

INCIDENCIA DE LEVADURAS EN LA LECHE DE ABASTO DE LA PROVINCIA DE LEON*

Por Margarita Rey Fernández

INDICE

1. INTRODUCCION.—2. REVISION BIBLIOGRAFICA.—2.1. *Resumen histórico.*—2.1.1. *Evolución cronológica de los géneros aislados por nosotros a partir de la leche de vaca.*—a. Géneros *Saccharomyces* y *Pichia*.—b. Género *Candida*.—c. Género *Torulopsis*.—d. Género *Rhodotorula*.—2.1.2. *Levaduras en leche.*—2.2. *Taxonomía.*—2.3. *Material y métodos.*—2.3.1. *Aislamiento y mantenimiento.*—2.3.2. *Tipificación.*—2.3.2.1. *Características morfológicas.*—a. *Forma y tamaño de las células.*—b. *Pseudomicelio.*—c. *Clamidosporas.*—2.3.2.2. *Características sexuales.*—2.3.2.3. *Características fisiológicas.*—2.3.2.4. *Pruebas complementarias.*—3. MATERIALES Y METODOS. 3.1. *Recogida de muestras.*—3.2. *Siembras y aislamiento.*—3.2.1. *Técnica de siembra.*—3.3. *Tipificación.*—A. *Características morfológicas.*—1. *Características de reproducción vegetativa.*—2. *Características de las células vegetativas.*—a. *Tamaño y forma.*—b. *Formación de pseudomicelio.*—c. *Formación de clamidosporas.*—B. *Características de cultivo* 1. *Crecimiento en medio líquido.*—2. *Crecimiento en medio sólido.*—C. *Características sexuales.*—1. *Formación de ascosporas.*—D. *Características fisiológicas.* 1. *Utilización de compuestos de carbono.*—a. *Utilización fermentativa.*—b. *Utilización oxidativa.*—2. *Utilización de NO₃K.*—E. *Producción de tubos germinales.*—4. RESULTADOS Y DISCUSION.—4.1. *Frecuencia del aislamiento de levaduras en leche normal: general, por área y zona.*—4.2. *Magnitud del recuento de colonias.*—4.2.1. *Relación entre la magnitud del recuento de colonias y la altitud de las zonas.*—4.2.2. *Magnitud anual del recuento de colonias.*—4.2.3. *Variación estacional del número de colonias.*—4.3. *Géneros y especies aisladas.*—4.3.1. *Incidencia de levaduras facultativamente patógenas.*—4.3.2. *Incidencia de los grupos facultativamente patógenos y no patógenos en relación con las zonas.*—4.3.3. *Incidencia de especies facultativamente patógenas.*—4.3.4. *Incidencia de especies no patógenas en relación con las zonas.*—4.4. *Comparación de incidencia zonal de las principales especies facultativamente patógenas.*—4.5. *Variación estacional de especies facultativamente patógenas y no patógenas.*—4.6. *Resultados de las pruebas especiales efectuadas para la tipificación de las cepas.*—5. CONCLUSIONES.—6. RESUMEN.—7. AGRADECIMIENTOS. 8. BIBLIOGRAFIA.—9. ILUSTRACIONES.

* Los fondos precisos para la realización de esta investigación han sido proporcionados por una beca de Formación del Personal Investigador, del Ministerio de Educación y Ciencia.

I. INTRODUCCION

A partir de la segunda mitad del presente siglo, a causa, principalmente, del uso indiscriminado de los antibióticos, han aumentado de manera alarmante las micosis en el hombre y los animales. Entre este grupo de procesos cabe destacar los determinados por levaduras, tales como, la criptococosis humana y animal, el «muguet» y la vaginitis micótica en la mujer.

En el ganado vacuno, las mamitis, esencialmente las de etiología microbiana, constituyen una de las causas que mayores pérdidas provocan en el país, por la disminución de la producción láctea y, en muchos casos, por la inutilización del animal para ésta.

Los extraordinarios resultados que se obtienen con los antibióticos, sobre todo la penicilina, en el tratamiento de determinados tipos de mamitis, principalmente las de etiología estreptocócica, han llevado al abuso de estos fármacos, dando lugar a la aparición de antibio-resistencias, por un lado, y facilitando la implantación de levaduras, por otro. Es sabido, que estos agentes son resistentes a muchos de los antibióticos antibacterianos. Asimismo, viene destacándose en los últimos años el papel patógeno de diversas levaduras, tanto para el hombre como para los animales.

A la vista de tales hechos y considerando que, según nuestras noticias, no existe ninguna publicación española específicamente dedicada a analizar la presencia y el papel de la flora levaduriforme en la leche de vaca, hemos planeado una investigación tendente a dilucidar:

1. Especies presentes en la leche de vaca, destinada al abasto público o a la industrialización.
2. Posibles variaciones en la incidencia estacional, tanto de las especies, como de la magnitud de la contaminación.
3. Factores ecológicos que puedan influir en la aparición de unas u otras especies y en la estacionalidad de las mismas.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Resumen histórico.

En 1836, CAGNIARD-LATOUR, en Francia, y en 1837, SCHWANN, en Alemania, descubrieron que las fermentaciones del vino y de la cerveza estaban relacionadas con el crecimiento de un hongo. SCHWANN encontró que se multiplicaba por gemación. MEYEN, en 1838, confirmó las observaciones de SCHWANN y denominó al organismo capaz de fermentar la cerveza *Saccharomyces cerevisiae*.³²

El nombre de levaduras, que se impuso rápidamente para denominar a los organismos productores de las fermentaciones alcohólicas, deriva de la influencia que ejercen sobre la masa en fermentación («se lever»: levantarse en francés; «yeast», «gist», «Gischt»: espuma en inglés, holandés y alemán respectivamente; la palabra «Hefe», alemana, utilizada posteriormente, indica el poso que se forma tras la fermentación).

Dado que nos interesamos exclusivamente por las especies halladas en la leche, y habida cuenta de la gran confusión taxonómica terminológica que ha existido y aún persiste en algunos

círculos científicos, estimamos procedente revisar la evolución cronológica de los géneros a que pertenecen las especies estudiadas por nosotros.

2.1.1. Evolución cronológica de los géneros aislados por nosotros a partir de leche de vaca.

a. Géneros *Saccharomyces* y *Pichia*.

En 1938, MEYEN denominó *Saccharomyces cerevisiae* al microorganismo descrito por SCHWANN como fermentador de la cerveza.³²

En 1870, REESS limitó el género *Saccharomyces* a las levaduras esporógenas no formadoras de verdadero micelio, que incluía dentro de los Ascomycetos; durante los años transcurridos desde la primera descripción de MEYEN hasta la clasificación de REESS, se incluían dentro del género *Saccharomyces* la mayoría de las levaduras esporógenas y asporógenas.³²

HANSEN (1904) separó varias especies del género *Saccharomyces*, creando los nuevos géneros *Pichia*, *Willia* y *Saccharomycodes*.³²

b. Género *Candida*.

LANGENBECK (1839) descubrió una levadura en las aftas de una paciente.⁵⁹

GRUBY (1842) estudió la levadura de LANGENBECK y la incluyó en el género *Sporotrichum*.⁵⁹

ROBIN (1847) fue el primero en clasificar a la levadura productora del «muguet» dentro del género *Oidium*.⁵⁹

En 1853, ROBIN, en un tratado sobre micología, dio ya un nombre específico para esta levadura: *Oidium albicans*.^{32, 59}

QUINQUAUD (1868) criticó a ROBIN por haberla incluido dentro del género *Oidium* (previamente utilizado para otro grupo de hongos) y la transfirió al género *Syringospora*, denominándola *Syringospora robinii*.³²

ZOPF, en 1890, creó el nuevo nombre de *Monilia albicans*, para esta levadura.^{32, 59}

El nombre de *Monilia*, incorrectamente usado por ZOPF, ha seguido utilizándose hasta la primera mitad del siglo XX, siendo todavía empleado por numerosos patólogos, en lugar de *Candida*, que es la actual denominación que recibe este género.

Según BENHAN (cit. por WINNER y HURLEY⁵⁹), el nombre de *Monilia* apareció por primera vez en la bibliografía cuando JOHN HILL (1752) lo utilizó para designar un género de hongos que no guarda parecido con las levaduras. Siguiendo a BENHAN (cit. por WINNER y HURLEY⁵⁹), PERSOON (1797 y 1801) lo aplicó a un género en el cual incluyó doce hongos; fue también PERSOON el primero en utilizar el nombre específico *candida* en unión del genérico *Monilia*, para un hongo que no parecía ser ninguno de los pertenecientes a los géneros *Candida* ni *Monilia* sino algún tipo de *Aspergillus*, de coloración blanca. Igualmente señaló que fueron PLAUT (1887) y ZOPF (1890) los que condujeron al error de denominar *Monilia* a la levadura productora del «muguet». El primero aisló un hongo de la madera, que inoculó a pollos, en los que produjo lesiones similares a las de esta enfermedad y al que denominó *Monilia candida*, considerando que era el mismo agente que producía lesiones en el hombre y al que ZOPF dio, en 1890, el nombre definitivo de *Monilia albicans*.

CASTELLANI (cit. por LODDER y KRECER VAN RIJ³²), en 1914, realizó estudios bioquímicos sobre la levadura productora del «muguet», haciendo una comparación entre los géneros *Syringospora* (Quinquaud) y *Monilia* (Zopf), llegando a la conclusión de que pertenecía a este último.

BERKHOUT (1923) propuso el nombre *Candida* para el género.^{32, 59}

En 1939, en una reunión no oficial del III Congreso Internacional de Microbiología en New York, se recomendó el uso del nombre *Candida*.³²

Finalmente, en el año 1954, en el VIII Congreso Internacional de Botánica en París, se aceptó para el género como definitivo y como «nomen conservandum» el de *Candida*.^{31, 59}

c. Género *Torulopsis*.

TURPIN (1838) utilizó el nombre *Torula* para denominar a un determinado género de le-

vaduras, pero esto era inadmisibles debido a que PERSOON había usado, en 1796, dicho término para un grupo de mohos coloreados.³²

BERLESE (1895) sustituyó el nombre *Torula*, dado por TURPIN, por el de *Torulopsis*.³²

El trabajo de BERLESE fue desconocido por muchos investigadores, debido a estar publicado en una revista de difícil acceso, siendo SACCARDO (1906) quien dio como válido el nombre *Torulopsis* de BERLESE.³²

CIFERRI (1925) y CIFERRI y REDAELLI (1929) (cit. por LODDER y KREGER VAN RIJ³²) incluyeron en este género levaduras esporógenas con color e incoloras, con o sin capacidad fermentadora y no formadoras de micelio.

LODDER (cit. por LODDER y KREGER VAN RIJ³²), en 1934, excluyó del mismo a las levaduras productoras de pigmentos carotenoides.

d. Género *Rhodotorula*

HARRISON (cit. por LODDER y KREGER VAN RIJ³²), en 1928, creó los géneros *Rhodotorula* y *Chromotorula* para las levaduras formadoras de pigmento rojo y amarillo, respectivamente.

LODDER (cit. por LODDER y KREGER VAN RIJ³²), en 1934, teniendo en cuenta que es difícil hacer una separación por la formación de pigmento rojo o amarillo, con sus intermedios amarillo-rojo y naranja, incluyó todas ellas en el género *Rhodotorula* rechazando el *Chromotorula*.

2.1.2. Levaduras en leche.

Siguiendo los datos dados por LONFTSGARD y LINQVIST (cit. por BISPINC¹¹), el 1 por 100 del total de las mamitis bovinas está producido por levaduras y parece ser que, en muchos casos, tienen relación con la terapia antibiótica.

Según DI MENNA¹⁶ y FAMEREE y col.¹⁹ fue KLEIN, en 1901, el primero en hacer alusión a la existencia de una levadura en la leche. Estos mismos autores, así como HOFFMANN y col.²⁷ y MITROIU y TOMA⁴⁰, citan a FLEISCHER como el primero que describió una mamitis parenquimatosa producida por levaduras, en 1930.

Según AINSWORTH y AUSTWICK³, THOM, en 1928, sugirió que, en ciertos casos, los hongos encontrados en la leche podrían proceder de ubres con enfermedades micóticas. Estos mismos autores, al igual que FAMEREE y col.¹⁹ y MITROIU y TOMA⁴⁰, coinciden en afirmar que el siguiente hallazgo de mamitis producidas por levaduras, se debió a ROLLE, en el año 1934.

AINSWORTH y AUSTWICK³, identificaron diversos casos de mamitis bovina producidas por distintos géneros de levaduras, entre las que estaban incluidas 6 cepas de *Pichia farinosa*.

DI MENNA¹⁶, en el año 1956, hizo un estudio sobre mezclas de leche normal, con el fin de aislar *Cryptococcus neoformans*, la cual no encontró aunque sí obtuvo otros representantes del género, así como *Candida* spp.

Durante los años comprendidos entre 1960 y 1970, apareció la mayoría de los estudios sobre levaduras de leche, principalmente referidos a mamitis secundarias a tratamientos con antibióticos.^{7, 8, 11, 16, 19, 22, 23, 27, 40, 43, 48, 50, 53, 54, 60, 61, 62}

2.2. Taxonomía.

Es difícil hacer la sistemática de las levaduras, ya que este término incluye los microorganismos en los cuales la forma unicelular es la más sobresaliente, con reproducción vegetativa por gemación, excepto los pertenecientes a los géneros *Sterigmatomyces* y *Schizosaccharomyces* (en el primero la reproducción vegetativa se produce mediante la formación de conidios sobre esterigmas y en el segundo por fisión). Al lado de esta reproducción vegetativa por gemación, muchas levaduras pueden formar micelio septado (pseudomicelio) o no septado; están todas ellas incluidas dentro de los hongos.

Como se desprende de lo anterior, es fácilmente comprensible la dificultad de su delimitación. Sin embargo, dentro de los distintos órdenes pertenecientes a los hongos, hay muchos microorganismos cuyas características son idénticas a las descritas.

AINSWORTH² incluye las levaduras ascospógenas dentro de los Ascomycetos, subclase

Hemiascomycetidae, orden Endomycetales, familias Saccharomycetae y Endomycetae; a las no ascospógenas dentro de los Hongos Imperfectos o Deuteromycetos, orden Moniliales, familias Cryptococcaceae y Sporobolomycetaceae.

LODDER y KREGER VAN RIJ³² establecen varias clases de levaduras, distinguiendo tres grupos principales. El primero comprende aquellas levaduras en las que, al lado de una reproducción vegetativa, existe otra sexual, con formación de ascosporas dentro de ascas. Estas levaduras ascospógenas pertenecen a la clase Ascomycetos, familia Endomycetaceae. El segundo grupo se caracteriza principalmente por una reproducción vegetativa por gemación y por la formación de balistosporas, clasificándose en la familia Sporobolomycetaceae, de posición sistemática incierta, ya que existe la duda de si las balistosporas deben ser consideradas como basidiosporas o como conidios. En el tercer grupo no se forman ascosporas ni balistosporas; estas levaduras pertenecen a los Hongos Imperfectos, familia Cryptococcaceae.

En una amplia revisión taxonómica LODDER³¹ llega, en 1970, a la siguiente agrupación de las levaduras:

1. En el orden Endomycetales incluyen a las levaduras ascospógenas.
2. Un grupo formado por los géneros *Leucosporidium* y *Rhodosporidium* en el orden Ustilaginales, pertenecientes a la clase Basidiomycetes, subclase Heterobasidiomycetidae.
3. Otro grupo formado por la familia Sporobolomycetaceae, dentro de la clase Basidiomycetes.
4. Y un último grupo en el que se incluyen las levaduras que no se reproducen sexualmente, ni forman balistosporas, incluidas en los Hongos Imperfectos o Deuteromycetos, familia Cryptococcaceae.

2.3. Material y métodos.

2.3.1. Aislamiento y mantenimiento.

LODDER³¹ recomienda el uso de un medio selectivo ácido de pH 3,5-4, para el aislamiento de levaduras a partir de sustratos que pueden estar contaminados con bacterias, dando preferencia al uso del ácido clorhídrico diluido o al ácido fosfórico. En aquellos casos en que no puede acidificarse el medio, es conveniente adicionar antibióticos de amplio espectro. Los medios más eficaces para el aislamiento primario son YM de Wickerham o agar malta.

Van UDEN y DO CARMO SOUSA⁵⁷ con el fin de aislar levaduras del intestino bovino, realizaban cultivos primarios en medio líquido a base de extracto de levaduras, glucosa y peptona, inhibiendo el crecimiento de bacterias por adición de antibióticos (penicilina y estreptomycinina). A partir de este caldo hacían resiembras en medio sólido, adicionando agar al anterior y ajustando el pH con ácido láctico a 3,5.

PARLE⁴⁴, en aislamientos a partir de tracto digestivo de mamíferos, utilizaba como medio agar Sabouraud a pH 4.

DI MENNA¹⁶, para aislar levaduras de leche bovina, utilizó agar Sabouraud a pH 3-4, adicionando ácido clorhídrico 1 Normal, empleando como inóculo el sedimento de la leche y leche entera.

SWINNE-DESGAIN⁵³, realizaba el aislamiento a partir del sedimento de la leche, adicionando los antibióticos al inóculo.

2.3.2. Tipificación.

2.3.2.1. Características morfológicas.

a. Forma y tamaño de las células.

LODDER y KREGER VAN RIJ³² recomiendan para el estudio de las células de levaduras y de las colonias, extracto de malta y agar malta, respectivamente.

DI MENNA¹⁶, VAN UDEN⁵⁶, YARROW^{60, 61, 62} para estudiar las células de levaduras aisladas de leche y de intestino de bóvidos utilizan las técnicas recomendadas por LODDER y KREGER VAN RIJ³².

b. *Pseudomicelio*.

Todos estos autores que hemos citado anteriormente, y la mayoría de los consultados por nosotros, estudian la formación de pseudomicelio en «Corn meal Agar», según recomiendan LODDER y KREGER VAN RIJ.³²

c. *Clamidosporas*.

Según AINSWORTH² son esporas de pared gruesa no persistentes, asexuales, intercalares o terminales, formadas por redondeamiento de una célula o células; su nombre deriva del vocablo griego «chlamys» = capa.

La mayoría de los autores utilizan los siguientes medios para la producción de clamidosporas:

1. Agar arroz o medio de Taschdjian, más Tween 80 al 1 por 100.¹³
2. «Corn meal Agar» más Tween 80 al 1 por 100^{4, 9, 13, 51}.
3. Medio de clamidosporas o de Nickerson^{4, 13}.

DAWSON¹⁵ utilizó los siguientes medios para comprobación de su eficacia: Medio de Taschdjian, «Corn meal Agar» y agar Czapek-Dox, más Tween 80 al 1 por 100 y realizando dos tipos de siembra, en «bocadillo» y en profundidad; en el primer caso consiste en colocar el inóculo entre dos películas del medio y en el segundo en practicar una extensión del inóculo al ras de la placa por debajo del medio. Esta autora consideraba más eficaz el último medio (agar Czapek-Dox), no siendo imprescindible la adición de Tween 80 para la formación de las clamidosporas.

2.3.2.2. *Características sexuales*.

El estudio de la formación de ascosporas por las levaduras constituye el primer paso para la diferenciación en familias. Se precisa la utilización de un medio pobre y realizar su observación mediante extensiones teñidas, que permitan diferenciar claramente las ascosporas de las células de las levaduras (células vegetativas).

LODDER y KREGER VAN RIJ³² recomiendan medios preparados a base de vegetales, como zanahoria, patata, remolacha, pepino y nabos, o bien medios especiales como el agar Gorodkova, agar acetato de Fowell, agar acetato de McClary, etc. Es recomendable el uso de un medio de pre-esporulación, que puede ser agar YM de Wickerham, o bien agar malta. Para la tinción de las esporas, previa extensión en porta, utilizan el método de WIRTZ modificado por SCHAEFER-FULTON o el de KUFFERATH modificado; el primero de ellos se basa en una tinción de las ascosporas por el verde malaquita y una coloración de contraste con safranina, en el segundo, las ascosporas se tiñen por la fuchsina y el resto de las células con azul de metileno.

PARLE⁴⁴ estudiando levaduras aisladas del aparato digestivo, utiliza agar Gorodkova para la producción de ascosporas.

Van UDEN y DO CARMO SOUSA⁵⁸, siguen las técnicas recomendadas por LODDER y KREGER VAN RIJ³²

FAMEREE y col.¹⁹ y SWINNE-DESCAIN⁵³ usan como medio de esporulación el V₈ (a base de jugo de vegetales).

2.3.2.3. *Características fisiológicas*.

El estudio de las características fisiológicas de las levaduras, es el más importante para la diferenciación en géneros y especies. Las pruebas comúnmente realizadas son la fermentación de azúcares o zymograma, la asimilación de compuestos carbonados (azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos), la asimilación de compuestos de nitrógeno (nitrito y nitrato potásico, pero sobre todo el último), las necesidades vitamínicas de crecimiento, desdoblamiento de la arbutina, etcétera.³¹

Por regla general, la fermentación de azúcares suele hacerse en medio líquido a base de extracto de levaduras, adicionando peptona y azul de bromotimol como indicador, más el azúcar correspondiente al 2 por 100, excepto en el caso de la rafinosa, que debe ser al 4 por 100

(WICKERHAM, cit. por LODDER y KREGER VAN RIJ³²); o bien, simplemente, extracto de levaduras y el azúcar correspondiente.³¹

Otros autores prefieren el uso del agua de peptona Andrade¹⁷; para la formación de gas, deben introducirse en los tubos campanas de Durham o similares.³²

BÜRGER¹⁴ preconiza el uso de placas de teflón con varias cámaras, tres por cada muestra, en una de las cuales se coloca una suspensión de levaduras más el azúcar correspondiente, cubiertas con un cubreobjetos; el exceso de suspensión pasaría a la segunda cámara, que queda cubierta parcialmente por el cubre: la formación de burbujas de gas puede observarse por debajo de éste. Si el gas es muy abundante, el líquido se desplaza a la tercera cámara. Según este autor, este método es rápido y eficaz, puesto que a las 6-8 horas ya puede comprobarse la formación de gas.

El estudio de la asimilación de compuestos carbonados ofrece gran interés en la diferenciación específica y es uno de los pasos más importantes en la tipificación de las levaduras. Puede realizarse en medio líquido o sólido, siendo más fiel en el primero y más rápido en el segundo. Por otra parte, la asimilación en medio sólido ofrece la ventaja de poder realizar el método auxonográfico, consistente en la distribución, dentro de la misma placa donde se ha mezclado el inóculo y el agar, de los diferentes azúcares convenientemente separados y marcados, lo que da una visión de conjunto, pudiendo rápidamente apreciarse, por comparación del crecimiento, los azúcares que son asimilados.

La preparación de los medios líquido y sólido es similar, basta con añadir en el último la cantidad de agar suficiente para su solidificación.³²

Estas técnicas de asimilación, sobre todo la del método auxonográfico, son las utilizadas por la mayoría de los autores en la tipificación de levaduras aisladas de diferentes sustratos.^{19, 53, 60, 61, 62}

La asimilación del nitrato potásico puede hacerse, al igual que la de compuestos carbonados, en medio sólido o líquido, si bien en el primero es conveniente adicionar, en una parte de la placa, peptona a fin de que sirva como testigo del crecimiento.³²

2.3.2.4. *Pruebas complementarias*.

Denominamos pruebas complementarias aquellas que se utilizan con fines de diagnóstico rápido de una cepa determinada, como podría ser la comprobación de cápsula en *Cryptococcus neoformans*, mediante tinción con tinta china, o la producción de tubos germinales en *Candida albicans*.

En nuestro trabajo hemos realizado, esta última, es decir, la filamentación rápida, producción de tubos germinales o fenómeno RB, por *Candida albicans*.

Según AINSWORTH² los tubos germinales son hifas germinativas que emergen a través de un poro (poro germinal), formado en la pared de la célula.

El fenómeno de la filamentación se produce en líquidos orgánicos, tales como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo o albúmina.⁶

El medio más frecuentemente usado es el suero sanguíneo de distinta procedencia: humano, bovino, equino, canino, de conejo y de cobayo.³⁶

MACKENZIE³⁶, utilizando como medio los sueros descritos anteriormente, en una cantidad de 0,5 ml. por tubo de siembra (tubos de hemólisis, Durham o similares) y como inóculo 8×10^6 células, hace la observación después de transcurridas 2-3 horas a 37° C.

ALTERAS y GAVRILESCO⁶ utilizaron sueros humano y de animales, y como inóculo el vértice de una colonia.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Recogida de muestras.

Se recogieron 481 muestras de leche, representativas de los doce meses del año, en el período que abarca desde el 1 de mayo de 1969 hasta el 30 de abril de 1970. Dichas muestras pertenecían a trece zonas de la provincia leonesa y dos localidades zamoranas limítrofes y fueron facilitadas por Kraft Leonesa S. A. En todo caso, las muestras representaban la mezcla de leches de cada localidad.

A lo largo del período de recogida, se hizo una toma semanal de cada una de las zonas, a la llegada de la leche al muelle de embarque de la central, rechazándose aquella leche que no se consideró apta para la industrialización; así como aquellas muestras que, por dificultades de transporte, nos fueron suministradas después de haber transcurrido doce horas, o más, desde el momento del ordeño. Por otra parte, durante los meses de invierno no fue posible obtener, algunas semanas, las muestras correspondientes a zonas de montaña. Siendo 195, el total de las muestras no estudiadas.

La muestra se dispuso en frascos de vidrio con tapón de rosca, estériles, en los cuales se mantuvo a refrigeración (+ 4° C) hasta el momento de su estudio, período que no excedió, en ningún caso, de 6-8 horas desde la recogida.

Las zonas estudiadas fueron las siguientes:

Gordoncillo:	Granja San Francisco Granja Bexar Castrovega Caserío Villada
Benavente:	Fuentes Ropel Villalobos Fresno
Valencia de Don Juan:	Valencia de Don Juan Javares Caseríos V. C. A.
Toral:	Laguna de Negrillos Cimanes San Millán Villalobar
San Miguel de Escalada:	San Miguel de Escalada Villiguer Villafañe

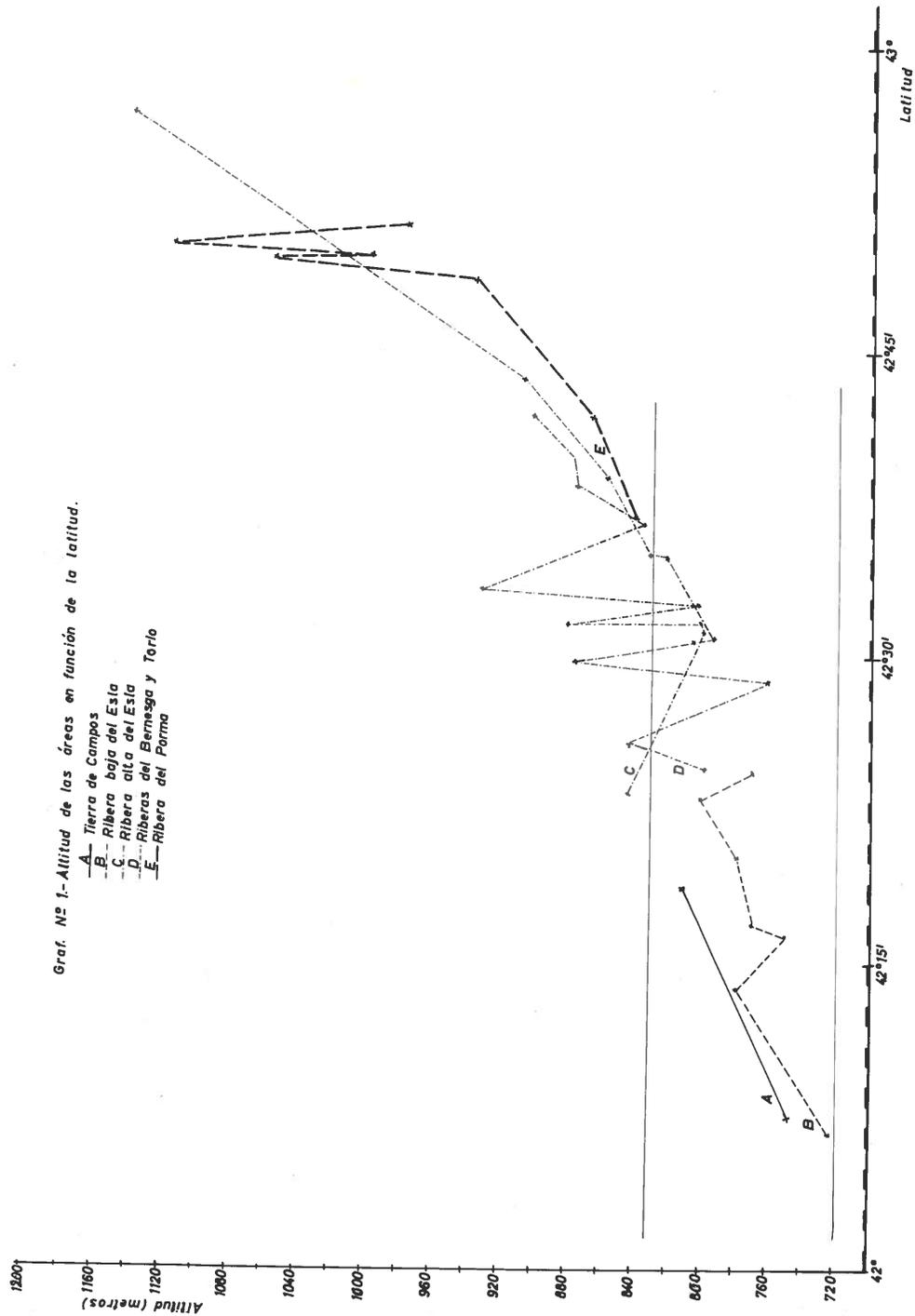
Gradefes:	Vegas Monasterio Gradefes Villanofar Villapadierna Garfín
Mansilla:	Villamoros Villamoratiel Saelices
Santa María del Páramo:	Fontecha Chozas de Abajo Valdevimbre
Infanzones:	Onzonilla Torneros Granja Alvarez
Roderos:	Roderos Trobajo del Camino
Cármenes:	Villanueva de Ponteado Piornedo Ruiforco Villanueva del Arbol
Condado:	Vegaquemada Devesa Curueño Villafruela
Boñar:	Boñar Felechas Las Bodas Veneros y Oville.

Estas zonas se encuentran enclavadas en la mitad oriental de la provincia de León, abarcando terreno montañoso y de meseta, con altitudes que varían desde 720 a 1.187 m. (gráf. n.º 1).

Teniendo en cuenta las distintas características de las zonas y con el propósito de agrupar los resultados de modo homogéneo, se han reunido en cinco áreas: cuatro correspondientes a una situación fluvial (Ribera del Porma, Riberas del Bernesga y Torio, Ribera alta del Esla y Ribera baja del Esla) y la quinta al área de Tierra de Campos, con una sola zona (Gordoncillo).

La distribución de las zonas (de sur a norte), es como sigue:

Tierra de Campos: Gordoncillo.



Ribera baja del Esla: Benavente, Valencia de Don Juan y Toral.
 Ribera alta del Esla: San Miguel de Escalada, Gradefes y Mansilla.
 Riberas del Bernesga y Torio: Santa María del Páramo, Infanzones, Roderos y Cármenes.
 Ribera del Porma: Condado y Boñar.
 La localización de las áreas, zonas y pueblos correspondientes puede observarse en el mapa núm. 1.

3.2. Siembras y aislamiento.

De cada muestra se realizaron tres siembras para el aislamiento de levaduras. La primera consistente en 1 ml. de leche en 20 ml. de medio de cultivo; la segunda, 1 ml. de una dilución 10^{-1} de leche en agua destilada estéril, en 20 ml. de medio; y la tercera una siembra en estría del sedimento de la leche, obtenido centrifugando 15 ml. de leche a 2.500 rpm durante 15 minutos.

Medio:

Agar malta (Difco) al que se adicionaba ácido láctico al 10 por 100 en una proporción de 1:100 con el fin de obtener un pH ca. 4, para evitar el crecimiento de bacterias.

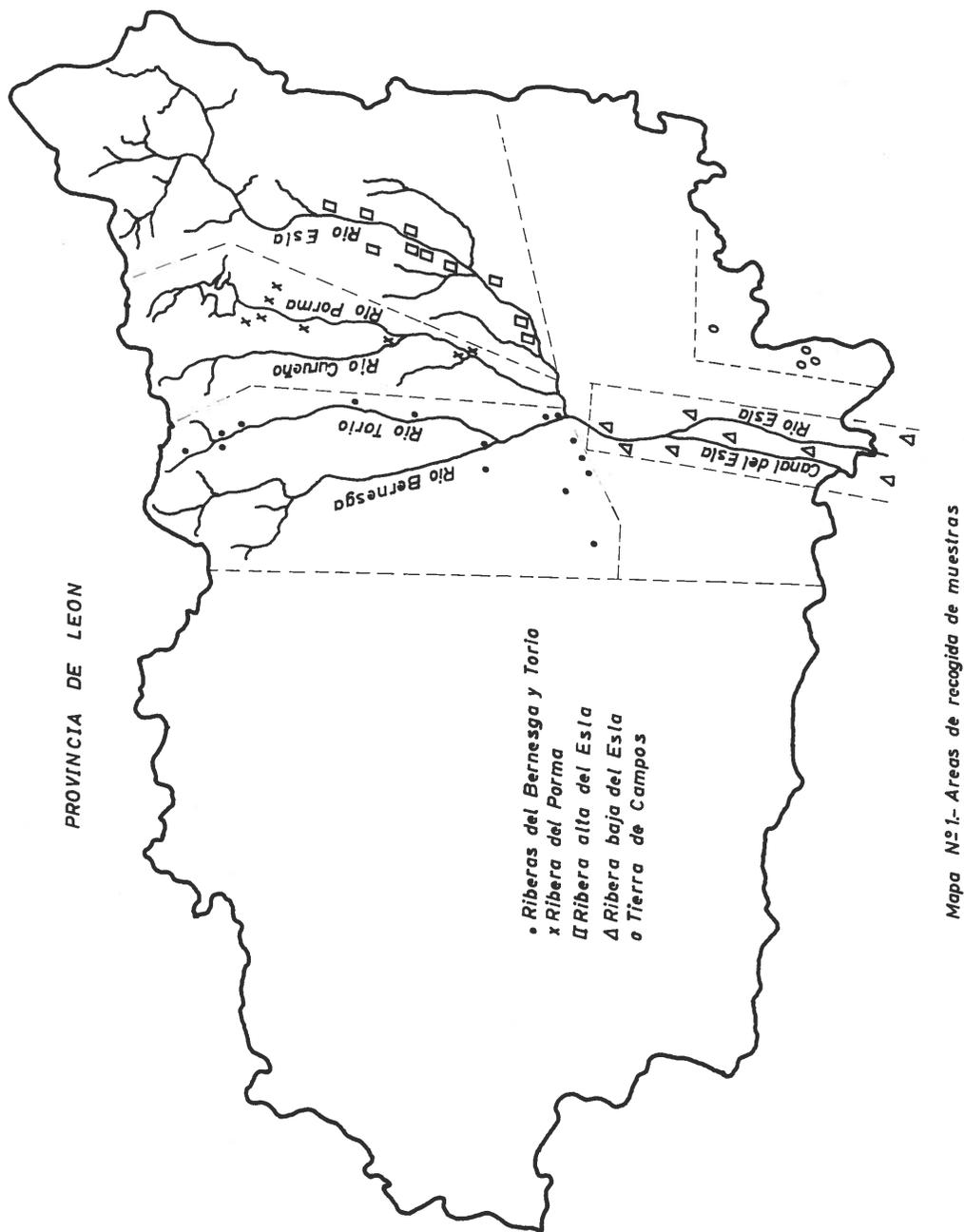
3.2.1. Técnica de siembra.

En las dos primeras siembras, se mezclaba el medio y el inóculo mediante movimiento circulares y de lateralidad de las placas, para conseguir la mayor homogeneidad posible de la muestra. Para la tercera, se conservaron placas con el medio en refrigeración (+ 4° C) hasta el momento de su uso. Las siembras se incubaron a 37° C durante cuatro días. Transcurrido este tiempo, se procedió al recuento de colonias y selección de las cepas representativas. Dicha selección se realizó basándose en criterios morfológicos, macroscópicos (y microscópicos cuando el tamaño de las colonias suministraba material suficiente para una observación directa y para la siembra), atendiendo al tamaño, color y forma de las colonias. Para ello se tomaba una sola colonia y se sembraba en picadura con asa de platino acodada, sobre agar malta inclinado en frascos de vidrio con tapón de rosca (vaccine bottles, Griffin & George).

Estas cepas se mantuvieron a temperatura de laboratorio (18-20° C), después de 72 horas a 37° C, hasta el momento de su tipificación realizando nuevas re-siembras de las mismas cada dos meses, con el objeto de mantener su vitalidad.

3.3. Tipificación.

Para la tipificación de las cepas, se han seguido las pautas indicadas por LODDER³¹ basadas en los siguientes caracteres:



- A. Características morfológicas.
 - 1. Características de reproducción vegetativa.
 - 2. Características de las células vegetativas.
- B. Características de cultivo.
 - 1. Crecimiento en medio líquido.
 - 2. Crecimiento en medio sólido.
- C. Características sexuales.
 - 1. Formación de ascosporas.
- D. Características fisiológicas.
 - 1. Utilización de compuestos carbonados.
 - a. Utilización fermentativa.
 - b. Utilización oxidativa.
 - 2. Utilización de NO_3K .
- E. Formación de tubos germinales.

De una manera sistemática, se ha efectuado la prueba de formación de tubos germinales, que aunque se consideran específicas para la determinación de *Candida albicans*, se han realizado en todas las cepas aisladas, para confirmar dicha especificidad.

A. Características morfológicas.

- 1. Características de reproducción vegetativa.

Medio: Se utilizó extracto de malta de la casa Boots (Inglaterra) a una concentración del 4 por 100, esterilizado por filtración a través de Seitz de porosidad EK.

El medio se distribuyó estérilmente en tubos de ensayo (4 ml. por tubo), utilizando como inóculo 0,3 ml. de una suspensión de levaduras en agua destilada estéril.

Se sembraron cuatro tubos por cepa, manteniéndose dos de ellos a 25° C, durante 72 horas, y los otros dos durante cuatro semanas a temperatura de laboratorio (18-20° C). Transcurrido este tiempo se procedió a la observación microscópica directa, de una gota de cultivo entre porta y cubre (Fotog. núm. 1 y 2).

En nuestro caso, todas las cepas estudiadas se reproducían vegetativamente por gemación multilateral, el hecho de que sólo dos géneros (*Sterigmatomyces* y *Schizosaccharomyces*) de los treinta y nueve, aceptados hoy día (LODDER³¹), ten-

gan una reproducción vegetativa diferente de la señalada nos ha conducido a dar poco valor a este criterio en la clasificación.

2. Características de las células vegetativas.

a. Tamaño y forma.

La forma de las células en las cepas estudiadas por nosotros fue, según los casos: redondeada, ovoidea o elongada, por lo cual tampoco se ha dado valor a este criterio.

b. Formación de pseudomicelio.

Medio: «Corn meal Agar» (Difco).

Método de siembra:

Al comenzar la tipificación de las cepas, el método de siembra se realizó siguiendo las técnicas recomendadas por LODDER³¹. Para ello se esterilizaron placas de Petri por calor seco a 170° C durante dos horas, en las que previamente se habían dispuesto unas varillas en forma de U, sobre las cuales se colocó un portaobjetos. En otras placas de Petri estériles, se distribuyó el medio, introduciéndose en las mismas, con ayuda de unas pinzas flameadas, los portaobjetos que se encontraban en las varillas.

Posteriormente, la distribución del medio se realizó directamente sobre los portaobjetos de las varillas con ayuda de una pipeta estéril.

Solidificado el medio, se hicieron tres líneas de siembra con una suspensión de levaduras en agua destilada estéril, disponiéndose en una zona de ellas un cubreobjetos estéril, para obtener debajo del mismo condiciones de anaerobiosis. Se adicionó una pequeña cantidad de agua estéril en cada placa, para evitar la desecación. Estas placas se cultivaron a 25° C durante 72 horas, al cabo de las cuales se observó el crecimiento por microscopía (en las cepas sembradas primeramente, cuando la distribución del medio se había realizado siguiendo la técnica descrita en primer lugar, se eliminaba el medio adherido en la parte inferior del portaobjetos, antes de su observación). La formación, o no, de pseudomicelio, se comprobaba tanto debajo del cubre como en las zonas próximas al mismo (Fotog. núm. 3.)

c. Formación de clamidosporas.

Medio:

El medio utilizado para la formación de clamidosporas fue agar Czapek-Dox (Oxoid), que contiene glicerosfato magnésico, producto sin el cual no tendría lugar la formación de clamidosporas (DAWSON¹⁵), más Tween 80 al 1 por 100.

Las siembras se efectuaron en placas de Petri, en profundidad, con asa de platino acodada, incubándose a 25° C durante 72 horas, transcurridas las cuales se observó el crecimiento directamente sobre la placa a 35 × y 100 × (Fotog. número 4).

B. Características de cultivo.

Aunque las características de cultivo no tienen tanto valor taxonómico como las fisiológicas, se consideró de relativa importancia incluirlas dentro de nuestra clasificación, ya que, en algunos casos, pueden servir para la diferenciación genérica.

1. Crecimiento en medio líquido.

Medio y método de siembra:

El medio utilizado fue el mismo descrito para la observación de las células vegetativas; exactamente igual la técnica de siembra e incubación, realizándose la observación a las 72 horas, cuando el cultivo se mantuvo a 25° C, y al mes cuando se tuvo a temperatura de laboratorio.

2. Crecimiento en medio sólido.

En este crecimiento se observó la forma, tamaño y tipo de colonias (rugosas, lisas, mucosas, etc.)

Como medio se utilizó agar malta (Difco), practicándose las siembras en estría en placa de Petri e incubándose a 25° C durante 72 horas.

C. Características sexuales.

1. Formación de ascosporas.

Se utilizó como medio de preesporulación agar malta y de esporulación agar Gorodkova.

El agar malta, utilizado como medio de preesporulación, ya ha sido señalado anteriormente.

Agar Gorodkova:

Peptona	10 g.
Glucosa	1 g.
ClNa	5 g.
Agar (Oxoid n.º 3)	30 g.
Agua destilada	1.000 ml.

Preparación del medio (agar Gorodkova):

El medio, previa disolución por calentamiento, se distribuyó a razón de 5 ml. por tubo de ensayo, esterilizándose durante 20 minutos a una atmósfera de presión y disponiéndose los tubos, en plano inclinado, para la solidificación.

Método de siembra:

La siembra se efectuó en estría a partir de cultivos recientes en agar malta (crecimiento de pre-esporulación), incubándose a 25° C durante cuatro días, al cabo de los cuales se hizo una primera observación. Las cepas que no esporula-

ron se mantuvieron posteriormente a temperatura de laboratorio durante cuatro semanas, haciéndose una observación semanal.

Tinción de los esporos:

Coloración de Wirtz (modificada)

1. Extensión de una gota de suspensión de levaduras en agua destilada.
2. Secado al aire y fijación por calor.
3. Tinción verde malaquita al 1 por 100 (en solución acuosa de fenol al 1 por 100, preparada sin calentar).
4. Lavado con agua durante un minuto aproximadamente.
5. Tinción con safranina (solución acuosa 0,5 %) durante 30 segundos.
6. Lavado y secado.

Por este procedimiento, los esporos se tiñen en verde y las formas vegetativas en rojo (Fotog. n.º 5).

D. Características fisiológicas.

1. Utilización de compuestos de carbono:

a. Utilización fermentativa.

Se usaron los siguientes azúcares:

Hexosas: D-Glucosa y D-Galactosa.

Disacáridos: Sacarosa, Maltosa, Lactosa y Trehalosa.

Trisacáridos: Rafinosa.

Medio:

Agua de peptona Andrade (Oxoid) a la que se adicionó el azúcar correspondiente en una proporción del 2 por 100, excepto en el caso de la rafinosa, que lo fue al 4 por 100.

Preparación del medio:

Después de proceder a la esterilización del agua de peptona Andrade a 1 atmósfera de presión, durante 20 minutos, se adicionó el azúcar distribuyéndose 2 ml. de medio, en tubos de ensayo de 100 mm. de longitud por 10 mm. de diámetro, que contenían tubos de Durham. Finalmente se procedió a una triple esterilización a vapor fluente, en sesiones de 15 minutos.

Método de siembra:

Por cada azúcar se hicieron siembras de 0,3 ml. de una suspensión de levaduras en agua destilada estéril, en dos tubos, a fin de comprobar la similitud de la reacción en cada uno de ellos, procediéndose al cultivo a 25° C durante una semana y realizándose observaciones del mismo diariamente transcurridas las primeras 48 horas, para comprobar la formación de ácido y gas.

b. Utilización oxidativa:

Para comprobar la asimilación de los compuestos carbonados se utilizaron los siguientes:

Pentosas: D-Xilosa, L-Arabinosa y L-Ramnosa.

Hexosas: D-Glucosa, D-Galactosa, L-Sorbosa y Salicina.

Disacáridos: Sacarosa, Maltosa, Melibiosa, Celobiosa, Trehalosa y Lactosa.

Trisacáridos: Rafinosa y Melezitosa.

Polisacáridos: Inulina y Almidón.

Alcoholes: Eritritol, Ribitol, (Adonitol), Galactitol (Dulcitol), D-Glucitol (Sorbitol), Mio-inositol (Inositol) y Manitol.

Ácidos: D-L-ácido láctico y ácido cítrico.

Las pruebas de asimilación se realizaron por el método auxonográfico.

Medio:

PO ₄ KH ₂	1 g.
SO ₄ Mg. 7 H ₂ O	0,5 g.
SO ₄ (NH ₄) ₂	0,5 g.
Agar (Oxoid n.º 3)	20 g.
Agua destinalada	1.000 g.

Preparación del medio:

Previo calentamiento para facilitar su disolución, se esterilizó a 1 atmósfera de presión durante 20 minutos, manteniéndose a 45-50° C en el baño María hasta el momento de su uso.

Discos auxonográficos (preparación):

Se cortaron discos de papel de filtro muy absorbente con ayuda de un sacabocados de 5 mm. de diámetro y se impregnaron de una solución del compuesto carbonado correspondiente: dicha solución en el caso de la glucosa fue de 5 g. por 100 ml. de agua y en el de los demás compuestos una cantidad tal, que llevara un peso de carbono equivalente al que contendrían 5 g. de glucosa. Se extendieron aisladamente para proceder a su secado, esterilizándose en frascos de vidrio con tapón de rosca a 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

Método de siembra:

Se depositó en placas de Petri, con ayuda de una pipeta estéril, 1 ml. de una suspensión de levaduras en agua destilada estéril y posteriormente se añadieron 20 ml. de medio agitándose ligeramente con movimientos circulares y de lateralidad de las placas, para facilitar la homogeneización de la mezcla.

Solidificado el medio se procedió a la colocación de los discos (6 por placa) cultivándose a 25° C durante una semana y realizándose una lectura diaria transcurridas 48 horas.

Interpretación del crecimiento:

Cuando el crecimiento alrededor del disco fue similar al del resto de la placa, se consideró «negativo»; si fue más abundante, en una zona de 5 mm. de radio, «positivo débil»; y si el radio fue de 10 mm. o superior, «positivo».

2. Utilización de NO_3K .

La técnica seguida fue la del método auxonográfico.

Medio:

PO_4KH_2	1	g.
Glucosa	20	g.
$\text{SO}_4\text{Mg. 7 H}_2\text{O}$	0,5	g.
Agar (Oxoid n.º 3)	20	g.
Agua destilada	1.000	g.

El medio se preparó de manera similar al de la asimilación de compuestos carbonados.

Método de siembra:

La distribución del inóculo y del medio fue semejante a la realizada para la asimilación de compuestos carbonados. Una vez solidificado el medio, en un extremo de la placa se depositó el nitrato potásico haciendo una estría con un asa de platino longitudinal y en el opuesto, peptona, a fin de que sirviera como testigo del crecimiento, ya que ésta es fácilmente asimilada por las levaduras.

Interpretación de crecimiento:

La prueba se consideró «positiva» cuando el crecimiento alrededor de la peptona y del NO_3K , fue mayor que en el resto de la placa; «negativa» cuando el halo de crecimiento sólo existió alrededor de la peptona.

Se repitió la prueba en aquellos casos en que alrededor de la peptona no apareció halo de crecimiento.

E. Producción de tubos germinales.

Para la realización de esta prueba se utilizaron los siguientes sueros: humano, bovino y de conejo.

Preparación del suero:

Una vez obtenida la sangre de distinta procedencia, se dejó en reposo a temperatura de laboratorio durante tres horas, para lograr una buena formación del coágulo y dos horas (por lo menos) a 4°C para su retracción. El suero así obtenido se centrifugó a 2.000-2.500 rpm durante 15 minutos, para liberarlo totalmente de hematíes. A continuación, se esterilizó por filtración con Seitz de porosidad EK; terminada ésta se distribuyó en frascos de vidrio con tapón de rosca y se conservó a -20°C hasta el momento de su uso.

Método de siembra:

Se distribuyeron 0,5 ml. de cada suero en tubos de hemólisis y se sembraron con asa de platino acodada, sirviendo de inóculo la parte superior de una colonia; se incubaron a 37°C durante tres horas, haciendo una observación cada hora.

Interpretación de la prueba:

Se consideró positiva la filamentación de las células, comparando los distintos porcentajes en cada uno de los sueros, contando el número de células filamentadas por cada 500 de levaduras (Fotog. núm. 6).

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1. Frecuencia del aislamiento de levaduras en leche normal: general, por área y zona.

A partir de las 481 muestras de leche sembradas, se obtuvieron 395 aislamientos positivos de levaduras (82,1 %) (cuadro n.º 1).

Atendiendo a las áreas establecidas, el número de muestras positivas y su frecuencia, puede observarse en el mismo cuadro que, corresponde el porcentaje más alto a Tierra de Campos (94,8 %) y el más bajo a la Ribera del Porma (79,2 %).

Los datos existentes en la bibliografía, referentes a la frecuencia de aislamientos positivos de levaduras en leche normal, son escasos y discordantes.

HOFFMANN y col.,²⁷ en experiencias realizadas en Siria, obtuvieron un 3,5 por 100 de aislamientos positivos, sobre un total de 200 muestras estudiadas. BISPING¹¹ aisló 76 muestras positivas de un total de 578 muestras, considerando que todas ellas procedían de contaminación, en concordancia con lo señalado por LONFTSGARD y LINQVIST (cit. por BISPING¹¹) quienes comunicaron que la existencia de levaduras en mama resultaba altamente improbable.

Por el contrario, DI MENNA¹⁶, estudiando 22 muestras de leche normal, aisló diversos tipos de levaduras, así como SWINNE-DESCAIN⁵³, pero sin señalar ningún tipo de frecuencias. FAMEREE y col.¹⁹ llegaron a obtener unos porcentajes positivos en leche normal y mamética del 33,9 y 36,2 por 100 respectivamente.

Ninguno de estos datos se aproxima a los resultados obtenidos por nosotros (82,1 por 100), cifra extremadamente alta, pero hay que considerar que FAMEREE y col.¹⁹ hicieron la investigación partiendo de leche procedente de cuarterones individuales, mientras que nosotros la hicimos sobre leche de mezcla. Por otra parte, aunque las condiciones de esterilidad, desde la toma de muestras en la central hasta el momento de la siembra, fueron estrictamente rigurosas, no podemos afirmar lo mismo desde el ordeño hasta la llegada a la central. Probablemente la presencia de gran número de levaduras pudiera depender de una contaminación a partir del aire, utensilios del ordeño, suelo, e incluso del propio animal. Los autores citados anteriormente, coinciden en afirmar que estos factores pueden ser fuente de conta-

CUADRO N.º 1

Frecuencia de aislamiento y magnitud del mismo en cada una de las áreas y zonas estudiadas

Áreas y zonas	N.º muestras recogidas	N.º muestras positivas	%	Índice n.º colonias por ml. de muestra
<i>Tierra de Campos</i>				
Gordocillo	39	37	94,8	5 ¹
<i>Ribera baja del Esla</i>				
Benavente	36	25	96,4	3
Vcia. de Don Juan	33	33	100,0	3
Toral	36	27	75,0	2
<i>TOTAL Rib. b. Esla</i>	<i>105</i>	<i>85</i>	<i>80,9</i>	<i>3</i>
<i>Ribera alta del Esla</i>				
Mansilla	37	29	78,3	2
San Miguel de Esc.	39	35	89,7	2
Gradefes	38	31	81,8	3
<i>TOTAL Rib. a. Esla</i>	<i>104</i>	<i>95</i>	<i>92,3</i>	<i>3</i>
<i>Riberas Bern. y Torio</i>				
Sta. María del Páramo	35	33	94,2	4
Infanzones	36	28	77,7	2
Roderos	39	28	71,7	2
Cármenes	36	28	77,7	3
<i>TOTAL Rib. B. y T.</i>	<i>146</i>	<i>117</i>	<i>80,1</i>	<i>3</i>
<i>Ribera del Porma</i>				
Condado	39	31	79,4	2
Boñar	38	30	78,9	2
<i>TOTAL Rib. Porma</i>	<i>77</i>	<i>61</i>	<i>79,2</i>	<i>2</i>
TOTAL	481	395	82,1	3

¹⁰ = negativo

1 = de 1 a 25 colonias

2 = de 26 a 100 colonias.

3 = de 101 a 250 colonias

4 = de 251 a 500 colonias.

5 = de 501 a 1.000 colonias.

6 = más de 1.000 colonias, o colonias confluentes.

minación muy importante a tener en cuenta, puesto que, a partir de éstas, podría infectarse el animal, cuando disminuyen sus defensas orgánicas, entre otras causas por la aparición de una mamitis de origen bacteriano.

En la mayor parte de las siembras de aislamiento se observaron hongos filamentosos, siendo éstos menos abundantes cuanto mayor fue el número de colonias de levaduras obtenidas. En el cuadro núm. 2, se precisa la frecuencia del crecimiento de hongos filamentosos, en relación con el número de colonias de levaduras, observándose la disminución paulatina de aquéllos, a medida que aumenta el número de éstas. Puede verse que, cuando no existían levaduras, el porcentaje de cre-

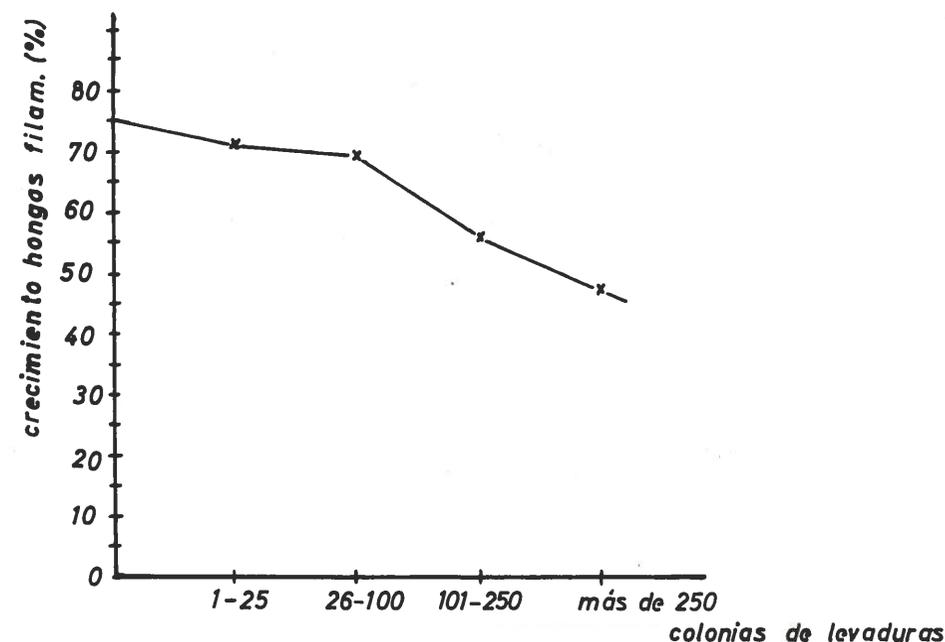
CUADRO N.º 2

Frecuencia de presentación de hongos filamentosos en relación con los aislamientos positivos a levaduras

	LEVADURAS									
	—		de 1 a 25 colonias		de 26 a 100 colonias		de 101 a 250 colonias		más de 250 colonias	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Crecimiento de hongos negativo.	22	25,5	56	29	33	34,6	33	44	18	52,9
Crecimiento de hongos positivo.	64	74,4	137	70,9	60	65,3	42	56	16	47

cimiento de hongos filamentosos alcanzó el 74,4 por 100, mientras que, cuando se aislaron más de 250 colonias de levaduras, lo fue solamente de 47 por 100. Esta relación inversa está representada en la gráfica núm. 2. En relación con esto, no

Gráf. N.º 2.- Relación cultural entre hongos filamentosos y levaduras



hemos encontrado datos que confirmen nuestras observaciones, pero pudiera ser que existiera cierto antagonismo cualitativo o cuantitativo entre las levaduras y los hongos filamentosos, determinante de una inhibición total o parcial del crecimiento.

4.2. Magnitud del recuento de colonias.

El número de colonias de levaduras por placa, para las distintas áreas y zonas, se ha reflejado en el cuadro n.º 1, habiéndose expresado por índices cuyo valor figura al pie del mismo. Se puede observar que existe una relación directa entre la frecuencia de positividad de los aislamientos y la magnitud del recuento de colonias.

Dentro de la bibliografía consultada por nosotros, únicamente SWINNE-DESGAIN⁵³ y FAMEREE y col.¹⁹ expresan el número de colonias obtenidas por placa. El primero observó que el número de colonias sufría una gran oscilación; en las muestras por él recogidas, el número variaba desde una a múltiples colonias confluentes, correspondiendo la mayor frecuencia a aquéllas que presentaban 20 ó más colonias, según se desprende de la interpretación de la tabla de resultados correspondiente. Algo semejante se observa en los estudios realizados por FAMEREE y col.¹⁹

DI MENNA¹⁶ y SWINNE-DESGAIN⁵³ observaron que se obtenía un mayor número de colonias, cuando la siembra se efectuaba a partir de leche directamente, siendo inferior cuando se realizaba a partir del sedimento. Esto corrobora lo observado por nosotros mismos, que pudimos comprobar que no existía una relación directa entre el número de colonias aisladas del sedimento y las obtenidas a partir de leche total. En este sentido, apreciamos en dos muestras con las que previamente habíamos obtenido diferencias importantes en la leche completa, cifras similares en el número de colonias aisladas a partir del sedimento. La causa de la irregularidad en los resultados de ambas siembras, debe guardar íntima relación con la ascensión de un gran número de levaduras en la grasa de la leche, disminuyendo con ello la concentración de las mismas en el sedimento, tal como señalaron DI MENNA¹⁶ y SWINNE-DESGAIN⁵³.

4.2.1. Relación entre la magnitud del recuento de colonias y la altitud de las zonas.

Se ha podido comprobar cierta relación inversa entre el número de colonias y la altitud de las zonas, salvo en el caso de la Ribera baja del Esla, que, a pesar de ser el área de menor altitud, exhibió un índice de colonias similar al de zonas de altitud media (cuadro n.º 3).

Esta relación inversa pudiera deberse a factores ambientales, los cuales determinarían una menor frecuencia de levaduras en aquellas zonas más frías que, naturalmente, son las de mayor altitud. El hecho de que en la Ribera baja del Esla, la incidencia de levaduras haya sido menor, a pesar de ser el área de menor altitud.

CUADRO N.º 3

Relación entre el número de colonias por ml. de muestra y la altitud de las áreas.

Áreas	Índice del n.º de colonias/ml. de muestra	altitud media del área
Ribera del Porma	2 ¹	978 m
Riberas del Bernesga y Torio	3	970 m
Ribera alta del Esla	3	796 m
Ribera baja del Esla	3	761 m
Tierra de Campos	5	779 m

¹ Los índices representan el número de colonias, con la misma correspondencia que en el cuadro n.º 1.

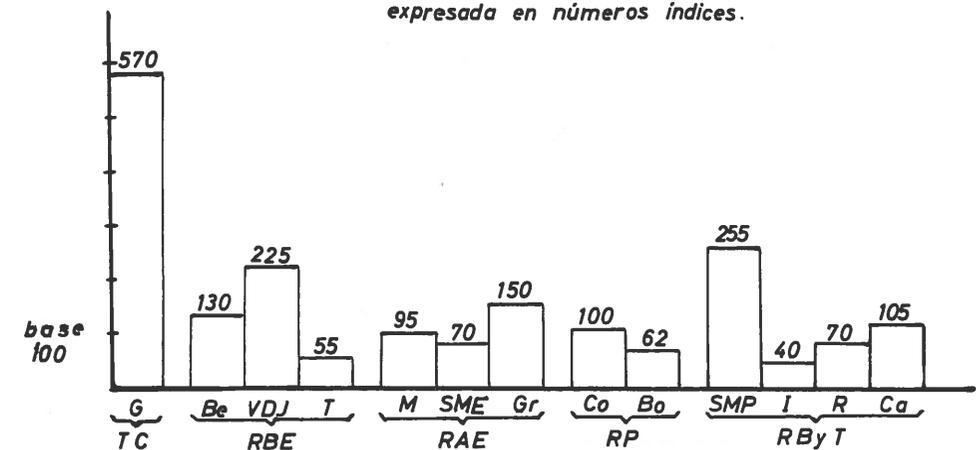
puede estar influido por unas mejores condiciones de higiene en los establos de esta zona o incluso porque la situación estrictamente fluvial favorezca las condiciones de los pastos.

A este respecto no hemos encontrado ningún dato en la bibliografía que confirme nuestras observaciones en relación con una mayor presencia de levaduras en terrenos de menor altitud. Sería de gran interés estudiar con detalle las influencias ecológicas en la distribución de las levaduras.

4.2.2. Magnitud anual del recuento de colonias.

La media anual de colonias para las distintas áreas y zonas, expresada en números índices y tomando como base la zona de Condado, situada en el área de la Ribera del Porma, cuya media anual fue igual a 100 colonias por ml. de muestra, está reflejada en la gráfica n.º 3, en la que no puede observarse una gran variación,

Gráf. N.º 3.- Magnitud anual de colonias/zona, expresada en números índices.



si se exceptúa el área de Tierra de Campos (zona de Gordoncillo), donde la magnitud fue bastante más importante que en el resto de las zonas.

Gordoncillo está situado en terrenos de secano, lo cual podría ser una explicación de la mayor abundancia no sólo de la magnitud del número de colonias, sino también de la continuidad de los aislamientos positivos.

4.2.3. Variación estacional del número de colonias.

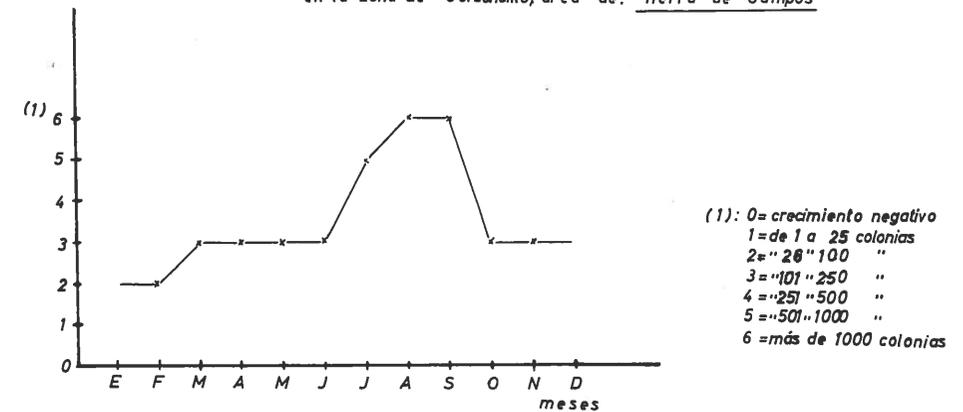
En las gráficas n.º 4, 5, 6, 7 y 8, se expresa la variación estacional de las distintas áreas estudiadas, así como la correspondiente a las zonas encuadradas dentro de ellas. Los valores del eje de ordenadas corresponden al número de colonias por ml. de muestra, representadas por los siguientes índices convencionales:

- 0 = creciendo negativo
- 1 = de 1 a 25 colonias
- 2 = de 26 « 100 colonias
- 3 = de 101 « 250 colonias
- 4 = de 251 « 500 colonias
- 5 = de 501 « 1.000 colonias
- 6 = más de 1.000 colonias, o colonias confluentes.

Existe una gran irregularidad en todas las curvas, aunque, en general, puede apreciarse una elevación importante del número de colonias durante el verano, especialmente en el mes de agosto. De una manera más clara puede observarse esta elevación estival en la gráfica n.º 9, representativa de la variación media estacional, en la que, a su vez, existen otras dos elevaciones de menor importancia en los meses de abril y octubre. En esta última gráfica los valores medios máximos oscilan entre 100 y 500 colonias por ml. de muestra y los mínimos de 25 a 100.

Haciendo un estudio sobre los hongos presentes en el aire, hemos observado en colaboración con ALLER y MARTÍNEZ⁵, que el número de levaduras experimentó un aumento en los meses de verano, similarmente a lo que hemos podido comprobar con las levaduras presentes en la leche, confirmándonos en la idea de que gran número de ellas pueden proceder de contaminación aérea, y que en los períodos secos y cálidos existe un mayor número de levaduras.

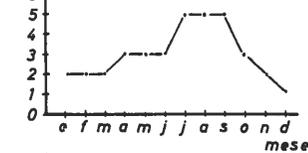
Gráf. N.º 4.- Variación estacional del número de colonias en la zona de Gordoncillo, área de: Tierra de Campos



5.1. Benavente



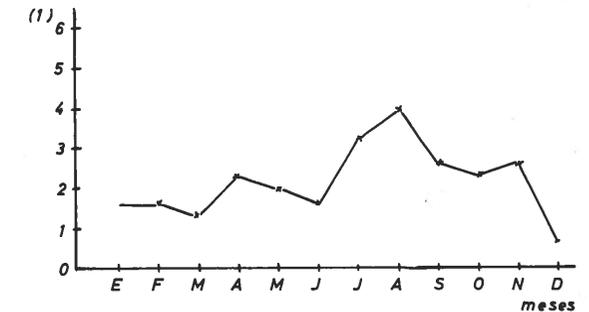
5.2. V. de D. Juan



5.3. Total

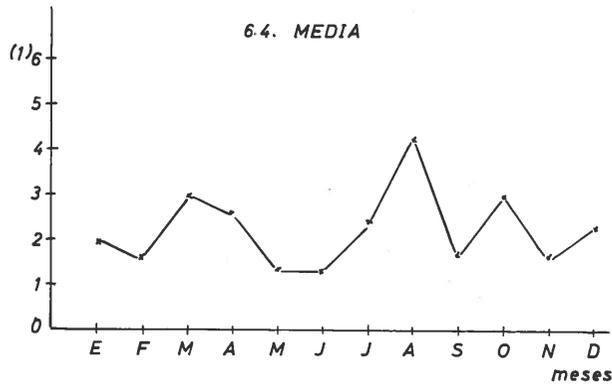
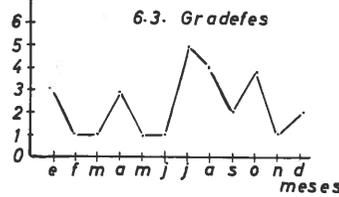
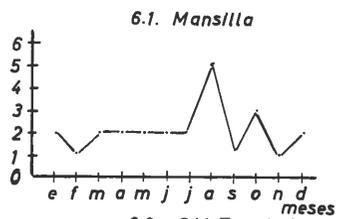


5.4. MEDIA

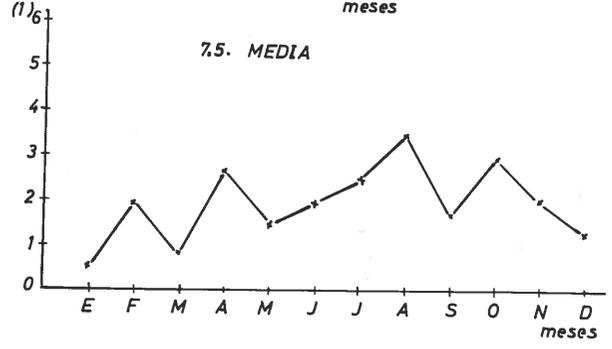
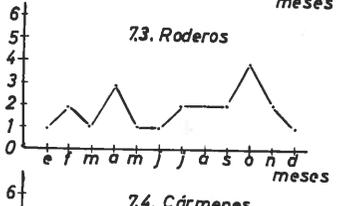
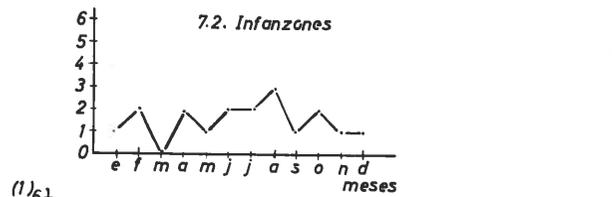


Gráf. N.º 5.- Variación estacional del número de colonias en el área de la: Ribera baja del Esla

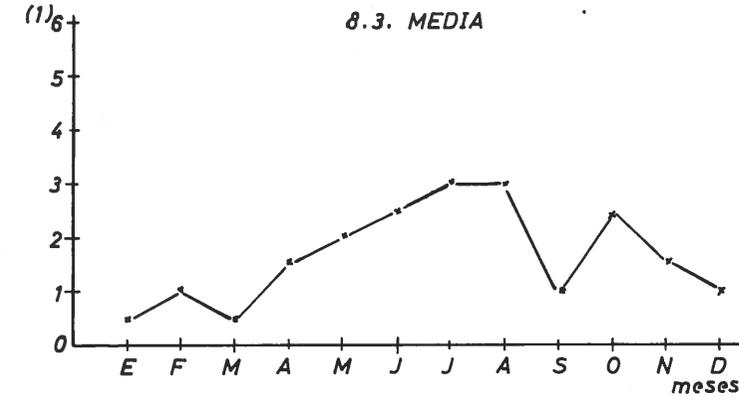
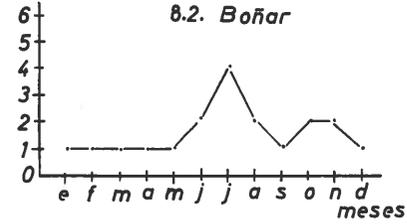
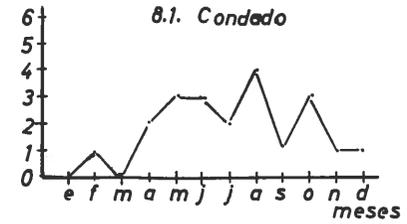
(1): Idem gráf. n.º 4



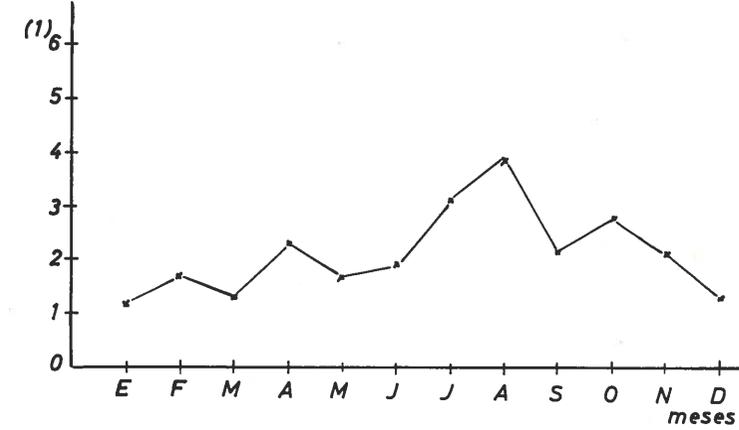
Gráf. N° 6.- Variación estacional del número de en el área de la: Ribera alta del Esla
(1): Idem gráf. n° 4.



Gráf. N° 7.- Variación estacional del número de colonias en el área de las: Riberas del Bernesga y Torio
(1): Idem gráf. n° 4.



Gráf. N° 8.- Variación estacional del número de colonias en el área de la: Ribera del Porma
(1) Idem gráf. n° 4.



Gráf. N° 9.- Variación media estacional
(1): Idem gráf. n° 4.

4.3. Géneros y especies aisladas.

A partir de los aislamientos de levaduras se seleccionaron 278 cepas; no fue posible conseguir un mayor número de ellas, bien por el escaso número y tamaño de las colonias, que sólo suministraba material para su identificación de grupo, o bien, debido al crecimiento de hongos filamentosos que imposibilitaba la resiembra.

Todas las cepas pudieron incluirse dentro de los cinco géneros siguientes: *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Pichia*. Los tres primeros pertenecientes a la familia Cryptococcaceae, orden Deuteromycetales u Hongos Imperfectos, y los dos últimos a la familia Saccharomycetaceae, orden Endomycetales. La distinta frecuencia de los mismos se observa en el cuadro n.º 4, siendo el género *Candida* el aislado con mayor frecuencia (90,3 %), mientras que los géneros *Torulopsis* y *Saccharomyces* sólo lo fueron en dos ocasiones cada uno de ellos (0,7 %).

CUADRO N.º 4

Frecuencia de aislamiento de cada uno de los géneros

Géneros	N.º de cepas	%
<i>Candida</i>	251	90,3
<i>Rhodotorula</i>	11	4
<i>Torulopsis</i>	2	0,7
<i>Saccharomyces</i>	2	0,7
<i>Pichia</i>	12	4,7

Dentro de estos géneros, los que pertenecen al orden Deuteromycetales, tienen mayor importancia, desde el punto de vista de su aislamiento a partir de leche, ya que la mayor parte de las levaduras facultativamente patógenas para el hombre y/o los animales, pertenecen a este orden y casi todas ellas están incluidas en la familia Cryptococcaceae.

Distintas especies pertenecientes a los géneros *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Pichia* aisladas por nosotros, lo han sido también por diferentes autores a partir de leche normal.^{11,16,27,48,53} Otros géneros identificados por diversos autores tales como *Trichosporom*,^{11,16,53} *Cryptococcus*, *Hansenula* y *Debaryomyces*¹⁶ no han sido identificados por nosotros.

DI MENNA¹⁶ observó una mayor incidencia de las especies del género *Candida* (290 de un total de 420 aisladas). HOFFMANN y col.,²⁷ sobre 200 muestras estudiadas, aislaron solamente 7 cepas, que identificaron dentro de dicho género, mientras que otros autores obtuvieron cifras similares para los géneros *Candida*, *Rhodotorula* y *Trichosporom*.^{48,53} Estos datos a pesar de no coincidir absolutamente con los nuestros, demuestran, no obstante una cierta predominancia de las especies del género *Candida*.

En el cuadro n.º 5 figuran los distintos géneros a los que pertenecen las cepas aisladas por otros autores y por nosotros, así como la frecuencia de las mismas. Puede observarse que, en ambos casos, se han aislado *Candida* spp., con mayor frecuencia, apreciándose diferencias importantes en los respectivos porcentajes de aislamiento. En relación con la distinta frecuencia del género *Rhodotorula*, BISPING¹¹ señaló ya, que el número elevado de la especie *Rh. mucilaginoso* (*Rh. rubra*) aislada por él, se debía a contaminaciones procedentes de los tapones de corcho no esterilizados, con que se tapaban las muestras.

CUADRO N.º 5

Frecuencia de aislamiento de distintos géneros de levaduras en leche

Géneros	Cepas identificadas por otros autores		Cepas identificadas por nosotros	
	N.º	%	N.º	%
<i>Candida</i>	337	53,7	251	90,3
<i>Rhodotorula</i>	129	20,8	11	4
<i>Cryptococcus</i>	50	8	—	—
<i>Torulopsis</i>	35	5,7	2	0,7
<i>Pichia</i>	28	3,8	12	4,7
<i>Saccharomyces</i>	20	3,3	2	0,7
<i>Trichosporom</i>	16	2,8	—	—
<i>Hansenula</i>	1	0,2	—	—
<i>Debaryomyces</i>	4	0,8	—	—
no identificadas	9	1,5	—	—
TOTAL	629	100	278	100

Por lo que se refiere al género *Cryptococcus*, aislado por DI MENNA¹⁶, tercero en el orden de frecuencia, señalamos que no ha sido aislado por nosotros. Dentro de este género se encuentra incluida *Cr. neoformans*, levadura que ha sido descrita en numerosas ocasiones como productora de mamitis en ganado vacuno.^{2,22,47} DI MENNA¹⁶ no consiguió aislar *Cr. neoformans* a partir de leche normal, en Nueva Zelanda, aunque sí otras tres especies de dicho género. Esta autora parece ser la única que ha conseguido aislar representantes del género *Cryptococcus* en leche no mamítica. Tampoco *Trichosporom* spp. aisladas en varios países por otros autores^{11,16,48,53} lo han sido por nosotros. Además de estos dos géneros (*Cryptococcus* y *Trichosporom*), tampoco hemos aislado representantes del *Debaryomyces* y *Hansenula*, aunque estos dos últimos han sido identificados solamente en cuatro y una ocasiones respectivamente.

Se identificaron 24 especies:

<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. lambica</i>
<i>C. albicans</i>	<i>C. valida</i>
<i>C. humicola</i>	<i>C. intermedia</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. mogii</i>
<i>C. pseudo tropicalis</i>	<i>C. lipolytica</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Torulopsis candida</i>
<i>C. tenuis</i>	<i>T. glabrata</i>
<i>C. rugosa</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>C. stellatoidea</i>	<i>Pichia fermentans</i>
<i>C. clausenii</i>	<i>P. farinosa</i>
<i>C. conglobata</i>	<i>P. membranaefaciens</i>

En el cuadro n.º 6 se especifica la frecuencia con que ha sido aislada cada una de ellas. Los valores más significativos corresponden a especies del género *Candida*, principalmente *C. tropicalis* (18,7 %) *C. albicans* y *Candida humicola* (11,8 %) y *C. parapsilosis* (10,4 %).

CUADRO N.º 6

Frecuencia de aislamiento de cada una de las especies

Género	Especie	N.º de cepas	%
<i>Candida</i>	<i>tropicalis</i>	52	18,7
	<i>albicans</i>	33	11,8
	<i>humicola</i>	33	11,8
	<i>parapsilosis</i>	29	10,4
	<i>pseudotropicalis</i>	25	8,9
	<i>krusei</i>	22	7,9
	<i>guilliermondii</i>	5	1,7
	<i>clausenii</i>	2	0,7
	<i>stellatoidea</i>	1	0,3
	<i>lambica</i>	13	4,6
	<i>valida</i>	12	4,3
	<i>rugosa</i>	7	2,5
	<i>conglobata</i>	6	2,1
	<i>mogii</i>	5	1,7
	<i>intermedia</i>	4	1,4
	<i>lipolytica</i>	1	0,3
	<i>Rhodotorula</i>	<i>tenuis</i>	1
<i>rubra</i>		11	3,9
<i>Torulopsis</i>	<i>candida</i>	1	0,3
	<i>glabrata</i>	1	0,3
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	2	0,7
	<i>membranaefaciens</i>	6	2,1
<i>Pichia</i>	<i>fermentans</i>	4	1,4
	<i>farinosa</i>	2	0,7
TOTAL		278	100

En el cuadro n.º 7 se muestra la relación comparativa entre las especies aisladas por nosotros y por otros autores.^{11,16,48,53} Se observa en el mismo, que de las cepas aisladas por éstos, se llegó a la identificación específica de 598 (39 especies distintas), a la genérica de 22 (dentro de los géneros *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula* y *Trichosporom*) y nueve no fueron identificadas. Se señalan 39 especies, a pesar de que figuran 40, puesto que en la reciente revisión taxonómica realizada por LODDER³¹, se ha comprobado que *Rh. mucilaginoso* y *Rh. rubra* no pueden ser consideradas como especies distintas, criterio que nosotros hemos seguido en nuestro trabajo, considerando como *Rh. rubra* a las 11 cepas que ofrecieron los caracteres típicos de la especie.

De las cepas aisladas por nosotros, 206 pertenecían a 13 especies, dentro de las que figuran en dicho cuadro, mientras que las 72 restantes correspondían a especies no referidas por otros autores en leche normal. Se reseña el hecho de que *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. humicola* hayan sido aisladas por nosotros en muchas más ocasiones que por los autores citados anteriormente (cuadro n.º 7). FAMEREE y col.¹⁹ destacan que *C. tropicalis* no ha sido nunca encontrada en leches sanas y sí en leches mamáticas. A este respecto, argumentamos que el haberse aislado por nosotros en leche de abasto, pudiera depender de haber existido, en la muestra de mezcla, leche procedente de algún cuarterón mamático.

Las distintas especies aisladas por nosotros, lo fueron en cultivos puros y mixtos, llegándose en algunas ocasiones a obtener hasta cuatro especies diferentes, a partir de una sola muestra. No poseemos datos concretos de la incidencia de crecimientos mixtos, habida cuenta de que el criterio de selección de las cepas para el aislamiento se basaba en la morfología de las colonias, que ofrece muy escasas variaciones dentro de las levaduras. Así, en algunos casos en que se seleccionaron colonias morfológicamente distintas, cuando se verificó la oportuna tipificación, nos encontramos con que correspondían a una sola especie. Sin embargo, en el caso de *Rhodotorula rubra*, debido al color rojo-asalmonado de las colonias, pudo comprobarse que no creció en ninguna ocasión en cultivo puro y que se aisló siempre en unión de *Candida* spp.

La presencia de cultivos mixtos era de esperar, teniendo en cuenta que las muestras estaban integradas por leche perteneciente no sólo a distintos cuarterones de una misma vaca, sino también de distintos animales, puesto que la recogida se realizaba por zonas y pueblos. Desde el planteamiento de nuestro trabajo, intentábamos estudiar las levaduras que pudieran presentarse en los animales de la región, de una manera general.

El hecho de que otros autores identificaran diversas levaduras, en los distintos cuarterones de un animal^{19, 53} e incluso en un solo cuarterón,^{7, 19, 53} confirma el que indudablemente nosotros debíamos esperar encontrar diversos tipos de

levaduras en la misma muestra. La mayoría de los autores han comprobado estos crecimientos mixtos de levaduras, acompañándose, en muchos casos, también de bacterias típicamente productoras de mamitis, como pudiera ser *Streptococcus agalactiae*, etc.^{19, 20, 40, 50, 53, 55}

CUADRO N.º 7

Frecuencia de aislamiento de las diversas especies de levaduras, en leche

Especie	Cepas aisladas	Autor y año	Aisladas por nosotros
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14	DI MENNA ¹⁶ (1956)	2
<i>Sacch. marxianus</i>	5	» »	—
<i>Sacch. veronae</i>	1	» »	—
<i>Pichia fermentans</i>	22	» »	4
<i>P. membranaefaciens</i>	6	» »	6
<i>Hansenula anomala</i>	1	» »	—
<i>Debaryomyces subglobosus</i>	4	» »	—
<i>Candida albicans</i>	1	REFAI ⁴⁸ (1963)	—
» »	5	HOFFMANN ²⁷ (1968)	—
» »	3	SWINNE-DESGAIN ⁵³ (1970)	33
<i>C. curvata</i>	27	DI MENNA ¹⁶ (1956)	—
» »	2	SWINNE-DESGAIN ⁵³ (1970)	—
<i>C. brumptii</i>	15	REFAI ⁴⁸ (1963)	—
» »	1	SWINNE-DESGAIN ⁵³ (1970)	—
<i>C. guilliermondii</i>	3	REFAI ⁴⁸ (1963)	5
<i>C. humicola</i>	2	DI MENNA ¹⁶ (1956)	33
<i>C. krusei</i>	115	» »	—
» »	2	BISPING ¹¹ (1961)	22
<i>C. lipolytica</i>	2	SWINNE-DESGAIN ⁵³ (1970)	1
<i>C. macedonensis</i>	20	DI MENNA ¹⁶ (1956)	—
<i>C. mycoderma</i>	60	DI MENNA ¹⁶ (1956)	—
<i>C. parapsilosis</i>	32	» »	—
» »	1	BISPING ¹¹ (1961)	—
<i>Candida parapsilosis</i>	2	HOFFMANN ²⁷ (1968)	—
» »	1	SWINNE-DESGAIN ⁵³ (1970)	29
<i>C. reukafii</i>	3	REFAI ⁴⁸ (1963)	—
<i>C. robusta</i>	1	DI MENNA ¹⁶ (1956)	—
<i>C. rugosa</i>	14	» »	—
» »	2	SWINNE-DESGAIN ⁵³ (1970)	7
<i>C. tropicalis</i>	1	DI MENNA ¹⁶ (1956)	52
<i>C. utilis</i>	1	» »	—
<i>C. zeylanoides</i>	17	» »	—
<i>Candida</i> sp.	1	BISPING ¹¹ (1961)	—
<i>Candida</i> spp.	3	REFAI ⁴⁸ (1963)	—
<i>Cryptococcus albidus</i>	4	DI MENNA ¹⁶ (1956)	—
<i>Cr. diffluens</i>	22	» »	—
<i>Cr. laurentii</i>	22	» »	—
<i>Cr. luteolus</i>	2	» »	—
<i>Torulopsis aerea</i>	1	» »	—
» »	1	REFAI ⁴⁸ (1963)	—
<i>T. candida</i>	2	» »	—
» »	2	SWINNE-DESGAIN ⁵³ (1970)	1
<i>T. famata</i>	3	DI MENNA ¹⁶ (1956)	—
» »	1	BISPING ¹¹ (1961)	—

Especie	Cepas aisladas	Autor y año	Aisladas por nosotros
<i>T. fanata</i>	10	REFAI ⁴⁸ (1963)	—
» »	4	SWINNE-DESGAIN ⁵³ (1970)	—
<i>T. molischiana</i>	1	REFAI ⁴⁸ (1963)	—
<i>Torulopsis</i> spp.	9	» »	—
<i>Torulopsis</i> sp.	1	SWINNE-DESGAIN ⁵³ (1970)	—
<i>Rhodotorula aurantica</i>	2	» » »	—
<i>Rh. glutinis</i>	4	DI MENNA ¹⁶ (1956)	—
<i>Rh. minuta</i>	1	» »	—
<i>Rh. mucilaginoso (Rh. rubra)</i>	11	» »	—
» »	71	BISPING ¹¹ (1961)	—
» »	26	REFAI ⁴⁸ (1963)	—
» »	3	SWINNE-DESGAIN ⁵³ (1970)	—
<i>Rh. rubra</i>	1	REFAI ⁴⁸ (1963)	—
» »	3	SWINNE-DESGAIN ⁵³ (1970)	11
<i>Rhodotorula</i> spp.	7	REFAI ⁴⁸ (1963)	—
<i>Trichosporom capitatum</i>	1	DI MENNA ¹⁶ (1956)	—
» »	4	SWINNE-DESGAIN ⁵³ (1970)	—
<i>Tr. cutaneum</i>	1	BISPING ¹¹ (1961)	—
» »	2	REFAI ⁴⁸ (1963)	—
» »	3	SWINNE-DESGAIN ⁵³	—
<i>Tr. pullulans</i>	2	DI MENNA ¹⁶ (1956)	—
<i>Tr. sericerum</i>	2	SWINNE-DESGAIN ⁵³ (1970)	—
<i>Trichosporom</i> sp.	1	REFAI ⁴⁸ (1963)	—
no identificadas	4	DI MENNA ¹⁶ (1956)	—
» »	5	REFAI ⁴⁸ (1963)	—

Nota: Las especies que figuran en este cuadro son aquellas que se han aislado en leche normal, no haciéndose mención de las aisladas a partir de leche mamítica.

4.3.1. Incidencia de levaduras facultativamente patógenas.

De las 24 especies aisladas por nosotros, se ha dado la consideración de facultativamente patógenas a las siguientes:

- Género *Candida*:
- Candida tropicalis*
 - C. albicans*
 - C. pseudotropicalis*
 - C. parapsilosis*
 - C. krusei*
 - C. guilliermondii*
 - C. stellatoidea*
 - C. clausenii*
 - C. humicola*

Género *Torulopsis*:
Torulopsis glabrata
T. candida
 Género *Rhodotorula*:
Rhodotorula rubra.

Para comprobar la distinta frecuencia de las especies aisladas, en orden a su capacidad patogénica, se establecieron los cuatro grupos siguientes: especies facultativamente patógenas pertenecientes al género *Candida*; especies facultativamente patógenas no pertenecientes al género *Candida* (géneros *Torulopsis* y *Rhodotorula*); especies del género *Candida* no patógenas; y por último, especies no patógenas no pertenecientes al género *Candida* (géneros *Saccharomyces* y *Pichia*). Los valores correspondientes pueden observarse en el cuadro n.º 8. En dicho cuadro se comprueba que las especies facultativamente patógenas pertenecientes al género *Candida*, tuvieron una frecuencia superior a las no patógenas del mismo género (76,6 % y 17,7 % respectivamente) y que las especies facultativamente patógenas no pertenecientes al género *Candida*, junto con las no patógenas, una frecuencia similar y mucho menos importante (4,6 y 5 %).

CUADRO N.º 8
 Frecuencia de cepas facultativamente patógenas y no patógenas

Grupos	N.º cepas	%
Género <i>Candida</i> facultativamente patógenas	202	72,6
Género <i>Candida</i> no patógenas	49	17,7
Géneros <i>Torulopsis</i> y <i>Rhodotorula</i> facul. patógenas	13	4,6
Géneros <i>Saccharomyces</i> y <i>Pichia</i> , ascospógenas no patógenas	14	5

La distribución de las cepas aisladas en facultativamente patógenas y no patógenas se ha realizado teniendo en cuenta el haber sido descritas en casos de mamitis, producción de mamitis experimental y el poder patógeno para los animales de experimentación.

El porcentaje de mamitis levaduriformes no parece ser excesivamente elevado. Según LONFTSGARD y LINQVIST³³ solamente el 1 % del total de mamitis es producido por levaduras; AINSWORTH y AUSTWICK³ dan valores del 2-3 %; MITROIU y TOMA⁴⁰ encontraron 88 muestras positivas a levaduras, en un total de 623 procedentes de mamitis (14,1 %). Por otra parte, MEHNERT y col.³⁸ hallaron un 3,1 % de muestras positivas en animales que no padecían alteraciones de la secreción y un 26,4 % en aquellos que las padecían.

Lo más destacable es el hecho de que en la mama, y por consiguiente, en la leche normal, puede aparecer un gran número de especies de levaduras.¹² Precisamente por encontrarse un número tan elevado de ellas, es por lo que creemos que existe cierto confucionismo en relación con las que pueden considerarse estrictamente patógenas, facultativamente patógenas, o simplemente saprofitas. Muchos autores consideran que el poder patógeno de las levaduras no dependería tanto de la propia capacidad patogénica intrínseca de las mismas, como de los factores extrínsecos por los que pudieran verse influidas, tales como los tratamientos antibióticos en mamitis bacterianas,^{10, 18, 38, 49, 50} lesiones en el pezón,³³ utilización de preparados locales de antibióticos contaminados^{20, 33} o la alimentación con residuos de cervecera.³³

Estos factores antedichos hacen difícil establecer con claridad cuales son las especies patógenas para la mama, a excepción de *Cryptococcus neoformans*, estrictamente patógena para el hombre y los animales, que ha sido descrita como la de mayor importancia en la producción de mamitis levaduriformes.^{3, 22, 26, 47, 49} Esta especie, no ha sido aislada por nosotros a partir de leche normal, como ya se ha dicho anteriormente.

Los géneros que presentan mayor interés desde el punto de vista patogénico son *Candida*⁵³ y *Cryptococcus*^{20, 33} aunque también se han aislado levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*,^{3, 55} *Pichia*,^{3, 8, 50} *Trichosporom*,^{3, 23, 48, 55} y *Rhodotorula*⁴³ en muestras procedentes de mamitis. De estos géneros citados, *Cryptococcus* y *Trichosporom* no han sido identificados por nosotros en ninguna ocasión y dentro de los restantes se encuentran las especies que hemos considerado como facultativamente patógenas y no patógenas.

De las doce especies consideradas como facultativamente patógenas por nosotros, nueve corresponden al género *Candida*, dentro del que se encuentran el mayor número de especies consideradas patógenas o, por lo menos, facultativamente patógenas por otros autores, de las cuales han sido aisladas en mamitis las siguientes: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. pseudotropicalis* y *C. humicola* (AINSWORTH y AUSTWICK³, ANGELACHEV,⁷ AUSTWICK y col.,⁸ BISPING,¹² FAMEREE y col.,¹⁹ GUILHON y col.,²³ HOFFMANN y col.,²⁷ MITROIU y TOMA,⁴⁰ NOWAK,⁴³ REFAI,⁴⁸ RENK,⁴⁹ SWINNE-DESCAIN,⁵³ TOLKO⁵⁴).

Precisamente por ser el género *Candida* el que incluye especies observadas en más ocasiones como productoras de mamitis, junto con las especies del género *Cryptococcus* y de éste principalmente *Cr. neoformans*, han sido estudiadas por diversos autores en mamitis experimental.⁴⁶ En este tipo de experimentos *C. tropicalis* se manifestó, según REDAELLI,⁴⁷ con un alto poder patógeno, preferentemente cuando al mismo tiempo se inoculaban antibióticos. BISPING¹² reprodujo lesiones de mamitis inoculando *C. albicans*, en un caso de curación espontánea, mientras que en otros era persistente, sobre todo si se administraban antibióticos; esto fue observado

con esta misma especie por otros autores.^{41,43} Otras especies de las que figuran en nuestro trabajo como facultativamente patógenas, pertenecientes al género *Candida*, y que han sido comprobadas como patógenas en mamitis experimental son: *C. krusei*^{41,54}, *C. pseudotropicalis* y *C. parapsilosis*.⁵⁴

Las nueve especies que estamos considerando, con excepción de *C. humicola*, han sido inoculadas a animales de experimentación, por diversos autores, con el fin de probar su poder patógeno. El estudio comparativo de los resultados obtenidos por ellos en este sentido, nos puede servir para considerar la mayor o menor patogeneidad de estas especies.

C. albicans es patógena para el ratón, produciendo lesiones, principalmente renales,^{28, 34} y, sobre todo, cuando se inocula por vía intravenosa;^{1,21,28,34,37} esta especie también es patógena para el conejo.²⁴

HURLEY y WINNER³⁰ comprobaron que *C. tropicalis* era patógena para el ratón por vía intravenosa, si bien HASENCLEVER y MITCHELL²⁵ demostraron que, aunque muchas cepas de *C. tropicalis* son patógenas para el ratón, comparando su patogeneidad de grupo, resulta ser mucho menor que la *C. albicans*, a la vez que lo es muy poco para el conejo.

La mayoría de los autores coincide en afirmar que *C. albicans* es una especie altamente patógena para el ratón.^{7,28,34,35,42,45} Otras especies con efecto patógeno para animales de experimentación, principalmente el ratón, son *C. krusei*,³⁷ *C. stellatoidea*,^{29, 37} *C. parapsilosis*^{21, 35} y, ocasionalmente, *C. guilliermondii*.^{21,35,37} Como ya se ha dicho anteriormente, estas especies del género *Candida* han sido incluidas por nosotros entre las facultativamente patógenas.

Por lo que se refiere a las otras tres especies incluidas dentro de este grupo, tanto *Torulopsis glabrata*^{40,53} como *T. candida*,¹² se han aislado a partir de leche mamítica, y hasta hace pocos años estas dos especies eran las únicas consideradas como de algún interés patógeno, dentro de este género, pero recientemente YARROW^{60,61} identificó como una nueva especie del género *Torulopsis* una levadura aislada en una mamitis en Africa del Sur (aunque posteriormente la incluyó en el género *Selenotila*⁶²). Mientras que *Rhodotorula rubra* (*Rh. mucilaginosa*) la cual ha sido comprobada en mamitis crónica,^{8,43} no ha producido lesiones ni otro tipo de alteración en infección intramamaria experimental¹² y, en algún caso, sólo se observó eliminación de levaduras en la leche. Nosotros hemos incluido esta especie dentro de las facultativamente patógenas por haberla aislado siempre en cultivo mixto con representantes del género *Candida*, facultativamente patógenas, por lo que consideramos que, por sinergismo, podría verse aumentada su patogeneidad.

4.3.2. Incidencia de los grupos facultativamente patógenos y no patógenos en relación con las zonas.

En el cuadro n.º 9 pueden observarse los porcentajes de cada uno de los grupos de levaduras del cuadro n.º 8, desglosado en relación con su frecuencia de aislamiento en cada una de las zonas estudiadas. Para las especies facultativamente patógenas pertenecientes al género *Candida*, los valores máximos corresponden a Gordoncillo (25,2 %) y Santa María del Páramo (12,3 %) y para el resto de las facultativamente patógenas a Toral y Mansilla (23 %, cada una de ellas). Se comprueba que *Candida* spp., facultativamente patógenas y no patógenas, se aislaron en todas las zonas, mientras que *Torulopsis* spp. y *Rhodotorula* sp. por un lado, y *Saccharomyces* sp. y *Pichia* spp. por otro, lo fueron únicamente en ocho y siete, respectivamente, de las trece zonas estudiadas. En consecuencia, las especies facultativamente patógenas del género *Candida* fueron más frecuentes que las de los géneros *Torulopsis* y *Rhodotorula*.

Todas estas especies se han aislado con mayor frecuencia en aquellas zonas en que los aislamientos positivos, así como la magnitud del crecimiento, fueron mayores, siendo destacable el hecho de que en Gordoncillo, zona que se significó a lo largo de todo nuestro trabajo en este sentido, se presentara un porcentaje de cepas facultativamente patógenas mucho más elevado que en el resto de las zonas estudiadas.

El menor número de cepas facultativamente patógenas no pertenecientes al género *Candida*, no nos permite dar tanto valor a estos aislamientos y debemos considerarlos como meros hallazgos.

Este mismo tipo de consideración tenemos que hacer con respecto a las especies no patógenas, principalmente a las no pertenecientes al género *Candida*, que, por otra parte, también han sido aisladas en contadas ocasiones por otros autores.^{11,16,48,53} Por lo que se refiere a estas últimas especies, *Pichia farinosa*, especie que ha sido aislada por algunos autores en mamitis,^{3, 11} ha sido incluida por nosotros dentro de las especies no patógenas, debido a no haberse realizado pruebas de patogenicidad experimental y haberse descrito en contadas ocasiones.

4.3.3. Incidencia de especies facultativamente patógenas.

En los cuadros n.º 10 y 11 se observa la distribución de cada una de las especies facultativamente patógenas, en relación con las zonas estudiadas; en el primero, las pertenecientes al género *Candida* y en el segundo las de los géneros *Rhodotorula* y *Torulopsis*. Los valores más destacables son los de *C. albicans* en la zona de Gordoncillo (13,3 % del total de facultativamente patógenas del género *Candida*); *C. tropicalis* en Gordoncillo y Valencia de Don Juan (8,9 y 4,9 % respectivamente); *C. humicola* en Santa María del Páramo (8,9 %) y *C. pseudotropicalis* en Infanzones (7,8 %). Para las facultativamente patógenas no pertene-

CUADRO N.º 9

Frecuencia de cada uno de los grupos facultativamente patógenos y no patógenos en relación con las zonas

	Género <i>Candida</i> facultativamente patógenas		Género <i>Candida</i> no patógenas		Géneros <i>Torulopsis</i> y <i>Rhodotorulita</i> fac. patógenas		Géneros <i>Sclerotomyces</i> y <i>Pichia</i> asporógenas no patógenas		Total	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Gordoncillo	51	25,4	6	12,2	—	—	1	7,1	58	20,8
Benavente	15	7,4	6	12,2	2	15,3	—	—	23	8,2
Vcia. de Don Juan	18	8,9	5	10,2	—	—	—	—	23	8,2
Total	7	3,4	4	8,1	3	23	1	7,1	15	5,3
Mansilla	10	4,9	2	4	3	23	4	28,5	19	6,8
San Miguel de Esc.	10	4,9	2	4	1	7,6	—	—	13	4,6
Gradefes	9	4,4	5	10,2	1	7,6	1	7,1	16	5,7
Sta. María del Páramo	25	12,3	2	4	1	7,6	4	28,5	28	10
Infanzones	22	10,8	5	10,2	1	7,6	—	—	32	11,5
Roderos	11	5,4	2	4	—	—	—	—	13	4,6
Cármenes	7	3,4	3	6,1	—	—	1	7,1	11	3,9
Condado	9	4,4	1	2	1	7,6	—	—	11	3,9
Boñar	8	4	6	12,2	—	—	2	14,2	16	5,7
TOTAL	202	100	49	100	13	100	14	100	278	100

CUADRO N.º 10

Frecuencia de cada una de las especies facultativamente patógenas pertenecientes al género *Candida* en cada una de las zonas estudiadas

Zonas	<i>C. albic.</i>		<i>C. tropi.</i>		<i>C. pseudo.</i>		<i>C. parap.</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. humic.</i>		<i>C. guill.</i>		<i>C. stell.</i>		<i>C. clau.</i>	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Gordoncillo	26	13,3	18	8,9	1	0,4	—	—	4	1,9	1	0,4	—	—	—	—	1	0,4
Benavente	1	0,4	7	3,4	—	—	4	1,9	3	1,4	—	—	—	—	—	—	—	—
Vcia. de Don Juan.	—	—	10	4,9	—	—	2	0,9	1	0,4	4	1,9	—	—	—	—	1	0,4
Total	1	0,4	2	0,9	1	0,4	1	0,4	1	0,4	1	0,4	—	—	—	—	—	—
Mansilla	—	—	3	1,4	—	—	—	—	2	0,9	—	—	—	—	—	—	—	—
San Miguel Esc.	1	0,4	2	0,9	—	—	3	1,4	1	0,4	3	1,4	—	—	—	—	—	—
Gradefes	1	0,4	2	0,9	1	0,4	3	1,4	1	0,4	2	0,9	—	—	—	—	—	—
Sta. María Páramo	—	—	3	1,4	—	—	3	1,4	1	0,4	18	8,9	—	—	—	—	—	—
Infanzones	—	—	2	0,9	16	7,8	1	0,4	2	0,9	—	—	—	—	—	—	—	—
Roderos	—	—	2	0,9	—	—	6	2,9	2	0,9	—	—	—	—	—	—	—	—
Cármenes	2	0,9	1	0,4	—	—	—	—	2	0,9	—	—	—	—	—	—	—	—
Condado	—	—	—	—	5	2,4	3	1,4	2	0,9	1	0,4	—	—	—	—	—	—
Boñar	1	0,4	—	—	—	—	3	1,4	—	—	1	0,4	—	—	—	—	—	—

cientes al género *Candida* (cuadro n.º 11), la máxima incidencia corresponde a *Rh. rubra* en Toral y Mansilla (23 %).

CUADRO N.º 11

Frecuencia de especies facultativamente patógenas no pertenecientes al género *Candida* (géneros *Torulopsis* y *Rhodotorula*), en relación con las zonas

Zonas	<i>Rh. rubra</i>		<i>T. glabrata</i>		<i>T. candida</i>	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Gordoncillo	—	—	—	—	—	—
Benavente	2	15,3	—	—	—	—
Vcia. de Don Juan	—	—	—	—	—	—
Toral	3	23	—	—	—	—
Mansilla	3	23	—	—	—	—
San Miguel de Esc.	1	7,6	—	—	—	—
Gradefes	—	—	1	7,6	—	—
Sta. María del Páramo	1	7,6	—	—	—	—
Infanzones	—	—	—	—	1	7,6
Roderos	—	—	—	—	—	—
Cármenes	—	—	—	—	—	—
Condado	1	7,6	—	—	—	—
Boñar	—	—	—	—	—	—

Merece especial atención el hecho de que *C. albicans* haya sido aislada por nosotros con gran frecuencia. VAN UDEN⁵⁶ consideró que el tracto digestivo era una posible fuente de levaduras relacionada con la producción de mamitis. Sin embargo, este mismo autor en colaboración con DO CARMO SOUSA⁵⁷, afirmaron que entre el gran número de levaduras aislado por ellos a partir de intestino de bovino, no se encontraban representantes de esta especie. PARLE⁴⁴ y SMITH⁵², encontraron *C. albicans* en intestino de diferentes mamíferos, pero nunca en bovinos. El hecho de que estos autores no encontraran esta especie, precisamente en bovinos, parece corroborar lo afirmado por VAN UDEN y DO CARMO SOUSA⁵⁷, en el sentido de que esta especie no es un habitante normal de intestino de tales animales.

Esto nos hace pensar que el origen de las cepas aisladas por nosotros no sería el propio animal, sino que podrían proceder del medio ambiente, puesto que, aunque se ha afirmado que es huésped de animales de sangre caliente, también se ha comprobado en la naturaleza, como afirmó MILLER,³⁹ que la aisló a partir de un roble, considerando que podía proceder de contaminaciones de animales.

Por lo que se refiere a *C. tropicalis*, que ha sido aislada en mayor número de ocasiones, puede proceder del propio animal⁵² o de otras fuentes, lo que explica que la hayamos comprobado en más ocasiones que *C. albicans*.

4.3.4. Incidencia de especies no patógenas en relación con las zonas.

El mismo tipo de frecuencia para las especies no patógenas del género *Candida* y las ascoporógenas (géneros *Saccharomyces* y *Pichia*), puede comprobarse en los cuadros n.º 12 y 13, respectivamente. Se observa que la distribución de especies por zonas, es mucho más heterogénea que en los grupos anteriores, destacando solamente los valores de *C. valida* en Vega de Infanzones (8,1 %) y *C. lambica* en Benavente (8,1 %)

La heterogeneidad de la presentación de cepas no patógenas, tanto pertenecientes al género *Candida* como a otros, pudiera deberse al menor número de cepas aisladas, si bien es destacable el que, para las pertenecientes al género *Candida*, las mayores frecuencias correspondan a zonas donde la incidencia de las facultativamente patógenas del género también ha sido relativamente alta.

4.4. Comparación de incidencia zonal de las principales especies facultativamente patógenas.

Como se ha visto anteriormente, las *Candida* spp. facultativamente patógenas se obtuvieron a partir de todas las zonas; de las especies incluidas en dicho grupo se ha aislado un mayor número de veces las siguientes: *C. tropicalis* (52); *C. albicans* (33); *C. humicola* (33), *C. parapsilosis* (29); *C. pseudotropicalis* (25); y *C. krusei* (22).

Las zonas en que se han aislado estas especies con mayor frecuencia figuran a continuación:

- Gordoncillo (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*)
- Benavente (*C. tropicalis* y *C. parapsilosis*).
- Valencia de Don Juan (*C. tropicalis*)
- Santa María del Páramo (*C. humicola*)
- Infanzones (*C. pseudotropicalis*).
- Roderos (*C. parapsilosis*).

Estas seis zonas se encuentran situadas en el sur de la provincia de León, a partir de la confluencia del río Bernesga con el Esla, correspondiendo a las mismas las menores altitudes de la provincia (encuadradas en el gráfico n.º 1 entre dos líneas paralelas). Dichas zonas se agrupan dentro de las áreas establecidas por nosotros de la siguiente forma:

- Roderos, Infanzones y Santa María del Páramo: Sur de la Ribera del Bernesga;
- Benavente y Valencia de Don Juan: Ribera baja del Esla;
- Gordoncillo: Tierra de Campos.

CUADRO N.º 12

Frecuencia de las especies no patógenas del género *Candida*, en relación con las zonas

Zonas	<i>C. rugo</i>		<i>C. tenuis</i>		<i>C. cong.</i>		<i>C. lamb.</i>		<i>C. vali</i>		<i>C. inte.</i>		<i>C. mogii</i>		<i>C. tipo.</i>	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Gordoncillo	—	—	—	—	1	2	4	8,1	—	—	—	—	1	2	—	—
Benavente	—	—	1	2	2	4	2	4	—	—	—	—	—	—	1	2
Vcia. de Don Juan.	1	2	—	—	—	—	2	4	1	2	—	—	1	2	—	—
Toral	—	—	—	—	—	—	3	7,1	—	—	1	2	—	—	—	—
Mansilla	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2	—	—	1	2	—	—
San Miguel Esc.	1	2	—	—	—	—	—	—	1	2	—	—	1	2	—	—
Gradefes	2	4	—	—	1	2	—	—	2	4	—	—	1	2	—	—
Sta. María del Páramo	—	—	—	—	—	—	—	—	4	8,1	—	—	—	—	—	—
Infanzones	—	—	—	—	—	—	—	—	2	4	—	—	—	—	—	—
Roderos	1	2	—	—	—	—	—	—	1	2	—	—	—	—	—	—
Cármenes	1	2	—	—	—	—	—	—	1	2	—	—	—	—	—	—
Condado	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Boñar	—	—	—	—	2	4	1	2	2	4	—	—	—	—	—	—

C. rugo. = *Candida rugosa*; *C. tenuis* = *C. tenuis*; *C. cong.* = *C. conglutinata*; *C. lamb.* = *C. lambica*; *C. vali* = *C. valida*; *C. inte.* = *C. intermedia*; *C. mogii* = *C. mogii*; *C. tipo.* = *C. lipolytica*.

CUADRO N.º 13

Frecuencia de especies no patógenas, no pertenecientes al género *Candida* (géneros *Saccharomyces* y *Pichia*)

Zonas	<i>Sacch. cerevisiae</i>		<i>P. fermentans</i>		<i>P. membranefaciens</i>		<i>P. farinosa</i>	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Gordoncillo	—	—	1	7,1	—	—	—	—
Benavente	—	—	—	—	—	—	—	—
Vcia. de Don Juan.	—	—	—	—	—	—	—	—
Toral	—	—	—	—	1	7,1	—	—
Mansilla	—	—	2	14,2	3	14,2	—	—
San Miguel de Esc.	—	—	—	—	—	—	—	—
Gradefes	—	—	—	—	1	7,1	—	—
Sta. María del Páramo	—	—	—	—	—	—	—	—
Infanzones	2	14,2	—	—	1	7,1	1	7,1
Roderos	—	—	—	—	—	—	—	—
Cármenes	—	—	1	7,1	—	—	—	—
Condado	—	—	—	—	—	—	—	—
Boñar	—	—	—	—	1	7,1	1	7,1

Se ha considerado conveniente establecer una comparación entre la incidencia de las seis especies consideradas más importantes, en las zonas del Sur de la provincia y en las del resto (zona Norte). Esto puede comprobarse en el cuadro n.º 14, donde resalta que las frecuencias de dichas especies son mucho más importantes en las zonas enclavadas en el sur de la provincia, especialmente en relación con *C. albicans* (81,8 %), *C. tropicalis* (80,7 %), *C. humicola* (69,6 %) y *C. pseudotropicalis* (68,9 %).

La frecuencia total de estas seis especies del género *Candida* en cada una de estas dos amplias zonas Norte y Sur de la provincia de León, viene expresada en el cuadro n.º 15, correspondiendo el 77,7 por 100 a la zona Sur, más seca, de menor altitud y clima más cálido, factores que muy bien pudieran estar en relación con la mayor presentación de levaduras en leche.

En apartados anteriores, hemos podido observar que, las especies a las cuales hacemos referencia, pueden ser altamente patógenas si las defensas del animal se ven disminuidas y si su acción se ve favorecida por los tratamientos antibióticos. Dentro de este grupo hemos incluido también a *C. humicola*, aunque no ha sido comprobada su patogeneidad en infección experimental, ni en animales de experimentación, pero que ha sido observada en numerosas ocasiones como productora de mamicis y se aísla con mucha frecuencia a partir de leche.

CUADRO N.º 14

Frecuencia por especies, de las principales facultativamente patógenas, en el Norte y Sur de la provincia

Zonas	<i>C. albicans</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. humicola</i>		<i>C. pseudotropicalis</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. krusei</i>	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Zona Sur												
Gordoncillo	26	78,7	18	34,6	1	3	1	4	—	—	4	18,1
Benavente	1	3	7	13,4	—	—	—	—	4	13,7	3	13,6
Vcia. de Don Juan	—	—	10	19,2	4	12,1	—	—	2	6,8	1	4,5
Infanzones	—	—	2	3,8	—	—	16	64	1	3,4	2	9
Roderos	—	—	2	3,8	—	—	—	—	6	20,6	2	9
Sta. María del Páramo	—	—	3	5,7	18	54,5	—	—	3	10,3	1	4,5
TOTAL Zona Sur	27	81,8	42	80,7	23	69,6	17	68	16	55,1	13	59
Zona norte	6	18,1	12	19,2	10	30,3	8	32	13	44,8	9	40,9

CUADRO N.º 15

Frecuencia total de especies facultativamente patógenas en el Norte y Sur de la provincia

Zonas	Cepas facultativamente patógenas ¹	
	N.º	%
Zona Sur	148	77,7
Zona Norte	58	22,2
TOTAL	206	100

¹ Están incluidas solamente: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. humicola*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*.

4.5. Variación estacional de especies facultativamente patógenas y no patógenas.

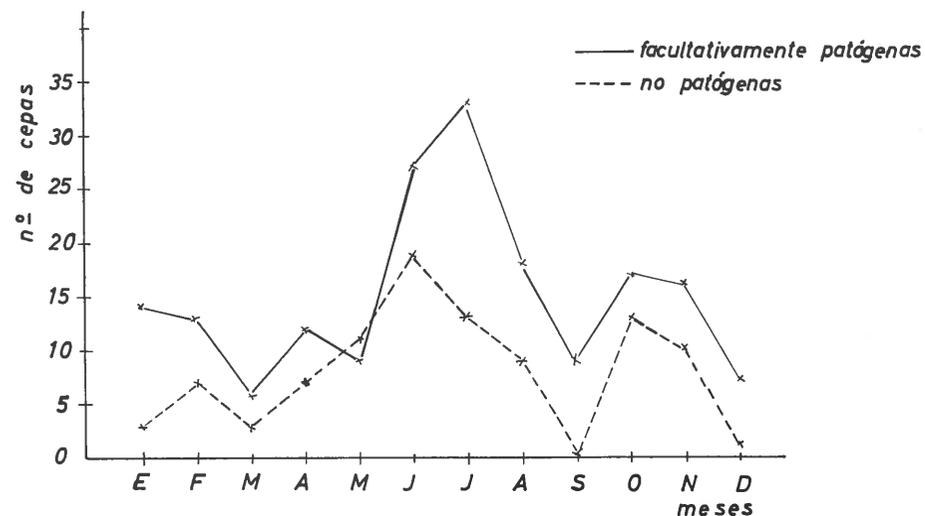
De la misma manera que el número de colonias sufrió una variación estacional importante, como ya hemos dicho anteriormente, habiendo quedado reflejado en el gráfico n.º 9, el número de cepas facultativamente patógenas y no patógenas experimentó una variación similar. Los valores correspondientes a los distintos meses del año pueden observarse en el cuadro n.º 16, habiéndose representado gráficamente la variación de cada uno de los dos grupos (gráfico n.º 10). Los valores más altos corresponden al período estival, siendo sensiblemente inferiores los relativos a las cepas no patógenas. A su vez dentro de este período, la cúspide en las facultativamente patógenas correspondió al mes de julio, mientras que en las no patógenas, al de junio.

El hecho de que los valores correspondientes a las cepas facultativamente patógenas, fueran superiores a los de las no patógenas, estaría, posiblemente, en relación

CUADRO N.º 16

Variación estacional de las especies facultativamente patógenas y no patógenas

Meses	N.º de cepas facultativamente patógenas	N.º de cepas no patógenas
Enero	14	3
Febrero	13	7
Marzo	18	3
Abril	12	7
Mayo	29	11
Junio	27	19
Julio	33	13
Agosto	18	9
Septiembre	9	—
Octubre	17	13
Noviembre	16	10
Diciembre	7	1



Gráf. N.º 10.—Variación estacional de cepas facultativamente patógenas y no patógenas

con el menor número aislado de éstas. Por otra parte, no se ha observado ninguna otra diferencia entre uno y otro grupo, por lo que consideramos que la incidencia de especies, no depende tanto de su carácter patógeno, como de las influencias ambientales.

4.6. Resultados de las pruebas especiales efectuadas para la tipificación de las cepas.

La prueba de diagnóstico rápido para identificación de *C. albicans*, por formación de tubos germinales, se efectuó con todas las cepas aisladas, siendo solamente las cepas de *C. albicans* las que los formaron al cabo de tres horas de cultivo a 37° C, tanto en suero humano, como de ternera y de conejo. A su vez *C. albicans* fue la única especie que dio resultado positivo a la prueba de formación de clamidosporas.

En cada uno de los sueros se contaron, sobre un total de 500 células de levaduras aquéllas que producían tubos germinales. En el cuadro n.º 17 aparece para cada uno de los tres sueros, la media de células filamentadas de las 33 cepas de *C. albicans*, correspondiendo el mayor porcentaje al de conejo (14,8 %).

CUADRO N.º 17
Media de producción de tubos germinales en *C. albicans*

	Sueros					
	Humano		Ternera		Conejo	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Media de células filamentadas en las 33 cepas de <i>C. albicans</i> sobre un total de 500 células.	32	6,4	26	5,2	74	14,8

La prueba de formación de clamidosporas (carácter de reproducción vegetativa, típico de *C. albicans*) se efectuó con todas las cepas aisladas, siendo solamente positiva en el caso de *C. albicans*.

Aquellas cepas que, en un principio, fueron tipificadas como *C. albicans*, pero que resultaron negativas a la producción de tubos germinales y clamidosporas, se consideraron como *C. clausenii*, incluyéndolas dentro de las levaduras facultativamente patógenas.

MACKENZIE³⁶ estudió la formación de tubos germinales con cepas de *C. albicans* productoras de clamidosporas, con otras especies del género *Candida* y con *Sacch. fragilis*, *Schiz. versatilis*, *Tr. capitatum* y *Geotrichum* sp., observando que la producción de tubos germinales era una propiedad característica de *C. albicans*, aunque también otras especies, *C. stellatoidea*, *C. utilis*, *C. rugosa* y *Schiz. versatilis* los produjeron. También comprobó que algunas formas pseudomiceliarias de *C. brumptii* y *C. pseudotropicalis* podían recordar a dichos tubos germinales. No obstante, consideró que esta prueba, en unión de las bioquímicas, podía ser importante para la identificación de *C. albicans*.

Por el contrario, ALTERAS y GAVRILESCO⁶ consideraron que es una prueba característica para el diagnóstico de *C. albicans*, lo que coincide con lo observado en nuestro trabajo. Nosotros no hemos podido comprobar la formación de tubos germinales, más que a partir de aquellas cepas que habían sido tipificadas como *C. albicans*, por medio de pruebas bioquímicas, fermentativas y asimilativas, así como por la formación de clamidosporas.

En relación con el rendimiento de los distintos líquidos orgánicos utilizados en orden a la formación de tubos germinales, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por ALTERAS y GAVRILESCO⁶ y MACKENZIE³⁶, siendo mayor en suero de conejo³⁶ y suero humano,^{6 36} que en suero bovino.

5. CONCLUSIONES

1. En la leche bovina de mezcla, procedente de la zona oriental de la provincia de León, se encuentran levaduras con frecuencia. (De 481 muestras 395 aislamientos positivos: 82,1 % de positividad). Los altos porcentajes de contaminación sugieren deficiencias en la higiene del ordeño, recogida y transporte de la leche.

2. Se tipificaron 278 cepas de las especies siguientes, cuya frecuencia se expresa:

Candida tropicalis (18,7 %), *C. albicans* (11,8 %), *C. humicola* (11,8 %), *C. parapsilosis* (10,4 %), *C. pseudotropicalis* (8,9 %), *C. krusei* (7,9 %), *C. lambica* (4,6 %), *C. valida* (4,3 %), *C. rugosa* (2,5 %), *C. conglobata* (2,1 %) *C. guilliermondii* (1,7 %) *C. mogii* (1,7 %), *C. intermedia* (1,4 %) *C. clausenii* (0,7 %), *C. stellatoidea* (0,3 %) *C. lipolytica* (0,3 %), *C. tenuis* (0,3 %), *Rhodotorula rubra* (3,9 %), *Torulopsis candida* (0,3 %), *T. glabrata* (0,3 %), *Saccharomyces cerevisiae* (0,7 %), *Pichia membranaefaciens* (2,1 %), *P. fermentans* (1,4 %) y *Pichia farinosa* (0,7 %). En resumen, las *Candida* spp. representaron el 90,3 % de los aislamientos.

3. *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. humicola*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* y *C. krusei*, consideradas como facultativamente patógenas, se aislaron con la máxima frecuencia en el S. de la provincia (77,7 %).

4. El número de levaduras, en general, y el de las facultativamente patógenas, en particular, aumenta durante los meses de verano, sobre todo en la zona S. de la provincia.

5. Se observó una correlación inversa entre la presencia de levaduras y hongos filamentosos.

6. *Rhodotorula rubra* nunca se aisló en cultivo puro, sino asociada a *Candida* spp.

7. La prueba de producción de tubos germinales fue positiva en el 100 % de las cepas de *C. albicans*, siendo negativa para el resto de las levaduras.

8. Para la producción de tubos germinales, resultó más adecuado el suero de conejo, que el humano y el de ternera, ya que la proporción de células con tubos germinales era mucho mayor en el primero de los sueros.

6. RESUMEN

A fin de conocer la incidencia de levaduras en leche bovina y su variación estacional, así como las especies más frecuentes en la misma, se ha realizado un estudio a lo largo de los 12 meses del año, en muestras de leche de mezcla, representativas de la mitad oriental de la provincia de León y pertenecientes a animales de trece zonas de la misma.

Se identificaron los siguientes géneros de levaduras: *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Pichia*, siendo *Candida* el de mayor frecuencia (90,3 %). Dentro de este género se aislaron con mayor frecuencia las especies consideradas facultativamente patógenas, *Candida tropicalis* (18,7 %), *C. albicans* (11,8 %), *C. humicola* (11,8 %), *C. parapsilosis* (10,4 %) *C. pseudotropicalis* (8,9 %) y *C. krusei* (7,9 %), siendo la mayor incidencia de estas especies en la zona S. de la provincia, más seca y de menor altitud que la N.

Se observó una correlación inversa entre el número de levaduras aisladas y la presencia de hongos filamentosos en las mismas.

Todas aquellas cepas que se tipificaron como *C. albicans*, mediante pruebas bioquímicas y que produjeron clamidosporas, dieron positivo a la prueba de producción de tubos germinales, siendo negativas a esta prueba el resto de las cepas aisladas. Para la realización de esta prueba, se comportó como más efectivo el suero de conejo que el suero humano y bovino.

Se comprobó un alto porcentaje de levaduras (82,1 %) probablemente debido en gran parte a contaminaciones a partir del aire, suelo, utensilios y manejo durante el ordeño. La variación estacional de las colonias sufrió un aumento en los meses de verano, así como también el número de cepas pertenecientes a especies facultativamente patógenas.

RESUME

A fin de connaître l'incidence des levures dans le lait bovin et leur variation saisonnière, ainsi que les espèces les plus fréquentes dans ce lait, on a effectué une étude durant les douze mois de l'année avec des échantillons représentatifs de la moitié de la partie Orientale de la province de León et qui appartenaient à des animaux de treize régions différentes de cette province.

On a identifié les genres de levures suivants: *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* et *Pichia*. Le *Candida* étant le plus fréquent de tous (90,3 %), dans ce genre on isole plus fréquemment les espèces considérées comme facultativement pathogènes: *Candida tropicalis* (18,7 %), *C. albicans* (11,8 %), *C. humicola* (11,8 %), *C. parapsilosis* (10,4 %), *C. pseudotropicalis* (8,9 %), et *C. krusei* (7,9 %); la plus grande incidence de ces espèces se trouve dans la région Sud de la province, qui est plus sèche et a moins d'altitude que celle du Nord.

On a remarqué une corrélation inverse entre le nombre de levures isolées et la présence de fungi filamenteux qu'elles contenaient.

Toutes les souches classifiées comme *C. albicans*, après avoir fait des essais biochimiques, et qui produisirent des clamidospores donnèrent un résultat positif à l'essai de production de tubes géminaux; le reste des souches isolées donnèrent un résultat négatif à cet essai. Le sérum de lapin fut plus effectif que celui de l'homme et que celui des bovins pour effectuer cet essai.

On a remarqué aussi un pourcentage de levures élevé (82,1 %), probablement dû, en grande partie, à des contaminations provenant de l'air, du sol, des ustensiles et du maniement pendant la traite.

La variation saisonnière des colonies, ainsi que le nombre de souches qui appartenaient à des espèces facultativement pathogènes augmenta pendant les mois d'été.

SUMMARY

In order to know the yeast incidence in bovine milk and its stationary variation, as well as the most frequent species found in it, a study has been carried out during the twelve months of a year on some mixed milk samples representing a half of the Eastern region in León province and pertaining to animals from thirteen different regions of said province.

The following genera of yeasts were identified: *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* and *Pichia*. As *Candida* is the most frequent of all these genera (90,3 %), the species considered to be facultatively pathogenic, such as *Candida tropicalis* (18,7 %), *C. albicans* (11,8 %), *C. huimicola* (11,8 %), *C. parapsilosis* (10,4 %), *C. pseudotropicalis* (8,9 %) and *C. krusei* (7,9 %) were isolated more frequently, the greatest incidence of these species being in the Southern region of the province; this region is drier and has less altitude than the Northern one.

We have noticed an inverse correlation between the number of yeasts isolated and the presence of filamentous fungi in said yeasts.

After biochemical assays, all the strains being classified as *C. albicans* that produced clamidospores had a positive result against the geminal tube production assay; the remaining isolated strains were negative against this assay. The rabbit serum was more effective than human serum and than bovine serum for said assay performance.

A high percentage (82.1 %) of yeast, probably and greatly due to contaminations from air, soil, utensils and handling on milking was remarked.

The stationary variation of the colonies as well as the number of strains pertaining to facultatively pathogenic species increased during summer months.

7. AGRADECIMIENTOS.

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Dr. Benito Aller Gancedo, director de esta tesis, que, además de proporcionarnos el tema del trabajo, ha puesto a nuestra disposición su experiencia en el campo de la micología y su capacidad docente.

Así mismo, al profesor Dr. Miguel Cordero del Campillo, cuya generosa ayuda científica, moral y económica, nos ha permitido la culminación de este trabajo.

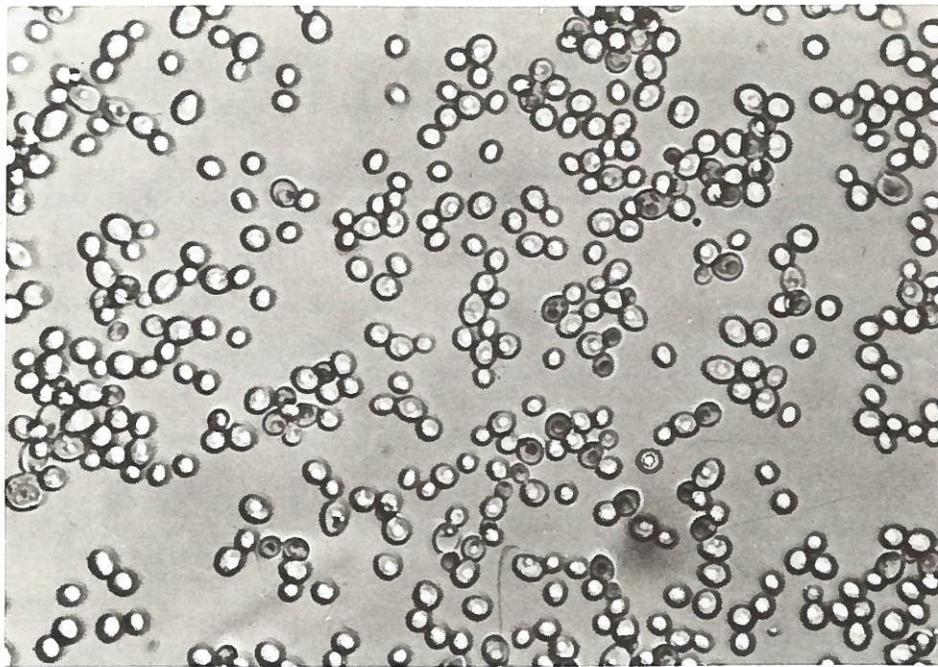
Quiero agradecer también la colaboración del profesor Dr. Antonio Martínez Fernández, del Dr. Máximo Fernández Díez y de don Francisco Rojo Vázquez, así como a todos los miembros del Departamento de Patología infecciosa de la Facultad de Veterinaria, donde se ha realizado este trabajo.

Igualmente a la Industria Kraft Leonesa S. A., por las facilidades dadas para la recogida de muestras.

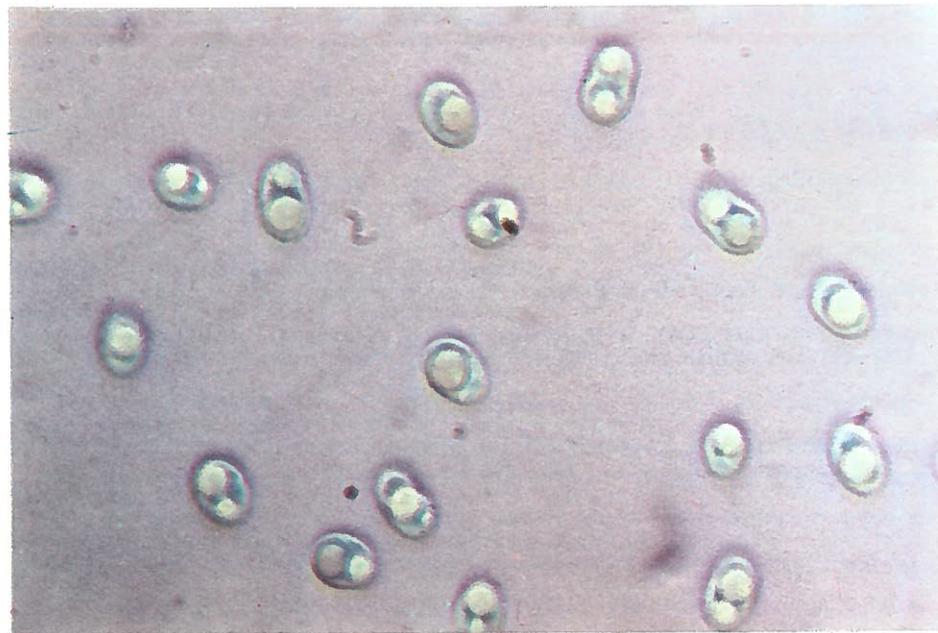
8. BIBLIOGRAFIA

- ADRIANO, S. M. y SCHWARZ, J. (1955). Experimental moniliasis in mice. *Amer. J. Path.*, **31**: 859-573.
- AINSWORTH, G. C. (1961). AINSWORTH & BISBY'S. *Dictionary of the Fungi*. 5.^a ed.; Butler & Tanner Ltd.: Frome and London.
- y AUSTWICK, P. K. C. (1959). *Fungal Diseases of Animals*. Commonwealth Agricultural Bureaux. Farnham Royal, Bucks: England.
- AJELLO, L., GEORG, L. K., KAPLAN, W. y KAUFMAN, L. (1966). *Laboratory Manual for Medical Mycology*; U. S. Government Printing Office, Washington. 1.^a reimpression. Apart. E.: U. S. A.
- ALLER, B., REY, M. y MARTÍNEZ, A. (1971). Estudio de la incidencia de los hongos en el aire de León durante un año. *Rvta. Clin. Esp.*, **121**: 457-460.
- ALTERAS, I. y GAVRILESCO, M. (1966). Nouvelles methodes d'identification rapide du *Candida albicans*. *Der. Vener.*, **11**: 42-47
- ANGELACHEV, A. (1968). Mastitis in cows, caused by *Candida*. *Vetery. Nauki*, **5**: 79-86.
- AUSTWICK, P. K. C., PEPIN, G. A., THOMPSON, J. C. y YARROW, D. (1966). *Candida albicans* and other yeasts associated with animal disease. (Mammary Glands) en: *Symposium on Candida Infections*. Ed. by WINNER and HURLEY. Edt. E & S Livingstone Ltd. Edimburg & London: 89-100.
- BAKERSPIGEL, A. (1962). Sodium taurocholate medium for the identification of *Candida albicans*. *J. Bact.*, **83**: 694
- BENITO-TRUJILLO, M. M., BORREL, A. J. y OGER, C. (1955). Sur la présence de levures dans des laits pathologiques. *Rev. méd. vét.*, **106**: 586-592.
- BISPING, W. (1961). Über das Vorkommen von Sprosspilzen einigen Hastieren und deren Bedeutung als Infektionsquelle für den Menschen. *Mykosen*, **4**: 137-143
- (1963). Untersuchungen über die Ätiologie von Sprosspilzinfektionen bei Hastieren. *Zbl. Vet. Med., Reihe B*, **10**: 325-361.
- BUMP, C. M. y KUNZ, L. J. (1968). Routine Identification of yeasts with the Aid of Molybdate-Agar Medium. *Appl. Microbiol.*, **16**: 1503-1506.
- BÜRGER, H. (1970). Ein vereinfachtes Verfahren zum Nachweis fermentativer Leistungen der Hefe. *Mykosen*, **13**: 91-96.
- DAWSON, C. O. (1962). Identification of *Candida albicans* in primary culture. *Sabouraudia*, **1**: 214-219.
- DI MENNA, M. E. (1956). A search for *Cryptococcus neoformans* in milk. *Antonie van Leeuwenhoek*, **22**: 331-336.
- DROUHET, E. y MILLE COUTEAU, M. (1954). Sur détermination des Candidas. *Ann. Inst. Pasteur*, **86**: 602-617.
- EL FIKI, A. Y., RIETH, H. y BISPING, W. (1959). La demostración de levaduras patógenas en veterinaria. *Arch. Vet. Práctica*. Fac. 104.
- FAMEREE, L., SWINNE-DESGAIN, D. y COTTELEER, C. (1970). Mammites, antibiotiques et levures. *Ann. Méd. Vét.*, **114**: 386-406.
- GALLI, G. (1965). Osservazione e studi sulla mastite da *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. *Vet. ital.*, **16**: 227-237.
- GOLDSTEIN, E., GRIECO, M. H., FINKEL, G. y LOURIA, D. B. (1965). Studies on the pathogenesis of experimental *Candida parapsilosis* and *Candida guilliermondii* infections in mice. *J. Infect. Dis.*, **115**: 293-302.
- GRACIA MIRA, A. de (1959). Identificación en España de un tipo de mamitis bovina de etiología levaduriforme. *Boln. Inf. Cons. Gen. Col. Vet. Esp.*, **6**: 5-24.
- GUILHON, J., CHARTON, A., DROUHET, E., KAHN, J. y LECOANET, J. (1961). Mammite de la vache due à *Candida pseudotropicalis*. *Bul. Acad. Vét.*, **34**: 367-370.
- HASENCLEVER, H. F. (1959). Comparative pathogenicity of *Candida albicans* for mice and rabbits. *J. Bact.*, **78**: 105-109.
- HASENCLEVER, H. F. y MITCHELL, W. O. (1961). Pathogenicity of *C. albicans* and *C. tropicalis*. *Sabouraudia*, **1**: 16-21.
- HEIDRICH, H. J. y RENK, W. (1969). *Enfermedades de las glándulas mamarias en los animales domésticos*. Trad. del alemán por SÁNCHEZ-GARNICA y MONTES, C.: Ed. Labor S. A., Barcelona-Madrid: España.

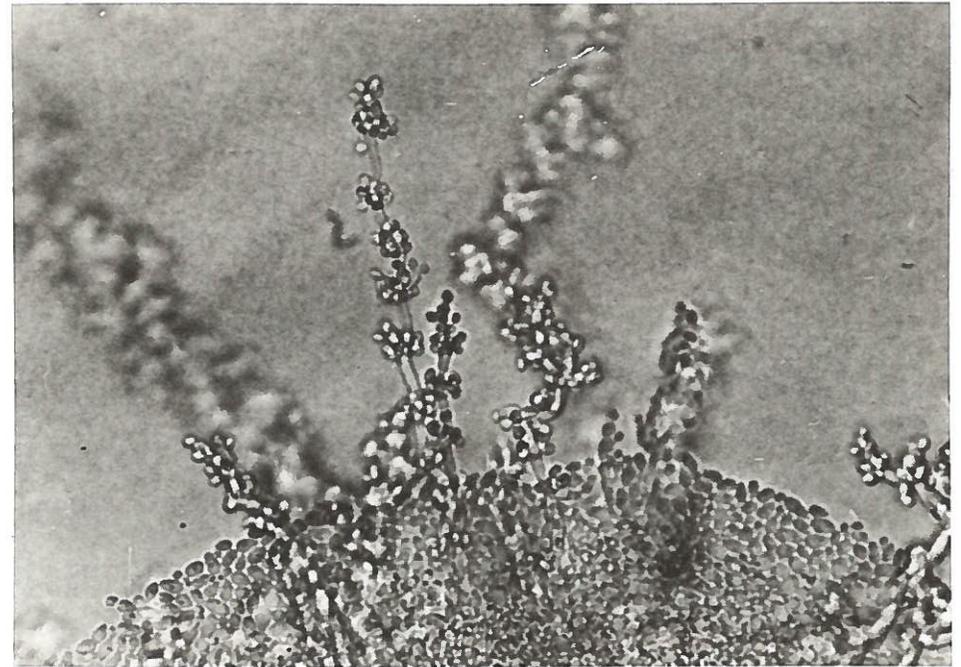
27. HOFFMANN, G., RICHTER, W. y KÖHLER, G. (1968). Orientierenden Untersuchungen über das Vorkommen von Hefen in Euter gesunder und mastitiskrander Rinder in Syrien. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.*, **81**:259-261.
28. HURLEY, R. y WINNER, H. I. (1963). Experimental renal moniliasis in the mouse. *J. Path. Bact.*, **86**: 75-82.
29. HURLEY, R. (1965). The pathogenicity of *Candida stellatoidea*. *J. Path. Bact.*, **90**: 351-354.
30. ——— y WINNER, H. I. (1962). The pathogenicity of *Candida tropicalis*. *J. Path. Bact.*, **84**: 33-38.
31. LODDER, J. edit. (1970). *The yeasts: a taxonomic study*. North-Holland Publishing Co.; Amsterdam-London: Netherland.
32. ——— y KREGER VAN RIJ, N. J. W. (1967). *The yeasts: a taxonomic study*. 2nd printing. North-Holland Publishing Co. Amsterdam: Netherland.
33. LONFTSGARD, G. y LINQVIST, K. (1962). Mamitis micósica de la vaca. *Veterinaria*, **26**: 107-108. (Resumen).
34. LOURIA, D. B., BRAYTON, R. G. y FINKEL, G. (1963). Studies on the pathogenesis of experimental *Candida albicans* infection in Mice. *Sabouraudia*, **2**: 271-283.
35. LOURIA, D. B. (1966). Pathogenesis of Candidiasis. *Antim. Ag. and Chemoth.* (1965): 417-426.
36. MACKENZIE, D. W. R. (1962). Serum tube identification of *Candida albicans*. *J. Clin. Path.*, **15**: 563-565.
37. MANKOWSKI, Z. T. (1957). The experimental pathogenicity of various species of *Candida* in Swiss mice. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **19**: 548-570.
38. MEHNERT, B., ERNEST, K. y GEDEK, B. (1964). Hefen als Mastitiserreger beim Rind. *Zbl. Vet. Med.*, **11 A**: 97-121.
39. MILLER, N. W., PHAFF, H. J. y SNYDER, H. E. (1962). On the occurrence of various species of yeasts in nature. (With reference to *C. albicans*, *C. clausenii* and *T. glabrata*). *Mycopathologia*, **16**: 1-18.
40. MITROIU, P. y TOMA, C. (1965). Identificarea fungilor levuriformi in mamitele vacilor. *Lucr. Inst. Cerc. Vet. Bioprep. Pasteur*, **4**:189-211.
41. ——— y ——— (1966). Reproducerea experimentală cu fungi levuriformi a mamitei la oi. *Lucr. Inst. Cerc. Vet. Bioprep. Pasteur*, **5**: 399-415.
42. MOURAD, S. y FRIEDMAN, L. (1961). Pathogenicity of *Candida*. *J. Bact.*, **81**: 550-556.
43. NOWAK, B. (1967). Drożdżaki wyhodowane z mleka krów. *Medycyna wet.*, **23**: 592-596.
44. PARLE, J. N. (1957). Yeasts Isolated from the mammalian Alimentary tract. *J. gen. Microbiol.*, **17**: 363-367.
45. RAMANANDA, R. D. y SIRSI, M. (1962). The pathogenicity of *Candida albicans* and the effect of nystatin on experimental candidiasis. *Indian J. Med. Res.*, **50**: 66-72.
46. REDAELLI, G. (1957 a). Ricerche sulle mastiti micotiche. I. Riproduzione sperimentale della mastitie criptococcica. *Arch. Vet. Ital.*, **8**: 39-65.
47. ——— (1957 b). Ricerche sulle mastite micotiche. II. Controllo sperimentale dell'azione patogena di alcuni blastomiceti sporigeni ed asporigeni (*Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* e *Candida*) per la mamella degli animali da latte. *Arch. Vet. Ital.*, **8**: 97-120.
48. REFAL, M. K. M. M. (1963). *Untersuchungen über die Sprosspilzmastitis beim Rinde*. Grade Dr. Medicinæ Veterinariae: Hannover.
49. RENK, W. (1961). Über die durch und hefeähuliche Organismen hervorgerufenen Mastitiden. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **74**: 409-412.
50. SCHOLER, H. J., SCHNEIDER, P. A. y BERTSCHINGER, H. U. (1962). Nachweis von *Cryptococcus neoformans* und anderen Hefen aus Milch von Kühen mit Mastitis. *Path. Microbiol., Basel*, **24**: 803-818.
51. SING, M. P. y SING, C. M. (1968). Fungi isolated from clinical cases of bovine mastitis in India. *Indian J. Ani. Health*, **7**: 259-263.
52. SMITH, J. M. B. (1967). Candidiasis in animals in New Zealand. *Sabouraudia*, **5**:220-225.
53. SWINNE-DESGAIN, D. (1971). Isolement de levures à partir de lait de vache. *Cah. Méd. Vét.*, **40**: 57-63.
54. TOPOLKO, S. (1968). The incidence of yeasts in the udders of cows and experimental investigations in mycotic mastitis. *Veterinarski Archiv, Zagreb*, **38**: 242-246.
55. TUCKER, E. W. (1954). Case report on yeast infections of the bovine udder. *Cornell Vet.*, **44**: 79-85.
56. VAN UDEN, N. (1960). The occurrence of *Candida* and other yeasts in the intestinal tracts of animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **89**: 59-68.
57. ——— y DO CARMO SOUSA, L. (1957). Yeasts from Bovine Caecum. *J. gen. Microbiol.*, **16**: 385-395.
58. ——— y ———, L. (1958). On the intestinal yeast flora of horses, sheep, goats and swine. *J. gen. Microbiol.*, **19**: 435-445.
59. WINNER, H. I. y HURLEY, R. (1964). *Candida albicans*. J. & A. Churchill Ltd., London: England.
60. YARROW, D. (1968). *Torulopsis peltata* sp. n. *Antonie van Leeuwenhoek*, **34**: 81-84.
61. ——— (1969 a). *Candida steatolytica* sp. n. *Antonie van Leeuwenhoek*, **35**: 24-28.
62. ——— (1969b). *Selenotila peltata* comb. n. *Antonie van Leeuwenhoek*, **35**: 418-420.



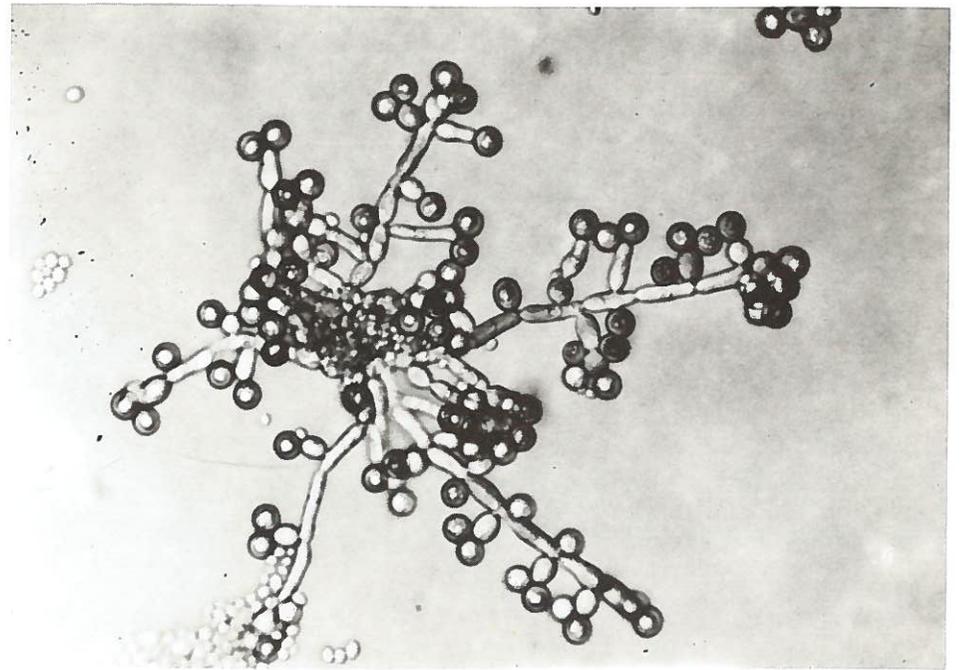
Fot. 1. *Candida albicans*, 450 X.



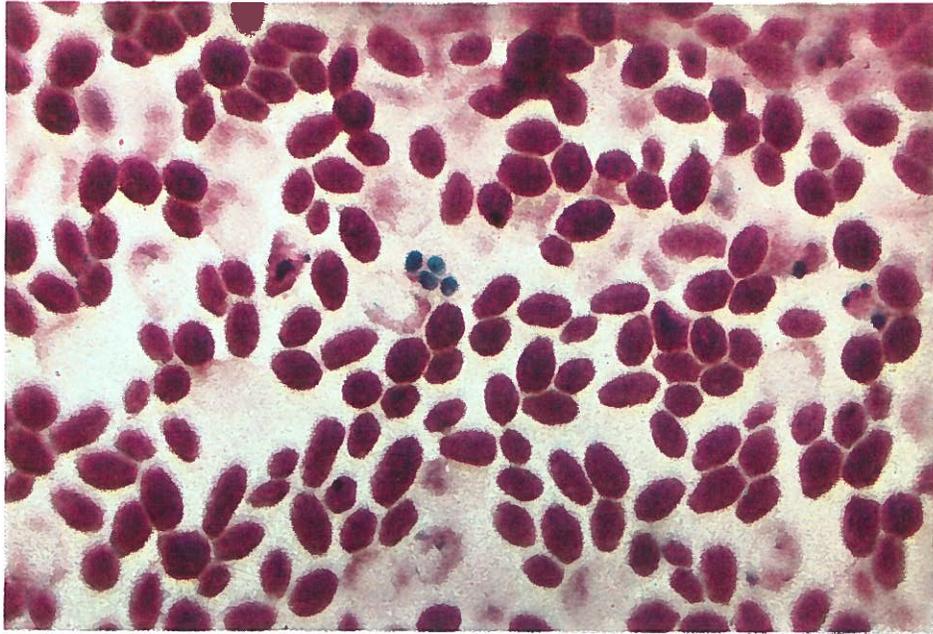
Fot. 2. *Rhodotorula rubra* (tinción vital, verde de metilo acético), 1.000 X.



Fot. 3. *Candida tropicalis* (pseudomicelio), 450 X.



Fot. 4. *Candida albicans* (clamidosporas), 250 X.



Fot. 5. *Saccharomyces cerevisiae* (ascosporas, coloración de Wirtz modificada), 1.000 X.



Fot. 6. *Candida albicans* (tubos germinales), 1.000 X.