tomaron en cuenta los criterios que describen en los insertos de los antifúngicos utilizados de la marca BIO-RAD (tabla 11). En el anexo 2 se mencionan características de los antifúngicos utilizados.

Tabla 11. Datos de los discos marca BIO-RAD.					
			Diámetro de la zona de inhibición en mm		
Código	Disco	Carga	Sensible	Intermedia	Resistente
62846	5- Fluorocytocina	1 µg	> 20	20 - 10	≤ 10
62806	Anfotericina B	100 µg	> 10	10	< 10
62856	Nistatina	100 UI	> 10	10	< 10
62866	Ketocolazol	25 µg	> 20	20 - 10	≤ 10
62802	Fluconazol	51 µg	≥ 19	15 - 18	≤ 14

Fuente: Resultados de laboratorio.

Respecto a la sensibilidad de los antifúngicos probados a las seis cepas se puede observar un porcentaje elevado de sensibilidad de estos microorganismos ante la anfotericina B (*C. glabrata*, *C. kruzei*, *Cryptococcus laurenty*, *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis* y *C. lipolytica*, 100%), seguido de ketoconazol (*C. glabrata*, 90.9%; *C. kruzei*, *Cryptococcus laurenty*, *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis* y *C. lipolytica*, 100%), nistatina (*C. glabrata*, 90.9%; *C. kruzei*, *Cryptococcus laurenty*, *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis* y *C. lipolytica*, 100%), fluconazol (*C. glabrata*, 63.63%; *C. kruzei*, 83.3%; *Cryptococcus laurenty*, *Rhodotorula rubra*, y *R. glutinis*, 0% y *C. lipolytica*, 100%) y 5-Fluorocitocina (*C. glabrata*, 54.50%; *C. kruzei*, 50%; *Cryptococcus laurenty*, *Rhodotorula rubra*, y *R. glutinis*, 0% y *C. lipolytica*, 100%) mostraron una susceptibilidad variable.

Tomando en cuenta lo antes mencionado, se tiene que ketoconazol, nistatina y anfotericina B mostraron su eficacia frente *C. laurenty*, *R. rubra*, *R. glutins*, *C. glabrata* y *C. kruzei*, lo cual se debe a que no han tenido contacto probablemente con los antifúngicos, por lo que favorece a la terapéutica, ya que la mayoría del tratamiento aplicado para combatir la mastitis son antibióticos. Esto concuerda con estudios de Lassa, y Malinowski, 2007, donde obtuvieron que *Candida. sp* es resistente a anfotericina B (24.8%), fluconazol (33.2%) y 5-fluorocitosina (82,1%). Por otro lado, la resistencia de *C. laurenty*, *R. rubra* y

R. glutins a 5- Fluorocitosina y fluconazol puede deberse, a que se conoce poco de estas especies, por lo que quizás la concentración mínima inhibitoria (CMI) no fue la suficiente, puesto que aún no hay puntos de corte reportados para estas cepas o simplemente estas son resistentes por naturaleza. Cabe destacar la variabilidad genética interespecie puede contener genes de resistencia a antifungicos, lo que complicaría la comparación entre cepas aisladas de diferentes ambientes. Y esto se debe a que son diferentes cepas que se desarrollaron en distintas circunstancias, aparte de que hay pocos reportes sobre antifungigramas en el estado de Puebla que me permiten comparar con los resultados adquiridos.

11.3 Sensibilidad antimicrobiana

Las bacterias son microorganismos con una alta capacidad de adaptarse a diferentes ambientes, lo que ha originado resistencia ante diferentes tratamientos en la práctica clínica.

Para corroborar la sensibilidad o resistencia de las cepas probadas ante los antibióticos utilizados en este estudio se tomaron en cuenta los criterios que se describen en los insertos de los antibióticos utilizados (tabla 12). En el anexo 2 se mencionan características de los antibióticos utilizados.

Tabla 12. Datos de los discos.				
		Diámetro de la zona de inhibición en mm		
Disco	Carga	Sensible	Intermedia	Resistente
Vancomicina	30 µg	≥ 15		
Tetraciclina	30 µg	≥ 19	18_15	≤ 14
Gentamicina	10 µg	≥ 15	14 13	≤ 12
Eritromicina	15 µg	≥ 18	17 14	≤ 13
Oxicilina	1 µg	≥ 13	12 11	≤ 10
Dicloxacilina	1 µg	----	-----	-----

----: Aún no hay puntos de corte para este antibiótico.

Fuente: Resultados de laboratorio.

En la tabla 13 y 14 se indican los resultados que se obtuvieron del antibiograma, generados por las bacterias de interés.

Tabla 13. Susceptibilidad y resistencia bacteriana <i>in vitro</i> de <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>										
# Id	No. Glándula	Nombre de cepas probadas	Oxacilina			Vancomicina		Dicloxacilina		
			>13	12-11	<10	>15		-	--	--
1212	2	<i>S. aureus</i>			R		I			R
1368	4	<i>S. aureus</i>			R	S				R
116	3	<i>S. aureus</i>			R		I			R
1362	2	<i>S. aureus</i>		I			I			R
1362	3	<i>S. aureus</i>			R	S				R
116	4	<i>S. epidermidis</i>			R	S				R
7520	2	<i>S. epidermidis</i>			R	S				R
116	1	<i>S. epidermidis</i>			R		I			R

S: Sensible, I: intermedio, R: resistente, # Id: Número de identificación. ----: Aún no hay puntos de corte para este antibiótico.

Fuente: Resultados de laboratorio.

Tabla 14. Susceptibilidad y resistencia bacteriana <i>in vitro</i> de <i>S. disgalactiae</i> y <i>S. hominis</i>											
# Id	No. Glándula	Nombre de cepas probadas	Vancomicina			Tetraciclina		Eritromicina		Gentamicina	
			>15			>19	<14	>18	<13	>15	<12
7523	1	<i>S. disgalactiae</i>		I		S		S			R
1368	2	<i>S. disgalactiae</i>		I		S		S			R
1360	1	<i>S. disgalactiae</i>			R	S		S			R
7523	4	<i>S. hominis</i>		I		S		S		S	
1374	1	<i>S. hominis</i>		I		S		S		S	
1360	2	<i>S. hominis</i>		I		S		S		S	
1360	4	<i>S. hominis</i>		I		S		S		S	

S: Sensible, I: intermedio, R: resistente, # Id: Número de identificación.

Fuente: Resultados de laboratorio.

De los cuatro agentes etiológicos aislados en infecciones intratamarias de ganado bovino, se observó un porcentaje variable de sensibilidad, mostrando que la vancomicina (*S. aureus*, 40%; *S. epidermidis*, 66.3%; *S. hominis*, y *S. dysgalactiae* 0%), gentamicina (*S. hominis*, 0%; *S. dysgalactiae*, 100%), tetraciclina y eritromicina (*S. homini*, y *S. dysgalactiae*, 100%), oxacilina y dicloxacilina (*S. aureus*, y *S. epidermidis*, 0%).

Para el caso de las diferentes cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*, se analizó su comportamiento ante el grupo de β -lactámicos. Como la oxacilina, la cual solo una cepa de *S. aureus* produjo sensibilidad intermedia. Para dicloxacilina mostró resistencia del 100%. Lo cual coincide con Acuña, y Rivadeneira, 2008. Estos resultados se deben a que las cepas ya han estado expuestas a estos antibióticos de manera paulatina, generando así mecanismos de resistencia por lo cual complica a la terapéutica de esta infección, ya que al no realizar una correcta identificación del agente causal así como el ambiente propicia que la bacteria realice modificación en su genética expresándonos genes de resistencia. Para estas especies se aplicó solo los β -lactámicos con especial interés de saber si *S. aureus* es una MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina), debido a que este tipo de cepas son causantes de infecciones intrahospitalarias. *S. epidermidis* es parte de flora normal en animales y humanos, sin embargo se ha aislado en personas y animales inmunosuprimidos. Aunque estas cepas se aislaron en animales y saber que son MRSA, da una idea que los microorganismos que se encuentran en el ambiente, pueden llegar a través de fómites o individuos a personas inmunosuprimidas. *S. hominis*, mostró un comportamiento disperso a los diferentes antibióticos, como una resistencia total a la gentamicina, indicando que se trata de la misma cepa a nivel genético. *S. dysgalactiae*, resultó altamente sensible a vancomicina, gentamicina, tetraciclina y eritromicina, coincide con Acuña y Rivadeneira, 2008.

De los diferentes microorganismos aislados de bacterias y hongos no todos están involucrados como patógenos causantes de mastitis pero se les encuentra en el ambiente, como es el caso de *Aspergillus*. sp que se ha reportado como causante de mastitis, a pesar de ser un hongo filamentoso, debido a que presenta una toxina que se ha identificado en leche de ganado bovino (aflatoxina M1) (Gimeno, 2013). En la tabla 15 se muestran los

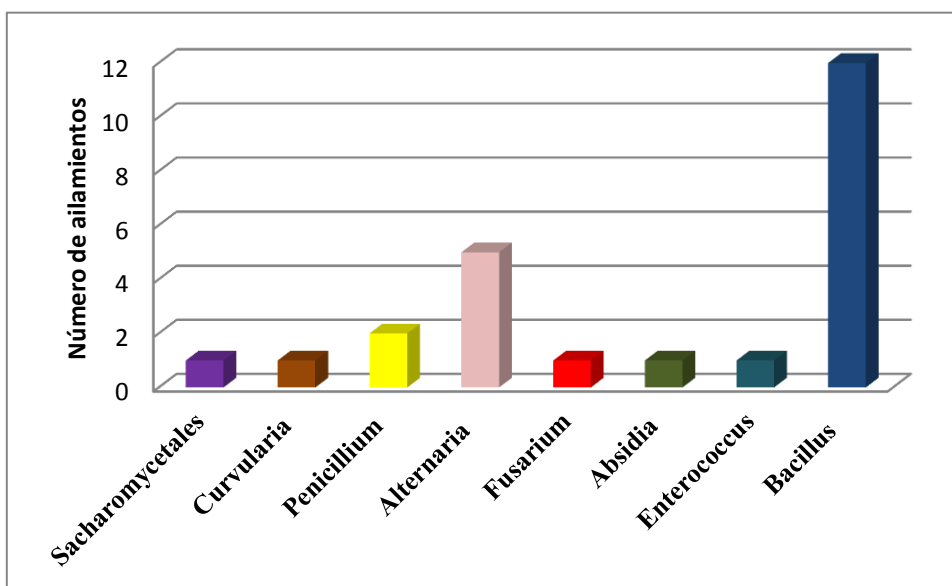
diferentes géneros fúngicos y bacterianos aislados en cada una de las muestras obtenidas de los diferentes ranchos siendo un total de 72 aislamientos.

Tabla 15. Microorganismos aislados en muestras de leche de ganado bovino lechero											
Rancho 1											
No. Glandula	1		2		3		4				
	B	HL	B	HL	B	HL	B	HL	B	HL	
1219		C. laurenty		C. glabrata				C. glabrata			C. glabrata
1212			S. aureus					C. glabrata			C. kruszei
7520	Bacillus. Sp		S. epidermidis	Penicillium sp Alternaria sp	Bacillus. Sp						
7522		Saccharomycetales									R. rubra Penicillium sp
7523	S. dysgalactiae	C. laurenty	Bacillus. Sp	Curvularia sp	Enterococcus. Sp				S. hominis		
Rancho 2											
1368	S. dysgalactiae	C. glabrata C. kruszei		C. kruszei R. rubra R. glabris C. lipolitica Alternaria sp Fusarium sp A. flavus				Alternaria. sp	S. aureus		
1374	S. hominis	C. glabrata	Bacillus. Sp	C. glabrata	Bacillus. Sp				Bacillus. Sp		C. kruszei
1360	S. dysgalactiae	C. glabrata C. kruszei	S. hominis Bacillus. Sp	Alternaria sp	Bacillus. Sp			C. glabrata	S. hominis		C. glabrata
1357	Bacillus. Sp		Bacillus. Sp	C. glabrata	Bacillus. Sp			C. kruszei A. fumigatus Absidia. sp Alternaria. sp	Bacillus. Sp		
Rancho 3											
116	S. epidermidis		S. saprofiticus		S. aureus				S. epidermidis		
1362			S. aureus		S. aureus						
5665	S. saprofiticus								S. saprofiticus		
5091	S. saprofiticus		S. saprofiticus		S. saprofiticus						

Id: Número de identificación, B: Bacterias, HL: Hongos y levaduras.

Fuente: Resultados de laboratorio.

Otros microorganismos aislados fueron *Sacharomycetales* (1), *Curvularia* (1), *Penicillium* (2), *Alternaria* (5), *Fusarium* (1), *Absidia* (1), *Enterococcus* (1) y *Bacillus* (12); de los cuales, *Bacillus* y *Alternaria* presentaron mayor número de aislamientos. La aparición de estos hongos y bacterias se les considera contaminación ambiental ya que hasta el momento no hay reportes indicando la participación como agentes etiológicos de mastitis. Debido a que estos microorganismos se encuentran en ambientes como el suelo, estiércol, pastura, o forman parte de la flora normal en piel de la ubre o del propio pelaje, en donde las vacas se encuentran inmersas en el mismo ambiente.



Gráfica 4. Microorganismos aislados en leche bovina no asociados como causantes de mastitis.
Fuente: Resultados de laboratorio.

Por lo que se puede deducir que el desconocimiento de las buenas prácticas de ordeño es un factor que contribuye al desarrollo y proliferación de la mastitis, al igual de una pérdida económica que involucra varios factores que comprenden los gastos de mano de obra, medicamentos, disminución del volumen de leche, eliminación prematura del animal, etc.

El abuso prolongado del tratamiento para mastitis ha generado notables problemas de resistencia microbiana, por lo que al presentar esta información, puede contribuir con nuevos estudios sobre resistencia y ser tomados en cuenta para un adecuado tratamiento siempre y cuando el agente etiológico sea identificado. La presencia de estos microorganismos a la par con residuos de medicamentos, es de gran impacto en la salud

animal y mala calidad de los productos lácteos, además con una potencial amenaza en la salud pública.

12. Conclusiones

- ❖ Fue posible encontrar microorganismos patógenos causantes de mastitis en ganado bovino lechero, con una frecuencia de 63.46 % de patógenos bacterianos y 36.53 % patógenos fúngicos.
- ❖ Se encontraron levaduras emergentes implicadas en mastitis bovina como *C. glabrata*, siendo de mayor frecuencia, seguida de *C. kruzei*, *C. laurenty* y *R. rubra*. Así como como *Aspergillus. sp.*
- ❖ Se identificó a *S. aureus* en un 24%, lo cual se reporta como el de mayor incidencia a nivel mundial y en el municipio de San Salvador el Seco no fue la excepción. Además de *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN), que también se les ha considerado como emergentes.
- ❖ La anfotericina B, ketoconazol y nistatina, presentaron excelente actividad sobre los diferentes géneros analizados, no obstante fluconazol y 5-Fluorocitocina no lograron causar ningún efecto sobre *Cryptococcus laurenty*, *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*.
- ❖ *S. aureus* y *S. epidermidis* mostraron resistencia a oxacilina y dicloxacilina, así como *S. hominis* a gentamicina.

13. Bibliografía


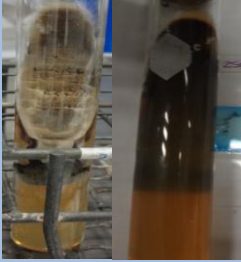


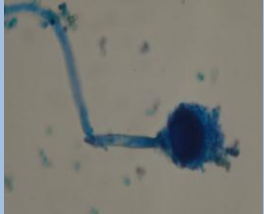

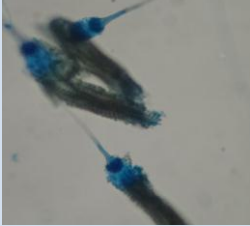

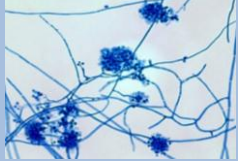
1. Acuña, M. V. L. y Rivadeneira, E. A. P. (2008). *Aislamiento, identificación y antibiograma de Patógenos presentes en leche con mastitis en Ganaderías bovinas de la provincia de pichincha*. Tesis ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO. Pp. 10-50.
2. Arenas, G. R. (2011). *Criptococosis*. En: *Micología medica ilustrada*. Ed Mc Graw Hill. Pp. 242-249.
3. Bermeo, B. M. A. (2014). *Incidencia de la mastitis subclínica bovina, en el sector soldados de la parroquia San Joaquin*. Tesis Universidad del Azuay. Pp. 10-20.
4. Bonifaz, T. A. (2012). *Levaduras*. En: *Micología medica básica*. Ed Mc Graw Hill. Pp. 81-91.
5. Calderón, A y Rodríguez, V. C. (2008). *Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense, Colombia*. Rev Colom Cienc Pecu. **21**: 582-589
6. Cantón, L. E., Martín, M.E y Ingroff, E. A. (2007). *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos documento M27*. Revista Iberoamericana de micología. Pp. 10-13.
7. Carrión, C. R. (2013). *Mastitis subclínica y conteo de células somáticas*. Lechería. [En línea]. Disponible en <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/sanidad/articulos/mastitis-subclinica-conteo-celulas-t5235/165-p0.htm# = .> Fecha de consulta julio 2015.
8. Carvanca, R. F. P., Castel, G. J. M., Guzmán, G. J. L., Delgadillo, P. M., Alcalde, A. M. J y Gonzales, R. P. (2005). *Bases de la producción animal*. En: *Lactación*. Ed Universidad de Sevilla. Pp. 115-117.
9. Celestino, B. C. (2014). *Mastitis bovina causada por Staphylococcus coagulasa negativos*. Tesis Universidad Nacional de La Plata. Pp. 13-32.
10. CLSI. (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement*. Pp: 68-100. [En línea]. Disponible http://ncipd.org/control/images/NCIPD_docs/CLSI_M100-S24.pdf. Fecha de consulta diciembre 2015.

11. Fernández, B. O. F., Trujillo, G. J. E., Peña, C. J. J., Cerquera, G. J y Granja, S.Y.T. (2012). *Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico*. Revista Veterinaria REDVET. **13** (11): 1-11.
12. Ganadería. (2015). Mastitis: *Enfermedad y Transmisión*. [En línea]. Disponible en http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/enfermedades/GA000009en.htm. Fecha de consulta agosto 2015.
13. Gerlach, B. F. A., Ayala, A. F., Francisco, G., Denogean, B. Moreno, M. S., Gerlach, B. L. E. (2009). *Incidencia y costo de la mastitis en un establo del Municipio de Santa Ana, Sonora*. Revista mexicana de agronegocios. Cuarta Época. **24** (1): 789-796.
14. Gimeno, A. (2013). *Residuos de Aflatoxina M1 en la leche y su impacto en la salud humana*. [En línea]. Disponible en: <http://www.engormix.com/MAMicotoxinas/articulos/residuos-aflatoxinas-leche-impacto-t5272/p0.htm>. Fecha de consulta enero 2016.
15. Google Maps. (2016). *Google Maps San Salvador el Seco Puebla*. [En línea]. Disponible en <https://www.google.com.mx/maps/place/San+Salvador+el+Seco,+Pue./@19.1428789,97.6758546,12z/data=!3m1!4b1!4m2!3m1!1s0x85c55b6bcbfa0c4f:0x725d570c97eb542f>. Fecha de consulta marzo 2016.
16. Ibarra, T. C., Villar, V. M., Gaitan, C. L. A., Pozos, G. A., Mendoza E. R y Sánchez, V. L. O. (2012). *Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de Candida albicans y Staphylococcus aureus*. Revista Iberoamericana de Micología. **29** (4): 214-222.
17. INAFED. (2016). *San Salvador el Seco*. [En línea]. Disponible en <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM21puebla/index.html>. Fecha de consulta marzo 2016.
18. Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W.M., Schreckenberger, P. C& Winn, W. (2008). *Cocos Gram positivos relacionados*. En: *Diagnóstico microbiológico texto y atlas a color*. Ed médica Panamericana. Pp. 606-618.
19. Langoni, H., Freitas, G. F., Gomes, W. G., Salina, A & Leony, L. U. (2013). *Geotrichum candidum e sua importância nas mastites*. Veterinaria e Zootecnia. **20**(2):264-269.

20. Lassa, H. y Malinowski, E. (2007). *Resistance of yeasts and algae isolated from cow mastitic milk to antimicrobial agents*. Bull Vet Inst Pulawy. **51**: 575-578.
21. López, R., Méndez, L. J., Hernández, F. y Castañón, L. R. (2012). *Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. En: *Micología médica*. Ed Trillas. Pp. 99-105.
22. MacFaddin, J. F. (2013). *Esquema de identificación*. En: *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed panamericana. Pp. 512-527.
23. Manuel, C. E. (2010). *Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias*. Rev Esp Quimioter. **23**(4):169-176
24. Marcio, C. G., Silva, N., Rosa, C. A., Pareira, F. H. C., Pádua, P. U. (2008). *Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil*. Ciência Rural. Santa María. **38** (7):1938-1942.
25. Martínez, P. D., Cruz, C. A., Millan, A y Moreno, F.G. (2015). *Evaluación del estado de resistencia de agentes etiológicos de mastitis clínica y subclínica frente a algunos antimicrobianos utilizados en hembras bovinas del municipio de Sotaquirá (Boyacá-Colombia)*. Revista Científica. FCV-LUZ. **25**(3):223-231.
26. Morini, P. (2014). *Staphylococcus aureus: epidemiology, treatment, prevention and then...?*. Investigación en Mastitis y Salud Mamaria. **1**(1): 61-64.
27. Özlem, E. S., Sabuncu, A., Başaran, K. B., Koçak, Ö., Yıldar, E & Güzel, Ö. (2015). *Comparison of Intramammary Ozone Administration Doses in Dairy Cows with Clinical Mastitis*. Acta Scientiae Veterinariae. **43**: 1-7.
28. Pastor, G. F. J. I y Bedolla, C. J. L. C. (2008). *Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, mediante la prueba de California*. Revista electrónica de Veterinaria. **9**(10): 1-34.
29. Pech, M. V. C., Carvajal, H. M & Montes, P. R. (2007). *Economical impact of subclinical mastitis in dual Purpose cattle herds of the central zone of Yucatan Mexico*. Tropical and Subtropical Agroecosystems. **7**: 127-131.
30. Porporato, C y Felipe, V. (2015). *Mastitis, Confort Animal y Calidad de leche*. En: *Transmisión de la enfermedad*. Ed Eduvim. Pp. 51.

31. Segundo, Z. C., Cervantes, O. R. A., Docoing, W. A. E., Peña, M. A & Villa, T. L (2011). *Yeasts isolation from bovine mamary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateu*. Revista Iberoamericana de micología. **28**(2):79-82.
32. SENA. (2015). *Derivados láctelos*. [En línea]. Disponible en http://biblioteca.sena.edu.co/exlibris/aleph/u21_1/alephe/www_f spa/icon/31496/pdf/b1_car1.pdf. Fecha de consulta agosto 2015.
33. Simao, R. M., Paranhos, C. M. J. R., Santa, A. A. C y Postos, M.A. (2013). *Manual de buenas prácticas de manejo-ordeña*. [En línea]. Disponible en <http://www.estanciasvh.com/?p=1586> Fecha de consulta septiembre 2015.
34. *Secretaria de Salud Proyecto de la Norma Oficial Mexicana, bienes y servicios para la toma, manejo y transporte de alimentos para su análisis microbiológico NOM-109. SSA1. (1994)*. En: Diario Oficial de la Federación. Pp: 1-5.
<http://www.estanciasvh.com/?p=1586>. Fecha de consulta septiembre 2015.
35. Valencia, S. K., Mora, F. J. S., Bambrila, P.J. J., Martínez, D. M. A y Vaquera, H. H. (2015). *Factores que determinan el consumo de leche en el distrito federal, México*. Revista Científica, FCV-LUZ. **25**: 74-80.
36. Velázquez, B. L., Moreno, A., Lizasoain, I y Leza, J. C. (2008). *Antibioticos y antifungicos*. En: *Velázquez Farmacología Básica y Clínica*. Ed Médica Panamericana. Pp. 830- 890.

Anexo 1: Hongos filamentosos aislados en muestras de leche bovina.

Nombre	Morfología microscópica	Morfología macroscópica
<i>Alternaria sp</i>		
<i>Curvularia</i>		
<i>Aspegillus flavus</i>		
<i>Aspergillus fumigatus</i>		
<i>Bauveria</i>		

Anexo 2. Antibióticos y antifúngicos utilizados para el antibiograma y antifungigrama.

Antibiótico	Grupo	Mecanismo de acción
Vancomicina	Glicopeptido	Inhibe la biosíntesis de la pared celular bacteriana, interfiere en la síntesis de ARN y daña la membrana celular bacteriana.
Gentamicina	Aminoglucosido	Se une a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, impidiendo la transcripción del DNA bacteriano y, por tanto, la síntesis de proteínas en los microorganismos susceptibles.
Tetraciclina		La inhibición de la síntesis proteica bacteriana por su unión reversible a la unidad ribosomal 30S y de esta forma bloquean la unión del aminoacil-tRNA al sitio aceptor en el complejo ribosoma-RNA.
Eritromicina	Macrolido	Inhibe la síntesis proteica al unirse reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano impidiendo la translocación.
Oxacilina Dicloxacilina	Betalactámicos	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, interfiriendo en la síntesis del peptidoglicano mediante un bloqueo en la última etapa de su producción (transpeptidación) pero también actúan activando la autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano.
Antifungico		
Anfotericina B	Macrolido	Se unen a todos los esteroides, aunque muestran una mayor afinidad por el ergosterol que forma parte de la membrana fúngica. La unión con los esteroides de membrana genera la formación de canales por los que la célula fúngica pierde iones y moléculas.
Ketoconazol Fluconazol	Imidazol	Inhibe la biosíntesis del ergosterol o de otros esteroides en los organismos sensibles, lo que daña la pared celular y altera su permeabilidad, ocasionando pérdida de elementos celulares esenciales. También inhibe la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos de los hongos y la actividad enzimática oxidativa y peroxidativa, dando lugar a concentraciones tóxicas de peróxido de hidrógeno que puede destruir los organelos y producir necrosis tisular.
Nistatina	Poliéno	Se une a los esteroides en la membrana celular fúngica, que ocasiona la incapacidad de la membrana para funcionar como barrera selectiva, con la pérdida de constituyentes celulares esenciales.
5- fluorocitocina	Pirimidina fluorada	Impide la síntesis de ADN del hongo, la fluorocitocina sufre una desaminación convirtiéndose en 5-fluorouracilo, un inhibidor no competitivo de la timidilato-sintetasa que interfiere en la síntesis del ADN.

Tomada de: Velázquez y col 2008 y Manuel, 2010.