



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS
A PARTIR DE *Candida* AISLADAS DE CASOS
CLÍNICOS HUMANOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

MARÍA DE LOURDES TORRES VALDEZ

ASESORES: DR. ENRIQUE SALAS TELLEZ
DRA. ALMA LUCILA NUÑEZ DEL ARCO

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Determinación de la producción de biopelículas a partir de Candida aisladas de casos clínicos humanos

Que presenta la pasante: María de Lourdes Torres Valdez
Con número de cuenta: 306341526 para obtener el Título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de septiembre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Enrique Salas Téllez	
VOCAL	Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco	
SECRETARIO	QFB. Raquel Ma. del Refugio Tapia Romero	
1er. SUPLENTE	QFB. Laura Gricelda Martínez Méndez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Heidi Johanna Amezcua Hempel	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIAS

Con respeto y cariño a mis padres por darme la mejor de las herencias:

“Una profesión”.

Gracias por el apoyo y el ejemplo que en cada segundo de mi vida me han brindado, por sus cuidados, amor y comprensión, por sus sabios consejos que me orientaron por el camino recto de la vida.

Con respeto y admiración.

A mi hermano con gratitud por el apoyo brindado en mis proyectos.

Al Dr Enrique Salas Téllez, y a la Dra Alma L. Núñez del Arco, por sus orientaciones acertadas que hicieron posible la realización de este trabajo, por el apoyo y asesoría recibida.

¡Gracias!

A mis amigos: Antonio Vargas, Mayra Lira, Sofía Piña, Sandra Tobón, Irene Solís, José I. Merlán, Alfredo Cisneros por el mejor de los regalos: “La amistad”.

Con gratitud imperecedera a mis profesores:

Dra. Patricia Ramírez Noguera

Dr. Roberto Díaz Torres

M. en C. Raquel Ma. Del Refugio Tapia Romero

Q.F.B Laura Gricelda Martínez Mendéz

Quienes colaboraron para mi formación profesional.

A todos aquellos que ingresaron a la licenciatura por azares del destino, para que quieran a su profesión como yo la amo.

DEDICATORIAS

Se agradece la donación de *C. albicans* ATCC 32354 a la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras y al Dr. Erick Monroy Pérez de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Se agradece a la Cátedra de Inmunodiagnóstico Microbiano de la UIM Laboratorio 17 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por el apoyo brindado.

¡Gracias!

Trabajo realizado con el apoyo del Programa UNAM-DGAPA-PAPIME clave: PE207414

ÍNDICE

I	Abreviaturas.....	I
II	Índice de cuadros.....	II
III	Índice de figuras	III
IV	Índice de gráficas.....	IV
V	Resumen	V
1.	Introducción.....	1
1.1.	Descripción taxonómica del genero <i>Candida</i>	2
1.1.1.	Descripción del genero <i>Candida</i>	3
1.1.2.	Composición de la pared celular.....	4
1.1.3.	Morfogénesis.....	4
1.1.4.	Genética molecular del polimorfismo de <i>Candida</i>	5
1.2.	Descripción de especies importantes del género <i>Candida</i> en humanos.....	6
1.3.	Distribución de la Candidosis.....	6
1.4.	Patogénesis de la Candidosis.....	7
1.5.	Factores de virulencia	10
1.5.1.	Adaptación del pH.	10
1.5.2.	Enzimas.....	10
1.5.2.1.	Proteasas.....	10
1.5.2.2.	Fosfolipasas.....	12
1.5.2.3.	Lipasas.....	12
1.5.3.	Adhesinas.....	12
1.5.3.1.	Als.....	13
1.5.3.2.	Hwp1p.....	13
1.5.3.3.	Int1p.....	13
1.5.3.4.	Mnt1p.....	14
1.5.4.	Transición morfológica.....	14
1.5.5.	Switching fenotípico.....	14
1.5.6.	Biopelículas	15
1.5.6.1.	Heterogeneidad de biopelículas.....	16
1.5.6.2.	Desarrollo y estructura de biopelículas.....	16
1.5.6.3.	Fases de desarrollo de biopelículas.....	18
1.5.6.3.1.	Fase de acontecimiento.....	18
1.5.6.3.2.	Fase de adhesión.....	19
1.5.6.3.3.	Síntesis de matriz.....	19
1.5.6.3.4.	Fase de maduración.....	20
1.5.6.3.5.	Fase de dispersión.....	20
1.6.	Aspectos Inmunológicos.....	20

1.6.1. Respuesta inmunológica ante la presencia de <i>Candida</i>	20
1.6.2 Evasión del sistema inmunológico.....	21
1.7. Importancia de las biopelículas en Salud Pública.....	22
1.8. Epidemiología.....	23
1.9. Métodos de estudio para la formación de biopelículas.....	27
1.9.1. Cristal violeta.....	28
1.9.2. Alamar blue.....	28
1.9.3. Syto 9.....	29
1.9.4. XTT.....	29
1.9.5. Resazurina.....	29
1.9.6. FDA.....	30
1.9.7. DMMB.....	30
1.10. Resistencia a antibióticos.....	30
1.11. Tratamiento.....	35
2. Antecedentes.....	37
3. Justificación	40
4. Hipótesis.....	41
5. Objetivos.....	41
5.1. Objetivo general.....	41
5.2. Objetivos particulares.....	41
6. Diagrama de trabajo.....	42
7. Materiales y método.....	44
7.1. Cepas utilizadas.....	44
7.2. Identificación de cepas.....	44
7.3. Evaluación de formación de biopelículas	44
8. Resultados.....	46
9. Discusión.....	53
10. Conclusión.....	62
11. Referencias.....	63
12. ANEXO 1 Identificación y origen de la cepa.....	68
13. ANEXO 2 Reactivos.....	73
14. ANEXO 3 Resultados DS y DO formación de biopelículas.....	74
15. ANEXO 4 Distribución por rango de formación de biopelículas.....	79

I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado	Pagina
SAP	proteasas aspartico secretoras	10
kDa	Kilodalton	21
PMN	Polimorfonucleares	21
IL	interleucina	21
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt.	46
Als	Del ingles Agglutinin-like secuencia.	13
Hwp1p	Del ingles hyphal and germ tube specific gene.	13
Int1p	Del ingles putative integrin gene	13
Mnt1p	Gen manosil transferasa	14
YPD	Del ingles Yeast Peptone Dextrose	46

II. ÍNDICE DE CUADROS

Número	Título	Página
1	Taxonomía del Genero <i>Candida</i>	2
2	Nombre de las especies oportunistas de <i>Candida</i> en sus estados anamorfos y telemorfos.	2
3	Características Bioquímicas del Genero <i>Candida</i> .	8
4	Formas Clínicas de la candidosis	9
5	Actividad antimicótica <i>in vitro</i> de antifungicos utilizados en el tratamiento de candidosis invasoras.	36
6	Distribución de muestras según la edad	47
7	Distribución de muestras según el diagnóstico	48
8	Distribución de muestras según la clínica de procedencia.	49
9	Distribución de muestras con dos cepas identificadas.	50

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Microscopía electrónica de transmisión, Morfología de <i>Candida</i>	3
2	Morfogénesis en <i>Candida</i> durante la infección.	5
3	Fases de formación de biopelículas y estrategias de dispersión	18
4	Morfogénesis en <i>Candida</i> durante la infección	21
5	Estrategia experimental para realizar la identificación de muestras.	42
6	Diagrama experimental para la Formación de biopelículas.	43

IV. ÍNDICE DE GRÁFICOS

Número	Título	Página
1	Tasa de incidencia de candidiasis urogenital	24
2	Relación entre los casos nuevos según la edad y sexo de candidiasis urogenital	25
3	Relación entre la incidencia y la entidad federativa de candidiasis urogenital	26
4	Distribución de muestras según el género	46
5	Distribución de muestras según origen	47
6	Distribución de cepas según la especie	49
7	Formación de biopelículas por origen de las muestras y tiempos de incubación (24, 48 y 72 hrs.)	52
8	Formación de biopelículas por especie y tiempos de incubación (24, 48 y 72 hrs.)	52

V. RESUMEN

La formación de biopelículas está asociada con el aumento de las infecciones en dispositivos de implantes médicos sobre todo en pacientes inmunosuprimidos, esto implica un reto en la salud pública ya que *Candida* es la tercera causa de infecciones asociadas a catéteres, lo que representa la segunda más alta tasa de colonización y la mayor en lo referente a la mortalidad. La formación de biopelículas de *Candida* tiene repercusiones clínicas debido a una mayor resistencia a la terapia antifúngica y la capacidad de las células dentro de las biopelículas para resistir las defensas del huésped, además de que, puede servir como depósito para futuras infecciones. El objetivo de este estudio es comparar la producción de biopelículas a partir de aislamientos de *Candida* provenientes de muestras clínicas. Se identificaron 106 muestras, de las cuales fueron identificadas según el género, edad, origen de la muestra, diagnóstico, clínica de procedencia, y especie, de las cuales pudimos identificar 112 cepas ya que 6 de las muestras identificadas contenían doble cepa, las cuales fueron sometidas a la metodología modificada para la formación de biopelículas de Ramage et al 2001. Demostrando que la capacidad de formar biopelículas está íntimamente asociado con la capacidad de provocar la infección y como tal debe ser considerada como un factor determinante durante la candidiasis, nuestros resultados muestran que la formación de biopelículas formadas por especies del género *Candida* en especial *C. albicans* y *C. parapsilosis* demostraron fuertes evidencias de su capacidad para adherirse y formar biopelículas en comparación con otras especies.

1.- INTRODUCCIÓN

El género *Candida* son organismos comensales en el intestino de individuos sanos; se ha visto que están presentes universalmente. La colonización por las especies de *Candida* puede llevar a la infección sistémica cuando el huésped tiene varios factores de riesgo, como el uso de antibióticos de amplio espectro, esteroides u otros agentes inmunosupresores, diabetes mellitus, SIDA, depresión de las funciones fagocíticas o alteraciones locales del sistema gastrointestinal (Jagath, 2012; López, 2012). Estas situaciones pueden ocasionar candidiasis oral, gastrointestinal o diseminación hematogena. Las especies del género *Candida* son microorganismos muy versátiles, por su capacidad para sobrevivir como comensal en varios sitios anatómicamente distintos (intestino, cavidad oral y vagina), y puede causar enfermedad cuando se le presenta la oportunidad (Arenas, 2011; Bonifaz, 2010; Calderone, 2002). La limitación por nutrientes y la competencia entre bacterias y hongos (microbiota) en las superficies de mucosas proporcionan una presión selectiva que ocasiona la eliminación de los microorganismos menos adaptados. El género *Candida* tiene varios factores de virulencia para colonizar el huésped y ocasionar daño de forma directa, al activar, resistir o desviar los mecanismos de defensa del mismo (Jagath, 2012). Los factores de virulencia expresados o requeridos por el microorganismo para causar infección pueden variar según el tipo, el sitio y la naturaleza de las defensas del huésped (Arenas, 2011; Bonifaz, 2010; Lopez, 2012). El delicado equilibrio entre el huésped y el hongo patógeno puede convertirse en una relación parásitaria y resultar en enfermedad grave (Bonifaz, 2010; Calderone, 2002). Los hongos no son participantes pasivos en el proceso infeccioso; La interacción entre el hongo y el medio ambiente está afectada por su variabilidad antigénica, el cambio fenotípico y la transición dimórfica. Existen diversos factores potenciales de virulencia, como la morfología celular, la actividad enzimática extracelular, el cambio fenotípico y los factores de adhesión, que favorecen la formación de biopelículas (Calderone, 2002; Castrillón *et al* 2010; Lopez, 2012).

1.1.- Descripción Taxonómica del género *Candida*.

En el cuadro 1 se muestra la taxonomía del Genero *Candida*, y en el cuadro 2 podemos observar los nombres de los estados anamorfos (estadio reproductivo asexual) y teleomorfo (estadio reproductivo sexual) de especies oportunistas de este genero.

Cuadro. 1 Taxonomía del Genero *Candida*.

Clase:	<i>Ascomycetes</i>
Subclase:	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden:	<i>Saccharomycetales</i>
Familia:	<i>Saccharomycetes</i>
Género:	<i>Pichia, Hansenula, Arxiozyma</i> (estados teleomorficos)
Especies:	Los estados anamorficos se les denomina <i>Candida</i> y los ejemplos más importantes son: <i>C. albicans, C.glabrata, C.tropicalis, C. parapsilosis, C. dubliniensis.</i>

Bonifaz A. (2010)

Cuadro. 2 Especies oportunistas de *Candida* y sus estados anamorfos y teleomorfo.

Nombre anamorfo	Nombre teleomorfo
<i>Candida albicans</i>	No descrito
<i>Candida dubliniensis</i>	No descrito
<i>Candida famata</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Candida glabrata</i>	No descrito
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii, Pichia ohmeri</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus (k. fragilis)</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaneae</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	No descrito
<i>Candida tropicalis</i>	No descrito

Bonifaz A.(2010)

1.1.1 Descripción del Género *Candida*.

El género *Candida* incluye un variado número de especies, son cerca de 200, pero solo 58 son oportunistas en animales y hombre, de 6 a 8 especies son las que comunmente presentan infecciones humanas, sobresaliendo *Candida albicans*, la que dependiendo de la topografía clínica de donde se aise, se puede encontrar entre un 40 hasta 85%. Por lo regular el género *Candida* tiene características definidas, son levaduras con ausencia de pigmentos (melánicos y carotenoides); forma celular variable, es decir las células pueden ser elípticas, globosas, cilíndricas y triangulares; tiene pared celular, membrana plasmática, mitocondria, vacuola y núcleo (figura 1); su reproducción es por gemación o blastoconidios y pueden formar pseudohifas e hifas (Con excepción de *C. glabrata*) (Bonifaz, 2010).

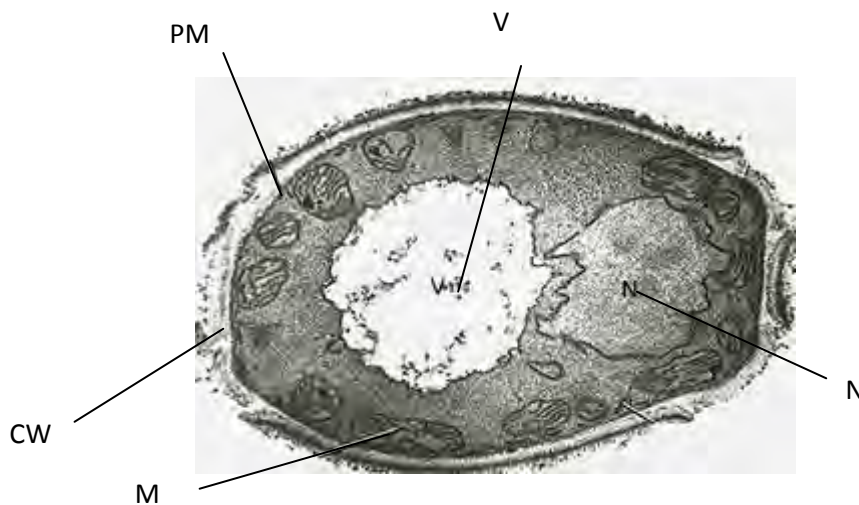


Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión. Estructura celular de *Candida* sp. CW = pared celular, PM = membrana plasmática, M = mitocondria, V = vacuola, N = núcleo. Imagen: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Castañón O. (2013).

Candida, son levaduras alargadas o ligeramente redondas de 2 - 6 x 3 - 9 μm que se reproducen por gemación (blastoconidios).

A excepción de *C. glabrata*, el resto de las especies asociadas a candidosis pueden formar pseudomicelios; *C. albicans* y *C. dubliniensis* además son formadoras de hifas. Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. tropicalis* (Castañón, 2012).

1.1.2 Composición de la pared celular.

Aproximadamente del 80-90% de la pared celular del género *Candida* son carbohidratos mientras que aproximadamente del 1 a 7% son lípidos. Entre los carbohidratos destacan tres polisacáridos (β -glucanos, N-acetil-D-glucosamina y polímeros de manosa). Los β -glucanos son polímeros de glucosa ramificados con enlaces 1,3- β y 1,6- β . El componente N-acetil-D- glucosamina no forma polímeros ramificados como los glucanos ya que estos presentan enlaces 1,4- β glucano-quitina y por último los polímeros de manosa son denominados también mananos los cuales se encuentran asociados a proteínas de membrana y representan aproximadamente el 40% total de polisacáridos en la pared celular y es también el principal componente inmunogénico que es reconocido por el sistema inmune del hospedero (Castañón 2012). Los polímeros glucano-quitina son el constituyente principal de un 47-60% de la pared celular y estos representan un esqueleto rígido que le proporciona fuertes propiedades físicas a la célula (Bonifaz, 2010).

1.1.3 Morfogénesis

La morfogénesis se refiere a la transición entre las levaduras (unicelulares) y la forma de crecimiento filamentosa del microorganismo, que puede convertirse de forma reversible a células de levadura, con crecimiento de hifa o pseudohifa (fig.2). El género *Candida* es polimórfico, ya que existe en forma de levadura (blastoconidios) o como filamentos (pseudohifa o hifa). La conversión de la forma unicelular de levadura al crecimiento filamentoso es esencial para la virulencia de *Candida*, es decir la

capacidad de invadir tejidos. Se ha comprobado que el crecimiento de forma filamentosa tiene ventajas sobre la levadura en la penetración de la célula o tejido, la hifa puede ser idónea para abrir la brecha entre las barreras tisulares, gracias a que su extremo anterior es el sitio de secreción de enzimas capaces de degradar proteínas, lípidos y otros componentes celulares, ésta facilita su infiltración en sustratos sólidos y tejidos.

En otras palabras, la morfogénesis de levadura a hifa se revierte conforme avanza la infección y quizá sea el resultado de cambios temporales en señales que el hongo recibe de su medio ambiente, por lo que es legítimo asumir que todas las formas del hongo son necesarias para mantener la infección por *Candida* (Calderone, 2002).

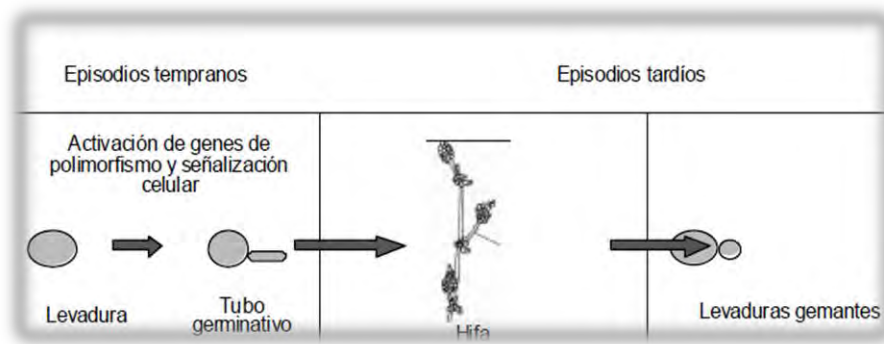


Fig. 2 Morfogénesis en *Candida* durante la infección. Imagen: Revista Mexicana de Dermatología, Castrillon R. (2005).

1.1.4 Genética molecular del polimorfismo de *Candida*.

Como ya se menciono anteriormente el género *Candida* es capaz de presentarse como levaduras o como hifas. La hifa es la forma de adaptación para la adherencia y penetración de los epitelios y células endoteliales. Para poder realizar este cambio morfológico se requiere la expresión de señales de transcripción. Entre los factores de transcripción implicados en el cambio a una morfología hifal se encuentra el gen EFG1 en *Candida* que codifica para un gen regulador transcripcional el cual esta modulado por una cascada activada por AMPc, que tiene homologación con las proteínas PHD1 y StuA, que son las proteínas que controlan la morfogénesis en *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus nidulans*, respectivamente. Los estudios bioquímicos que establecen las

rutas de transducción de señales, que activan la filamentación de *Candida*, concluyen en dos rutas principales, una es la cascada de cinasas MAPK que activan al factor Cph1 y la segunda está representada por el factor transcripcional EFG1p. Las mutantes de ambas rutas no son filamentosas y son avirulentas. (Calderone, 2002; Castrillón, 2005; Castrillón, 2010; Ramage, 2001). Los factores PHR1 y PHR2 son activados diferencialmente a diferentes rangos de pH ya que el primero es expresado en pH por arriba de 5.5 mientras que el segundo factor es expresado en medios más ácidos como el pH vaginal (4.5). Por otro lado existen factores de transcripción que regulan de manera negativa la formación de hifas, manteniendo la blastoconidia, entre estos el más importante es el factor Tup1 (Castrillón, 2005).

1.2 Descripción de las especies más importantes del género *Candida* en humanos.

El género *Candida* incluye un variado número de especies, son cerca de 200, pero solo 58 son oportunistas en animales y el hombre, y 6 a 8 especies son las que más presentan infecciones humana, sobresaliendo *C. albicans*, la que dependiendo de la topografía clínica de donde se aísle, se puede encontrar entre un 40 hasta 85%. La frecuencia de esta ha ido en disminución por diversos factores, dentro de ellos la resistencia a fármacos que otras especies de *Candida* presentan, hoy en día el grupo denominado *Candida no-albicans* está en aumento (Bonifaz, 2010). Para la identificación de las diferentes especies de *Candida* existen hoy en día medios selectivos y pruebas bioquímicas que mediante el metabolismo de carbohidratos apoyan la identificación de las diferentes especies del género *Candida*. (Cuadro 3)

1.3 Distribución de la Candidosis

La candidosis es una enfermedad cosmopolita y es la micosis que más se presenta en todo el mundo (Bonifaz, 2010).

1.4 Patogénesis de la Candidosis

Considerada como una enfermedad clásica por hongos oportunistas, la candidosis requiere de factores predisponentes, la mayoría de las veces se origina de manera endógena, casi siempre atribuible a cuatro procesos: a) desequilibrio de la flora microbiana, que favorece el incremento de levaduras de *Candida*, lo cual se puede deber a cambios de pH, ó cúmulos de nutrientes como el glucógeno, b) disminución de la flora bacteriana por antibióticos, c) por enfermedades, d) procesos que influyen en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular, por ejemplo defectos en leucocitos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos B y T (Ver cuadro 4)(Bonifaz, 2010).

Los casos exógenos siempre se inician por el ingreso al organismo de grandes cantidades de levaduras, por ejemplo por cateterismo o en casos de drogadicción, ya que se inoculan los microorganismos de manera directa al torrente circulatorio (Bonifaz,2010).

Cuadro. 3 Características Bioquímicas del Genero *Candida*.

Organismo	Auxonograma													Zimograma						
	Seudomicelio	Micelio y Clamidocoidios	Filamentación en suero a 37 °C	Actidiona	indispensable				Opcional					Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	
					Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Inositol	Celobiosa	Xylosa	Trehalosa	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	±	+	-	-
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V	-	+	-	+	+	+	+
<i>C. guilliermondi</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>C. zeylanoides</i>	+	-	-	-	+	+	+	V	-	-	-	-	-	+	V	-	-	-	-	-
<i>C. lusitanae</i>	-	-	-	-	+	+	+	V	-	-	-	+	+	+	+	V	±	V	-	-

Pruebas correspondientes para la identificación de especies del Genero *Candida*, además de las pruebas bioquímicas: Auxonograma = medio sintético con peptona y sin carbohidratos, Zimograma = medio peptonado, indicador pH, anaerobio, Actidiona + = resistente, Actidiona - = sensible, V = variable. (Bonifaz, 2012, López2012)

Cuadro 4. Formas Clínicas de la Candidosis.

Candidosis	Tipo clínico	Especie
Mucocutánea	Oral	<i>C. albicans</i>
	Genital (vaginitis, balanitis)	<i>C. albicans</i>
	Mucocutánea crónica	<i>C. krusei</i>
	Gastrointestinal	<i>C. albicans</i>
	Bronquial/ pulmonar	<i>C. albicans, C. tropicalis</i>
Cutánea	Intertrigos	
	Onicomycosis (perionixis, onicólisis y onixis)	<i>C. parapsilosis,</i>
	Del área del pañal	<i>C. albicans</i>
	Pustulosis	
	Granulomatosa	
Sistémica	Tracto urinario	
	Meningitis	<i>C. guilliermondii, C. parapsilosis</i>
	Endocarditis	<i>C. albicans</i>
	Candidemia (fungemia)	
Miscelánea	Otitis (otomicosis)	<i>C. parapsilosis</i>
	Úlceras corneales (oculomicosis)	<i>C. albicans</i>
	Endoftalmitis	
Alérgica	Candididosis (ides)	
	Eccema	
	Rinitis, alveolitis y asma	<i>C. albicans</i>
	Gastritis alérgica	

Clasificación de las presentaciones clínicas de Candidosis. Bonifaz A. (2010)

1.5 Factores de virulencia

1.5.1 Adaptación al pH.

Las diversas especies de *Candida* tienen una gran adaptación a diversos medios y sustratos; por ejemplo tienen la capacidad de soportar los cambios de pH. Esta propiedad está regida por dos genes (PHR1 Y PHR2), ambos se activan en pH neutro o ligeramente básico (cuando está en sangre o piel alcalinizada) y se inactiva PHR1 en medio ácido, activándose a su vez el segundo PHR2 (por ejemplo en vagina a pH ácido) (Bonifaz,2010).

1.5.2 Enzimas

Las enzimas son factores de virulencia en *Candida*, ya que tienen la capacidad de romper polímeros que proporcionan nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos, así como de inactivar las moléculas útiles en la defensa del organismo. Las principales enzimas extracelulares relacionadas con la patogénesis de *Candida* son las proteasas, fosfolipasas y lipasas (Bonifaz, 2010).

1.5.2.1 Proteasas

En el género *Candida* se han descrito varios miembros de una gran familia de enzimas de secreción aspártico proteasas (SAP), que han sido bastante estudiadas en estos hongos. En particular, las aspartil proteasas secretadas (Saps) son codificadas por los genes de la familia SAP, la presencia de los genes de la familia SAP en *Candida* proporciona al hongo un sistema proteolítico eficiente y flexible que puede garantizar su éxito como patógeno oportunista. Se ha sugerido que las aspartil proteasas desempeñan un papel importante en la patogénesis de *Candida*, ya que se ha demostrado *in vitro* que son capaces de hidrolizar proteínas estructurales de la célula hospedera y proteínas del sistema inmune que favorecen la colonización, la persistencia y la invasión del hongo. Además se han obtenido mutantes con varios genes SAP alterados y se ha demostrado que SAP1-3 y SAP6 son importantes en la infección oral, mientras que SAP1 y SAP2 lo son en la candidiasis vaginal. En

contraste se ha demostrado que SAP 4-6 son esenciales para la invasión en órganos y la manifestación sistémica, ya que cepas carentes de dichos genes para estas SAP's presentaban una habilidad reducida para causar daño al tejido hepático o cualquier otro órgano del parénquima, sobre todo en las cepas mutantes deficientes de SAP-6. También se ha demostrado que los genes que codifican para las SAP4-6 son expresados significativamente durante el desarrollo de la forma filamentosa. Las proteínas que comprenden la familia SAP no se limitan sólo a *Candida albicans*, ya que se ha demostrado su presencia en *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. La presencia de los genes de la familia SAP es única en las especies patógenas de *Candida* y están ausentes en la levadura no patógena *S. cerevisiae*, lo cual apoya que estas proteasas están implicadas en su virulencia (Calderone, 2002; Castrillon, 2005).

Las SAP tienen funciones especializadas durante el proceso infeccioso e incluyen la digestión de moléculas proteínicas para adquirir nutrientes, digerir o distorsionar las membranas del huésped, facilitar la adhesión, la invasión a tejidos y la digestión de moléculas del sistema inmunitario del huésped para evitar o resistir el ataque antimicrobiano de éste (Castrillon, 2010; Ramage, 2005).

Con estos estudios se demostró que las SAP1 a SAP3 son las proteasas principales expresadas durante las infecciones superficiales, en contraste con las SAP1 a SAP4, que se expresan sobre todo en la enfermedad sistémica (Castrillon, 2010).

Posibles blancos de las proteasas de *Candida* a nivel más básico, un papel de las SAP de *Candida* es la digestión de proteínas para proporcionar nitrógeno a las células; sin embargo, las Saps también pueden haberse adaptado y participar en funciones de virulencia. Por ejemplo, podrían contribuir a la adhesión en tejidos del huésped y a la invasión por degradación o distorsión de las estructuras en la superficie de las células del huésped o por destrucción de moléculas del sistema inmunitario del huésped para evitar o resistir el ataque antimicrobiano (Calderone, 2002; Mandal *et al* 2011).

1.5.2.2 Fosfolipasas

Se han identificado cuatro fosfolipasas (PLA, PLB, PLC y PLD), de las cuales sólo la PLB1 ha demostrado ser necesaria para la virulencia en modelo animal de candidosis. La PLB1A es una glucoproteína de 84 kDa, el gen PLB1 se encuentra localizado en el cromosoma 6 y presenta una similitud en la secuencia de aminoácidos de 45% comparada con las fosfolipasas de *S. cerevisiae*, la enzima PLB1A presenta actividad de hidrolasa y lisofosfolipasatransacilasa. La transcripción del gen PLB1A es detectado en ambas formas celulares (blastospora e hifa) pero se secreta y detecta principalmente en la punta de las hifas durante la invasión a los tejidos, esto se ve reforzado por medio de la experimentación con una cepa mutante de *C. albicans* con la eliminación de este gen, observando una reducción de su nivel de virulencia hasta en un 60% comparada con las células silvestres (Calderone, 2002; Castrillón, 2005).

1.5.2.3 Lipasas

Las lipasas secretadas por *Candida albicans* se codifican por una familia de genes con al menos 10 miembros (LIP1-LIP10). El patrón de expresión se ha investigado en infecciones experimentales y en pacientes que sufren candidiasis oral. Se ha demostrado que la expresión de esos genes depende del estado de infección, más que de la localización del órgano (Castrillón 2005).

1.5.3 Adhesinas

Un atributo del género *Candida* es que correlaciona de forma positiva su patogenicidad con la capacidad adherente a las células del huésped. Las cepas adherentes de *Candida albicans* son más patógenas que las que tienen fenotipo menos adherente. Una adhesina se define como una biomolécula que promueve la adherencia de *C. albicans* a las células del huésped o a sus ligandos específicos. Se han descrito proteínas de *C. albicans* que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV. Existen diferentes tipos de adhesinas en *Candida*, como Als, Hwp1p, Int1p y Mnt1p (Calderone,2002;Castrillón,2005).

1.5.3.1 Agglutinin-Like Sequence (Als)

Los genes de la familia Als de *Candida* codifican glucoproteínas grandes de la superficie celular que están relacionadas con el proceso de adhesión a las células del huésped ya que se ha encontrado que los genes Als 3 y Als 8 únicamente son expresados durante el crecimiento micelial. Los genes Als también se encuentran en otras especies de *Candida* que han sido aisladas de muestras clínicas. Desde su caracterización inicial se notó que el producto traducido del gen Als1 comparte una secuencia con la glucoproteína de adhesión a superficies celulares llamada α -aglutinina, codificada por *Saccharomyces cerevisiae* (AGb1). Esta molécula se requiere para el reconocimiento célula-célula (Calderone, 2002; Castrillón, 2005).

1.5.3.2 Hyphal and germ tube specific gene (Hwp1p)

El gen Hwp1p codifica una manoproteína de la superficie externa de la célula hifal. El carboxilo terminal se integra de manera covalente con el β -glucano de la pared celular. La proteína codificada por este gen (Hwp1p) contiene un grupo amino terminal que sirve como sustrato de las transglutaminasas mamíferas, encontrando una enzima en tejido epitelial humano que reconoce dicha proteína provocando la unión de la hifa de *Candida* a las células epiteliales. Esta enzima humana es capaz de unirse con pequeñas proteínas ricas en prolina como la proteína N-terminal de *C. albicans*. Estudios realizados en células mutantes con una delección en este gen Hwp1p son menos adherentes en epitelio bucal, además de presentar menor virulencia en modelos murinos (Calderone, 2002; Castrillón, 2005).

1.5.3.3 Integrin Like protein (Int1p)

La proteína Int1p es una proteína transmembranal de *Candida* ha demostrado su importancia en la adhesión y morfogénesis de este hongo ya que se une a varios ligandos de las proteínas de la matriz extracelular, que incluyen fibronectina, laminina y colágenas tipo I y IV. Las cepas que tienen delección en los genes Int1 son menos virulentas o se adhieren con más lentitud a las líneas celulares epiteliales. También tienen deficiencias en la filamentación en su crecimiento en leche-tween y agar Spider,

por lo tanto, el gen Int1p juega un papel importante en la adherencia y filamentación de *Candida* (Calderone, 2002, Castrillón, 2005).

1.5.3.4 α -1,2 manosil tranferasa (Mnt1p)

Las cepas de *Candida* que tienen delección en el gen Mnt1 son menos capaces de adherirse *in vitro* y son avirulentas. La proteína que codifica a este gen Mnt1p es una proteína de membrana tipo II que se requiere para la manosilación tanto O- y N- en el hongo. La manana es el principal constituyente de la pared celular (Calderone, 2002; Castrillón, 2005).

1.5.4 Transición morfológica

Es la capacidad que tienen estas levaduras de cambiar morfológicamente de blastoconidio a pseudohifa e hifa. Este cambio es estimulado por las condiciones ambientales y se considera uno de los factores de patogenicidad o virulencia más significativos. Hay que enfatizar que esta propiedad hace que dichas levaduras se comporten como hongos dimórficos, siendo las formas de pseudofilamentos y filamentos las que marcan infección. Este proceso tiene excepción en *C. glabrata* que no sufre cambios morfológicos por lo que se considera levadura monomorfica (Bonifaz, 2010).

1.5.5 Switching fenotípico

Entendida como la capacidad que tienen estas levaduras de hacer grandes cambios fenotípicos como son diferencias en la macromorfología colonial (colonias lisas, rugosas), cambios en la antigenicidad, como aumento o disminución en la producción de enzimas y toxinas. Este fenómeno de cambio fenotípico, se da a manera de estrategia del agente frente a las diferentes células que ataca y medios que soporta (Bonifaz, 2010).

1.5.6 Biopelículas

Hablando de hongos las especies de *Candida* se reconocen como los principales agentes de infecciones adquiridas en el hospital, son el tercer o cuarto patógeno aislado de sangre sobrepasando la frecuencia de los bacilos gram negativos. Su aparición como patógeno nosocomial es importante, ya que es un factor de riesgo asociado con los procedimientos médicos modernos, sobre todo con el uso de fármacos inmunosupresores o citotóxicos, de antibióticos potentes que suprimen la flora bacteriana normal y de los dispositivos implantados de varias clases (Castrillón, 2005; Castrillón, 2010). La percepción de los microorganismos como formas unicelulares de vida se basa en el modo de crecimiento como cultivo puro; sin embargo, la mayor parte de los microbios persisten unidos a las superficies dentro de un ecosistema estructurado, como biopelículas y no como organismos libres en flotación (planctónico) (Douglas, 2002; Ramage, 2013).

Las biopelículas son comunidades microbianas que constituyen la forma más exitosa de colonización entre los microorganismos, son obicuas en la naturaleza y responsables de muchas enfermedades. Son consideradas comunidades de microorganismos que crecen embebidas en una matriz de exopolisacárido autoproducido y están adheridas a una superficie inerte o a un tejido vivo (Castrillón, 2010). Se tienen registros fósiles de la formación de biopelículas desde hace aproximadamente 3.2 mil millones de años, por lo que se considera que esta organización celular representa el modo de crecimiento que permite a las células sobrevivir en ambientes hostiles, dispersarse para formar nuevos nichos y les otorga ventajas significativas de protección frente a fluctuaciones del ambiente como la humedad, temperatura y pH, así como la concentración de nutrientes y la eliminación de desechos (Pranab, 2004; Ramage, *et al* 2001; Ramage, *et al* 2005).

1.5.6.1 Heterogeneidad de las biopelículas

El estudio de las biopelículas ha demostrado que se componen de 97% de agua, el resto son células microbianas y productos derivados de éstas. Se ha reportado que son estructuras heterogéneas con tres patrones químicos, que corresponden a diferencias en gradientes de concentraciones desde el exterior al interior de la biopelícula. El patrón de sustrato metabólico determina mayor concentración en el exterior y menor en el interior, el patrón de producto metabólico es inverso al anterior y el patrón de intermediarios metabólicos muestra mayor concentración entre la parte limítrofe de la biopelícula en la fase acuosa. Estos patrones traen como consecuencia que dentro de estas estructuras se establezcan diferencias de gradientes de pH y oxigenación, lo que permite que se instalen poblaciones microbianas aerobias, anaerobias o facultativas dentro de los diferentes estratos de la biopelícula, así como poblaciones microbianas que pueden considerarse para entender las diferencias de susceptibilidad al tratamiento con antibióticos, ya que es diferente la respuesta a las formas libres (planctónicas) que a las adheridas (sésiles) (Castrillón 2005, Ramage *et al* 2005). En consecuencia, las principales características de las biopelículas son: adherencia, heterogeneidad, diferentes microambientes (pH, oxígeno, concentración de iones, carbono, nitrógeno, etcétera), sistema circulatorio primitivo (canales de agua), inmunoresistencia, agentes antimicrobianos, biocidas y autoinducción (*Quórum sensing*) (Ramage *et al* 2005).

1.5.6.2 Desarrollo y arquitectura de biopelículas de *Candida*.

Las biopelículas de *Candida* adquieren mayor importancia en el contexto clínico ya que estas comunidades se asocian con una mayor capacidad para expresar resistencia contra la mayoría de los agentes anti-microbianos. Diferentes estudios han demostrado que la arquitectura de las biopelículas de *Candida* se ve afectada por la superficie en la que se desarrolla, por ejemplo las biopelículas formadas sobre las superficies planas hidrófobas de elastómero de silicona o cloruro de polivinilo (PVC), tienen una estructura diferente bifásica compuesta por una capa adherente de células cubiertas por blastosporas e hifas incrustadas dentro de la capa de matriz extracelular

(ECM) (Franca, 2011). Por el contrario las biopelículas de *Candida* formadas en las superficies irregulares en prótesis de polimetilmetacrilato aparecen como densas células que crecen a lo largo de los bordes en relieve de las superficies rugosas en la fase temprana de desarrollo con un crecimiento excesivo de células y una matriz extracelular madura. Recientemente estudios realizados con EDTA en matriz extracelular de las biopelículas de *Candida* demostraron que la (ECM) estaba compuesta por proteínas, carbohidratos y ADN, y que la composición de estos compuestos varía dependiendo la etapa de desarrollo de la biopelícula, los hidratos de carbono fue significativamente menor en (ECM) las biopelículas se acompañan con una abundante síntesis de carbohidratos en (ECM) hasta la fase temprana en comparación con (ECM) en la fase madura. Estas investigaciones también identificaron dos grupos de genes que codifican para biosíntesis de aminoácidos y mostraron que Gcn4p (un regulador del metabolismo de aminoácidos) se requiere para el crecimiento de la biopelícula (Franca, 2011; Pranab, 2004).

La formación de biopelículas se manifiesta en tres fases: temprana (0 a 11 horas), intermedia (12 a 30 horas) y madura (38 a 72 horas). La estructura detallada de las biopelículas, después de 48 horas de incubación, consiste en una densa red de levaduras, hifas y pseudohifas. La mezcla de levaduras, hifas y material de matriz no se ha visto cuando el organismo crece en medio líquido o en una superficie de agar, lo que sugiere que la morfogénesis se dispara cuando un organismo hace contacto con la superficie y que las células de la capa basal pueden tener un papel importante en el anclaje de la biopelícula a la superficie (Castrillón, 2005).

1.5.6.3 Fases de desarrollo de biopelículas

La formación de las biopelículas ocurre como un proceso continuo de acuerdo con varias fases de desarrollo que son: a) acondicionamiento, b) adhesión, c) síntesis de matriz extracelular, d) maduración y e) dispersión, lo que lleva a la formación de una estructura uniforme en forma de depósitos homogéneos y acumulaciones viscosas celulares rodeados de una matriz de polímeros con canales abiertos para el movimiento de agua (fig 3) (Ramage *et al* 2001; Ramage *et al* 2005).

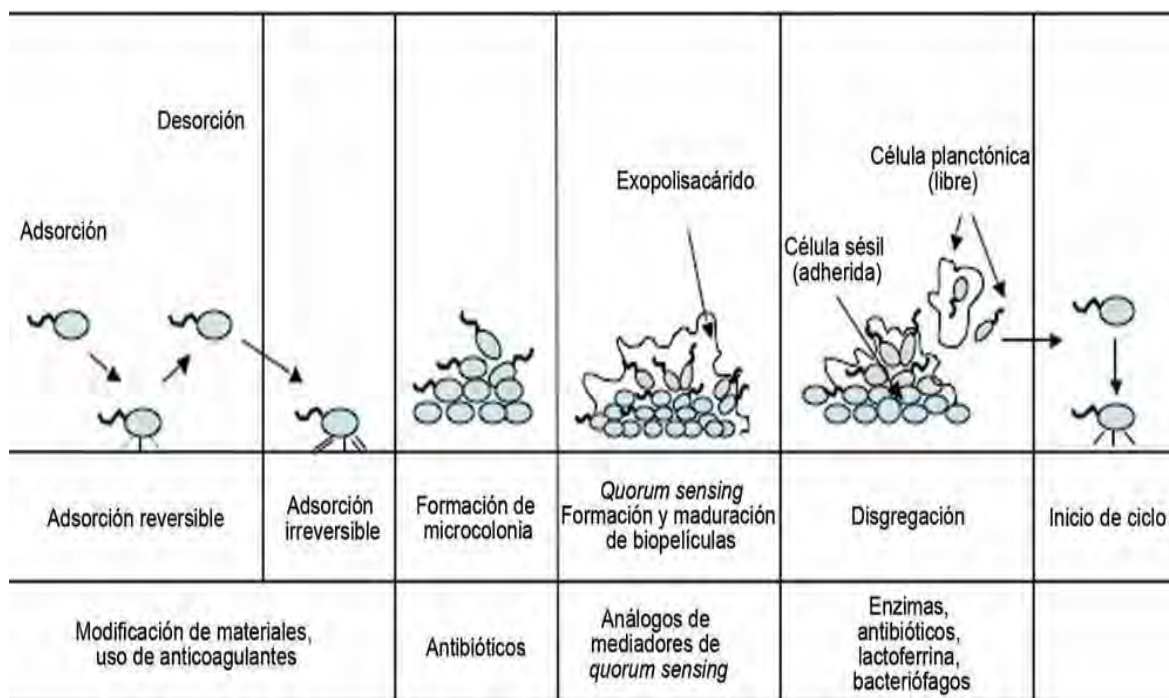


Fig. 3 fases de formación de biopelículas y estrategias de dispersión, Revista Mexicana de Dermatología Castrillón (2010).

1.5.6.3.1 Fase de acondicionamiento

Los componentes orgánicos del medio ambiente o de los tejidos forman una cubierta que neutraliza la carga excesiva de la superficie (que previene la aproximación entre células bacterianas o de hongos) (Castrillón, 2005).

1.5.6.3.2 Fase de adhesión

Los microorganismos libres (o planctónicos) forman una capa que se adsorbe a la superficie por periodos cortos mediante fuerzas de atracción electrostáticas y se libera de ésta por adsorción reversible. Los microorganismos en suspensión se agregan y ocurre la adhesión de células iguales o diferentes (co-agregación) a la superficie condicionada, este proceso es favorecido por varios componentes bacterianos como los pili, flagelos y polímeros superficiales como el lipopolisacárido en bacterias gram negativas y el ácido micólico en las gram positivas, que participan en este proceso venciendo las fuerzas de repulsión. La expresión de estas estructuras microbianas puede cambiar dependiendo del ambiente en que se encuentren y, por tanto, modificar la fase de formación de la biopelícula (Carvalho *et al* 2010; Douglas, 2002; Douglas, 2003). Las propiedades físico-químicas de la superficie pueden ejercer gran influencia en el grado y extensión de la adhesión, los gérmenes se adhieren más rápidamente a superficies hidrófobas, no polarizadas como el teflón y plásticos, en comparación con metales hidrofílicos como el vidrio o el metal. Una vez que se logra la adhesión irreversible, las células se dividen y colonizan la superficie y cuando la concentración local de señales químicas producidas por el metabolismo microbiano alcanza un nivel umbral, sugiere que la población microbiana ha alcanzado una densidad mínima, esto condiciona el inicio de cambios fenotípicos en la comunidad (Ramage *et al* 2001; Ramage *et al* 2005).

1.5.6.3.3 Síntesis de matriz.

Al proceso en el que una célula microbiana percibe la proximidad de otras células y genera señales químicas que corresponden con metabolitos secundarios, se le conoce como *Quorum sensing*; este hecho trae como consecuencia la autoinducción en la síntesis de la matriz extracelular o exopolisacárido y se logra así la maduración (Castrillón, 2005; Castrillón, 2010).

1.5.6.3.4 Fase de maduración.

La consecuente formación tridimensional de la Biopelícula, genera canales de agua que le sirven como microcirculación a la colonia. Cuando crece lo suficiente, el microorganismo responde en masa y se comporta como grupo (Castrillón, 2005, Ramage *et al* 2001, Ramage *et al* 2005).

1.5.6.3.5. Fase de dispersión

Finalmente, después de la maduración de la biopelícula, ocurre la dispersión por células aisladas o en conglomerados que colonizan nuevas superficies y se inicia un nuevo ciclo de formación de biopelículas. Existen diferencias en las características de las células que se desprenden, ya que las células sésiles (adheridas) pueden conservar la funcionalidad de la biopelícula como lo es la resistencia a antibióticos, en cambio, las células aisladas pueden tener el fenotipo planctónico (libre) y ser susceptible a los mecanismos de defensa del hospedero (Douglas,2002, Douglas,2003).

1.6 Aspectos inmunológicos

1.6.1 Respuesta inmunológica ante la presencia de *Candida*.

Los hongos del género *Candida* son integrantes normales de la biota corporal humana, su homeostasis es compleja y depende de muchos factores; entre ellos, la inmunidad mediada por células desempeña un papel destacado ya que la asociación “linfocitos CD4-macrófago” ejerce un poder de vigilancia y su déficit redundante en una mayor facilidad de *Candida* para adherirse a las células epiteliales. La frecuencia y gravedad de las infecciones dependen, sobre todo, del nivel de células CD4 en sangre. Las candidosis son evidentes en enfermos con recuentos inferiores a 400 linfocitos CD4/ μ l. Debe tenerse en cuenta que las manananas y las mananoproteínas de la pared celular de *Candida* son activadoras de las células CD8 y deprimen la actividad de las CD4, potenciado por el efecto inmunodepresor del HIV. Por esta razón, en pacientes VIH positivos, se ha propuesto la administración de tratamientos antifúngicos durante lapsos prolongados a fin de reducir el nivel de antígenos libres en sangre y tejidos, evitando un deterioro mayor de la inmunidad. La preservación de la función

fagocitaria de los neutrófilos en los pacientes HIV positivos, así como la buena producción de anticuerpos contra el antígeno de 47 KDa de *Candida*, reducen la frecuencia de candidiasis diseminadas en condiciones habituales (Castañón, 2012).

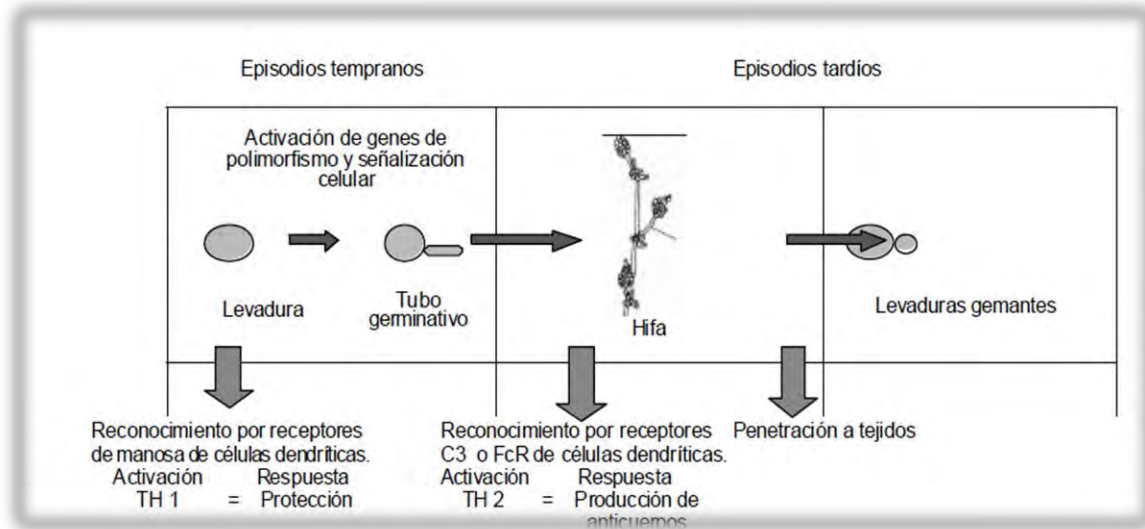


Fig. 4 Morfogénesis en *Candida* durante la infección (Castrillón, 2010).

1.6.2 Evasión del sistema inmunitario

Candida posee adhesinas (mananoproteínas) que favorecen la unión a las células huésped por medio de receptores análogos de integrinas (C3R), además posee dos proteínas que reconocen residuos de fucosa en células epiteliales intestinales. Las células endoteliales invadidas por *Candida* responden produciendo citocinas y quimiocinas que atraen PMN que fagocitan la levadura. Si es fagocitada por células dendríticas en la fase de hifa, escapa del fagosoma por medio de catalasas y puede crecer en el citoplasma e inhibir la producción de IL-12, en tanto que estimula la producción de IL-4. En caso de que la célula sea fagocitada como levadura, se activan las células dendríticas, las cuales producirán IL-12 y activarán el proceso de inmunidad celular que se inicia con los Th-1. Esto es muy importante ya que un predominio de la respuesta al desarrollo de células Th1 favorece una respuesta protectora y resistencia a la enfermedad, una respuesta al predominio Th2 se asocia a susceptibilidad (fig 4) (Castrillón, 2010).

1.7 Importancia de las biopelículas en salud pública

Las especies de *Candida* se encuentran con frecuencia en la microbiota normal de los seres humanos, lo que facilita su encuentro con biomateriales implantados y de superficies de acogida. Los dispositivos como prótesis, implantes, tubos endotraqueales, marcapasos y varios tipos de catéteres, han mostrado que facilitan la colonización y la formación de biopelículas de *Candida albicans* la cual sigue siendo la mayor de las especies de hongos comúnmente asociada con la formación de biopelícula y con el aumento de las infecciones en dispositivos de implantes médicos, sobre todo en las poblaciones con las defensas del huésped comprometidas. Implica un reto para la salud pública ya que *Cándida albicans* es la tercera causa con mayor grado de infecciones asociadas a catéteres, lo que representa el segundo microorganismo con mayor grado de colonización a la tasa de infección y el mayor en general de mortalidad. La formación de biopelículas de *Cándida* lleva importantes repercusiones clínicas debido a una mayor resistencia a la terapia antifúngica y la capacidad de las células dentro de las biopelículas para resistir las defensas del huésped, además de que, puede servir como un depósito de futuras infecciones. El efecto neto es que las biopelículas de *Cándida* repercuten negativamente en la salud de los pacientes con mayor frecuencia y gravedad además de los gastos económicos (Ramage *et al* 2001, Ramage *et al* 2005, Ramage, *et al* 2013). La importancia reciente de las biopelículas como fuente de infecciones se refleja en las estadísticas: para el año 2008 los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos y de Europa estimaron que más del 60% de las infecciones microbianas involucran a las biopelículas (Ibarra *et al* 2012). Para el año 2008 se reportaron en Estados Unidos 99,000 muertes al año y 1.7 millones de procesos infecciosos asociados; y en la Comunidad Europea se informaron 50,000 muertes al año y 3 millones de pacientes con infecciones asociadas del cual el 32% se asocia a vías urinarias, 22% en diversos sitios infectados, 15% en neumonías y 14% en septicemias. En México aún no existen reportes que permitan esta asociación. Se ha demostrado que una fuente de infección importante son las nosocomiales, derivadas de catéteres infectados por biopelículas (Castrillón, 2010).

1.8 Epidemiología.

Las candidiasis superficiales son frecuentes, de fácil tratamiento y no atentan contra la vida del paciente, en tanto que las sistémicas de evolución aguda o crónica son generalmente graves. La mayoría de estas infecciones se originan de un foco endógeno (tracto gastrointestinal o respiratorio) aunque no se descarta la participación de fuentes externas (Castañón, 2012).

La distribución geográfica de esta micosis es universal y más de 70 % de ellas son producidas por *C. albicans* observándose un porcentaje mayor por el serotipo B (Silva, 2003). Los casos de candidiasis sistémica están relacionados a pacientes con severas deficiencias en su sistema inmune. *C. krusei* y *C. glabrata* son habitualmente resistentes a los compuestos azólicos y su hallazgo como agentes infecciosos involucrados en enfermedades sistémicas intrahospitalarias ha aumentado en los últimos años (Castrillón, 2001; Castrillón, 2005; Ramage *et al* 2013).

En México la candidosis urogenital es una entidad nosológica que afecta principalmente al sexo femenino. En 2009 tuvo una razón mujer- hombre de 31.5 y se enfocó en el grupo etario de 25 a 44 años (Grafico. 2) (Silva *et al* 2008). Presentó una tasa de incidencia por cien mil habitantes a nivel nacional de 269.1, y las entidades más afectadas por este padecimiento fueron Nayarit con 504.3 casos por cien mil habitantes, seguido de Veracruz (503.8) y Zacatecas (483.5) (Grafico. 3); la menos afectada fue el DF con una tasa anual de incidencia de 98.3 por cien mil habitantes. La candidiasis urogenital tuvo un patrón fluctuante de presentación durante todo el 2009 entrando y saliendo del área de éxito y seguridad del canal endémico sin llegar a presentarse brotes epidémicos. Durante la última década presentó un aumento de la incidencia durante el período 2000 - 2005, que disminuyó posteriormente y hubo un decremento de la tasa de incidencia del 2002 (pico máximo de los últimos 10 años) del 24.1%. (Grafico. 1)(SINAVE/DGE/SALUD, 2009)(Ramage, *et al* 2005).

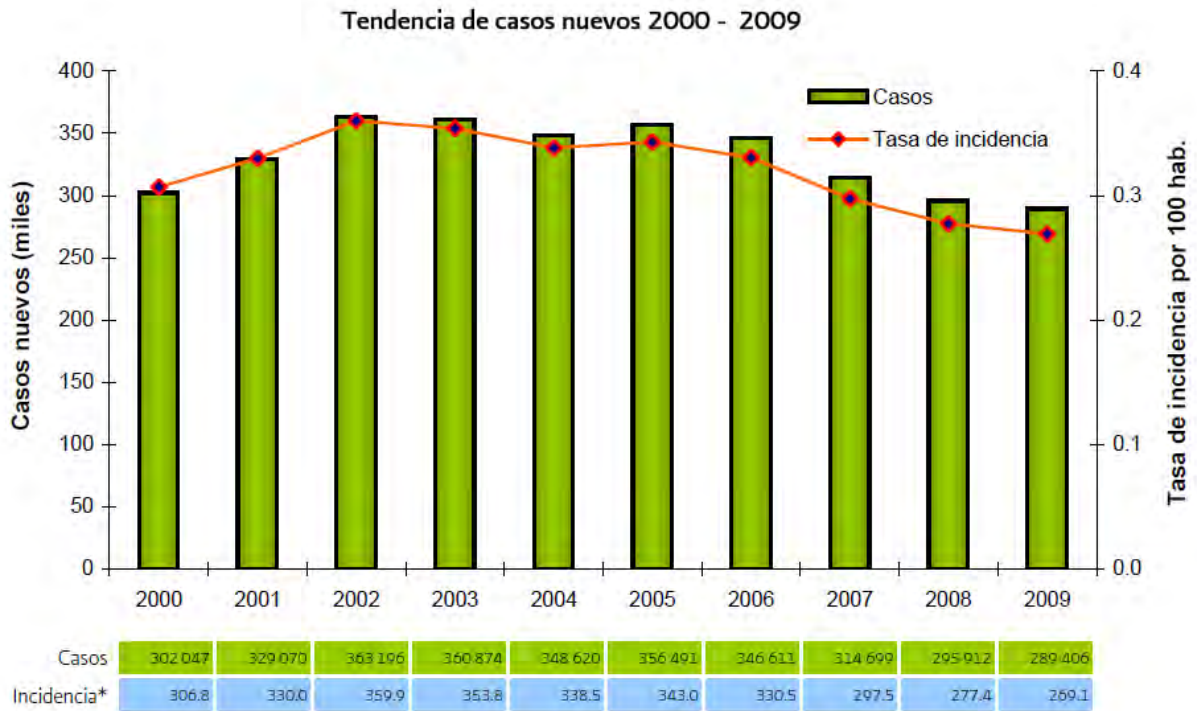


Grafico 1. * Tasa de incidencia por 100 000 habitantes. Nota: Relación entre la tasa de incidencia y casos nuevos de Candidiasis Urogenital por cada 100000 habitantes.
FUENTE: SINAVE/DGE/Secretaría de Salud/México 2009.

No. de casos nuevos según grupos de edad y sexo, 2009

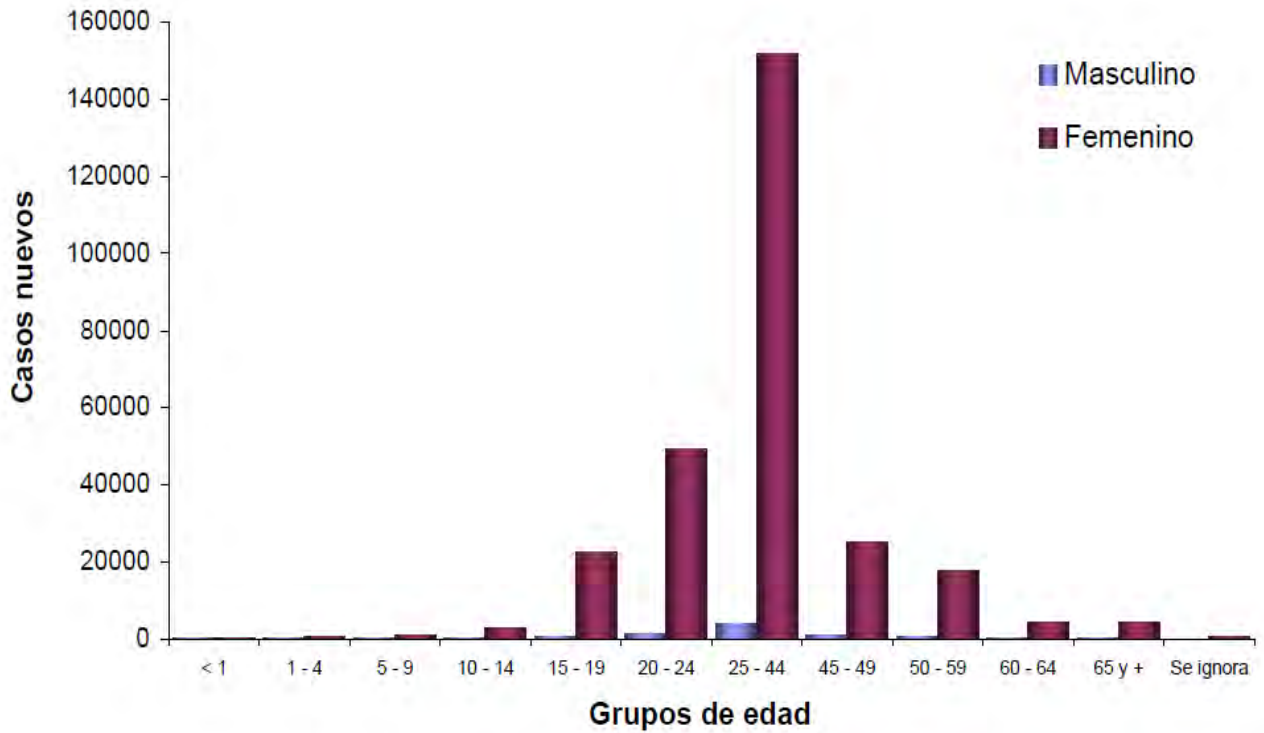


Grafico 2. Nota: Relación entre los casos nuevos según la edad y sexo de Candidiasis Urogenital por cada 100000 habitantes. FUENTE: SINAVE/DGE/Secretaría de Salud/México 2009.

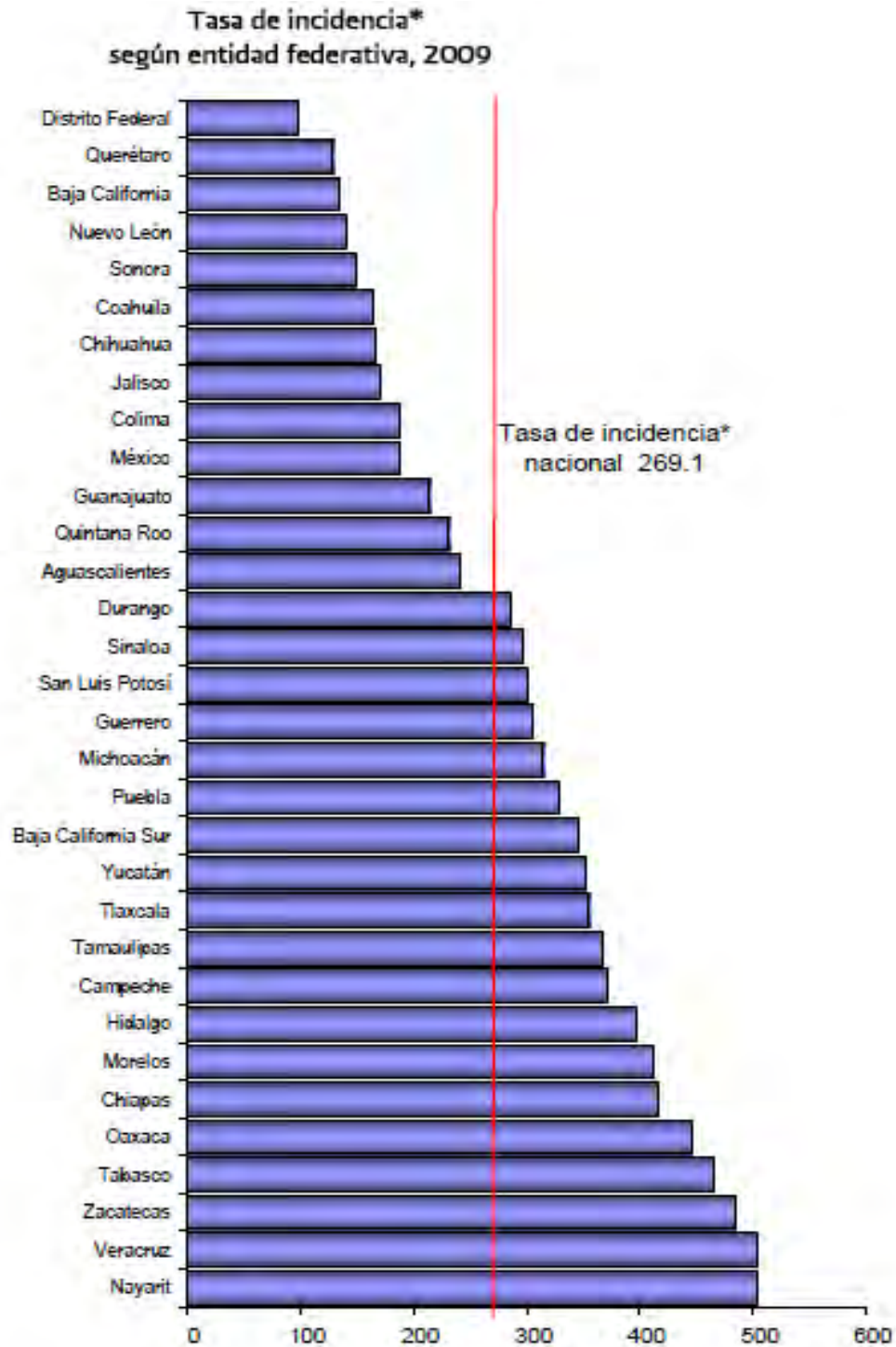


Grafico 3. Nota: relación entre la incidencia y la entidad federativa de Candidiasis Urogenital por cada 100000 habitantes. FUENTE: SINAVE/DGE/Secretaría de Salud/México 2009.

Los casos registrados de candidosis muestran que el sexo es indistinto, a excepción de la candidosis urogenital que tiene mayor incidencia en el sexo femenino (Grafico. 2). La edad y raza de las personas son factores que, según la clínica, no influyen en la presentación de la micosis, la cual realmente dependerá del factor de inmunocompromiso asociado; sin embargo, por lo que respecta a la ocupación aunque no es un factor de importancia, se considera que algunas actividades de las personas pueden favorecer la infección como: panaderos, vendedores de pescado (SINAVE/DGE/SALUD, 2009; Castañón, 2012).

1.9 Métodos de estudio para formación de películas

La evolución de los métodos analíticos de los estudios de imagen ha permitido diseñar diferentes estrategias para el estudio de las biopelículas, entre las cuales se encuentran varios modelos específicos como: los catéteres en disco, tira de acrílico, microplaca de titulación y biopelículas profundidas, entre otros. Con estos modelos se analiza la cuantificación y crecimiento del microorganismo mediante la evaluación de: peso seco, incorporación de isótopos radioactivos, reducción de sal de tetrazolio XTT, bioluminiscencia ATP, ensayos de lectinas ligadas a enzimas y el sistema LIVE/DEAD (Castañón, 2012, Douglas, 2002, Elke, *et al* 2008). Todos estos sistemas se realizan en condiciones estáticas de incubación; sin embargo, el método de biopelículas profundidas en fermentador permite el control preciso de la velocidad de crecimiento. La formación de biopelículas de *Candida* se distingue por la adhesión inicial de las células de levadura, seguida por la germinación y formación de microcolonias, filamentación, desarrollo de monocapa, proliferación y maduración.

Estos ensayos se acompañan de estudios de ultraestructura microscópica, como la electrónica de barrido, láser confocal que permite ver en tercera dimensión la formación de biopelículas, lo que ha permitido la descripción de diferentes modelos de organización entre ellos (Ramage, *et al* 2001). Recientemente se desarrollaron estudios *in vivo* para la detección temprana de infección en tejidos e implantes biomédicos (Castañón, 2012). La mayoría de de estos sistemas modelo se enfocan en la cuantificación de la biomasa de biopelícula, la cual se realiza mediante

recubrimiento convencional, que es un trabajo intensivo y lento. En los últimos años, varios ensayos de sustitución para la cuantificación de biopelículas en placas de microtitulación se han descrito los cuales se pueden clasificar dependiendo el tipo de biomasa de la biopelícula (basado en la cuantificación de la matriz y células vivas y muertas), ensayos de viabilidad (sobre la base de la cuantificación de células viables) y ensayos de cuantificación de la matriz (en base a la tinción específica de componentes de la matriz) (Elke, *et al* 2008).

1.9.1 Cristal violeta (CV)

CV tinción que se describe primero por Christensen *et al* (1985) y desde entonces ha sido modificado para aumentar su precisión y para permitir la cuantificación de biomasa de biopelícula en todo el pozo. CV es un colorante básico, que se une a moléculas de la superficie de carga negativa y los polisacáridos en la matriz extracelular, dado que hay células vivas y muertas, la matriz se tiñen por CV, que es poco adecuado para evaluar la viabilidad de las células del biopelícula (Elke, *et al* 2008, Ruzicka, *et al* 2010).

1.9.2 Alamar blue (AB)

El uso del indicador azul de Alamar, en comparación con otros métodos de sensibilidad, puede tener muchas ventajas potenciales. Por ejemplo, los resultados de AB se pueden leer visualmente, espectrofluorométricamente o espectrofotométricamente, su reducción es dependiente del metabolismo activo, es sensible y de alto rendimiento, su uso es rentable y AB carece de toxicidad para los seres humanos y microorganismos. El ensayo AB fue recientemente estandarizado para biopelículas de múltiples cepas de *Staphylococcus epidermidis*, y tuvo buena correlación excelente con XTT. Actualmente el colegio Nacional de Cultivos de levadura está utilizando aislados clínicos para determinar la idoneidad del ensayo de AB para las pruebas de sensibilidad de biopelículas en *C. albicans* (Kimberly, 2007).

1.9.3 Colorante fluorogénico Syto 9

El colorante fluorogénico Syto9 es un ácido nucleico, que se difunde pasivamente a través de las membranas celulares y se une al ADN de las células, tanto viables como muertas. Como el ADN conforma una parte sustancial de la matriz extracelular, esta tinción proporcionará información sobre la biomasa de biopelícula total. Syto9 se ha utilizado anteriormente en la microscopía focal de barrido láser (CLSM) para estudios de la composición y la morfología de la biopelícula. Este colorante se ha utilizado también para la cuantificación rutinaria de la biomasa de biopelícula bacteriana y de levadura (Elke, et al 2008).

1.9.4 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino carbonil)]-2H-tetrazolio hidróxido (XTT).

Para discriminar entre células vivas y muertas, las técnicas de cuantificación se han basado en la actividad metabólica de las células viables. Diversas metodologías de viabilidad implican el uso de sales de tetrazolio, incluyendo 5-ciano-2,3-tetrazolio cloruro de ditolilo (CTC) y 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino carbonil)]-2H-tetrazolio hidróxido (XTT). El ensayo XTT se basa en la reducción del colorante XTT a una forma soluble en agua. La absorbancia del sobrenadante de las células es proporcional al número de células metabólicamente activas. El ensayo XTT se ha utilizado ampliamente para la cuantificación de células viables en los cultivos planctónicos y para la cuantificación de bacterias y levaduras (Elke, et al 2008).

1.9.5 Resazurina

Otro ensayo de viabilidad se basa en la reducción de la resazurina por las células metabólicamente activas. Este es un compuesto azul que se puede reducir a rosa resorufina, que es fluorescente. Aunque este medio de contraste, también conocido como Alamar Blue, se utiliza principalmente en los ensayos de viabilidad de células de mamífero, también se ha aplicado extensamente en las pruebas de susceptibilidad de hongos, y bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus-mutans* (Elke, et al 2008).

1.9.6 Diacetato de fluoresceína (FDA)

Células microbianas viables también son capaces de convertir el colorante FDA en fluoresceína amarillo, altamente fluorescente por esterasas no específicas intra y extracelular. La FDA ha sido utilizado para medir la actividad microbiana total en el suelo, así como para la cuantificación de la biomasa de biopelícula (Elke, *et al* 2008).

1.9.7 1,9-dimetil azul de metileno (DMMB)

La cuantificación de la matriz, un componente esencial de la biopelícula, también es de interés. El colorante DMMB, originalmente aplicada para la cuantificación de los glicosaminoglicanos sulfatados en cultivos chondrocyt, también se ha utilizado para cuantificar la matriz de la biopelícula de *Staphylococcus aureus*. DMMB forma un producto de complejos insolubles con polisacáridos sulfatados en la matriz de la biopelícula. La cantidad de colorante liberado por la adición de una solución de descomplejación se mide espectrofotométricamente y refleja la cantidad de polisacáridos sulfatados presentes en la matriz de la biopelícula (Elke, *et al* 2008).

1.10 Resistencia a antibióticos

La resistencia clínica se define como la persistencia o progresión de una infección, a pesar del tratamiento antimicrobiano apropiado. La resistencia a antifúngicos por biopelículas de *Candida* se demostró por primera vez en 1995, en ensayos de catéteres en disco (Castrillón, 2010). Aunque las biopelículas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* son claramente resistentes a los nuevos triazoles (voriconazol y ravuconazol), hay reportes de actividad antibiopelículas de formulaciones con lípidos de anfotericina B y dos equinocandinas, la micafungina y la caspofungina (inhibe la síntesis de β 1, 3 glucano, principal componente estructural de las paredes celulares de *Candida*). Se han propuesto cuatro posibles mecanismos de resistencia de las biopelículas a los fármacos y son: 1) Penetración restringida a través de la matriz de la biopelícula. Los antibióticos pueden difundir a través de la matriz de la biopelícula, para inactivar las células atrapadas; sin embargo, este exopolisacárido se comporta como una barrera física para estas moléculas modificando su transporte al interior,

que ocasiona la resistencia hacia estos antimicrobianos, así como a moléculas de elevado peso molecular con propiedades citotóxicas como lisozima y complemento. Por otra parte, los exopolisacáridos son generalmente aniónicos y pueden reaccionar o adsorber los antibióticos cargados positivamente como los aminoglucósidos restringiendo su permeabilidad, este hecho se ha descrito en biopelículas de *P. aeruginosa*, que demuestra que las fluoroquinolonas penetran rápidamente y los aminoglucósidos lentamente. 2) Neutralización de antibióticos por productos microbianos. La difusión retardada disminuye la entrada del antibiótico a la biopelícula, lo que permite la destrucción del antibiótico por enzimas como la *β*-lactamasa descrito en *Pseudomonas aeruginosa*. 3) Tasa metabólica de crecimiento diferenciado y cambio de fenotipo. Las células dentro de las biopelículas se encuentran bajo un gradiente de nutrientes que resulta en células metabólicamente activas con acceso a estos nutrientes en la capa superficial o en la periferia de la biopelícula, en contraste, se encuentran células metabólicamente inactivas dentro de su interior. Estas zonas diferenciadas de actividad metabólica corresponden a diferentes zonas de sensibilidad antimicrobiana. Muchos antibióticos son activos sobre células en crecimiento, así que las células en el interior podrían estar protegidas de la acción citotóxica de estas sustancias. La penicilina y ampicilina no atacan células que no estén en crecimiento y su acción es proporcional a su actividad; otros antibióticos como los β -lactámicos, cefalosporinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas atacan células en fase estacionaria, pero son más activos en células en división. La activación de respuestas de estrés provoca cambio en la fisiología de las bacterias y hongos además de la aparición de fenotipos específicos en las biopelículas que combaten los efectos de los antibióticos, entre ellos la expresión de enzimas como la β -galactosidasa que se activa con imipenem y piperacilina en biopelículas. 4) Generación de células persistentes. A un pequeño porcentaje de la población celular que permanece viable después de la exposición prolongada (o de dosis excesivas) a los antibióticos se le conoce como persistente, y confiere (o no) resistencia a su progenie una vez que se elimina la presión selectiva.

Aunque a la fecha se desconocen los aspectos básicos de la fisiología de estas células persistentes, se han estudiado varios genes que participan para su generación, entre ellos se han identificado tres locus hip (high-level-persistence): A, B y AB que controlan la frecuencia de este fenotipo. Todos los microorganismos mutantes hip producen mil veces más células persistentes que la variante silvestre. La importancia de la aparición de este tipo de células reside en el éxito del tratamiento con el uso de antimicrobianos cuando con concentración mínima antimicrobianos causa una eliminación de 99.9% de las células en las biopelículas, y las remanentes serían eliminadas por el sistema inmunitario; sin embargo, cuando existe una disfunción en la respuesta inmunitaria del paciente, o no hay accesibilidad de las células inmunocompetentes al sitio infectado, pueden aparecer problemas graves (Castrillón, 2005; Pranab, 2004). Por lo que se refiere a la penetración restringida, se ha sugerido que la matriz extracelular excluye o limita el acceso de los medicamentos a los organismos profundos de la biopelícula. Muchos estudios indican que la matriz no forma una barrera para la difusión, aunque para ciertos compuestos se retrasa la penetración. Se ha propuesto que el glicocalix causa la disminución de la difusión o secuestro de los antimicrobianos. Sin embargo, al disgregar las biopelículas, ajustar a una densidad celular y realizar la prueba de susceptibilidad en las biopelículas preformadas, utilizando el ensayo XTT, los resultados demostraron que las biopelículas preformadas fueron intrínsecamente resistentes a los antifúngicos y que las células móviles mantenían su fenotipo de resistencia después de la resuspensión. Lo anterior sugiere que la integridad de la estructura de la biopelícula y el glicocalix confieren efecto mínimo en la resistencia de las células móviles (Ibarra, *et al* 2012; Ramage *et al* 2005; Ramage, *et al* 2013). Las biopelículas crecen poco a poco porque los nutrientes están limitados, lo que ocasiona disminución del metabolismo de los microorganismos. Con frecuencia, la lenta velocidad de crecimiento se asocia con la adopción de diferentes fenotipos por los microorganismos, como cambios en la cubierta celular, con lo cual se afecta la susceptibilidad del microorganismo a los agentes antimicrobianos. Para comprobar si la velocidad de crecimiento es un parámetro importante en la adquisición de resistencia a los antifúngicos, se generaron

biopelículas con diferentes velocidades de crecimiento y se comparó la susceptibilidad a la anfotericina B de las células de la biopelícula contra la de las células planctónicas que crecían a la misma velocidad (Ramage, *et al* 2013). Se encontró que las células de la biopelícula fueron resistentes al fármaco a todas las velocidades de crecimiento probadas, mientras que las planctónicas fueron resistentes sólo a bajas velocidades de crecimiento. Por lo tanto, la resistencia depende de otros factores, además de la forma de crecimiento. Dado que la resistencia a los antibióticos en las biopelículas de *Candida* no puede atribuirse a la exclusión por la matriz o a la lenta velocidad de crecimiento, quizá exista un mecanismo adicional, como la expresión de genes inducidos por contacto, para adquirir otras propiedades y mediante el cual se adquiriera la resistencia a los antibióticos (Pranab, 2004; Valentin, 2007).

Los principales genes que contribuyen a la resistencia de los medicamentos son los que codifican a las bombas de eflujo multifármacos; su regulación resulta en un fenotipo resistente a varios agentes. Se determinó que cuando un microorganismo se une a la superficie y forma una biopelícula expresa un fenotipo alterado *C. albicans* y *C. dubliniensis* poseen dos diferentes tipos de bombas de flujo: unión adenosin trifosfato cassette (ABC), transportadores que codifican los genes CDR (CDR1 y CDR2), y los facilitadores codificados por los genes MDR. Ambos tipos de genes se regulan durante la formación y desarrollo de las biopelículas. Sin embargo, las cepas mutantes que llevan delección simple o doble de estos genes son susceptibles al fluconazol cuando crecen de forma planctónica, pero retienen su fenotipo de resistencia cuando crecen en biopelículas. Por lo tanto, el mecanismo de resistencia es un proceso que no puede explicarse por un solo tipo de mecanismo molecular (Castrillón, 2010; Ramage, *et al* 2001; Valentin, 2007).

Hoy en día otras investigaciones sobre la resistencia antifúngica que presentan las biopelículas han sido dirigidas en detalle a mecanismos como, a) estado fisiológico de las células de hongos, b) la función de barrera de la ECM, y c) las variaciones en la composición fúngica de esteroides de membrana en las diferentes fases de desarrollo (Paiva *et al* 2012). En lo que refiere al estado fisiológico, se refiere a la existencia de cepas metabólicamente activas e inactivas, por ejemplo las blastosporas observadas

en la capa basal de las biopelículas de *C. albicans* exhiben alta actividad metabólica y esta aumenta con las fases de desarrollo, lo que sugiere que la resistencia observada en estas biopelículas no es debido a la presencia de células durmientes o muertas. El crecimiento en condiciones anaerobias y aerobias para las células de las biopelículas también es importante ya que se ha informado que participan en el crecimiento y la resistencia que adquieren estas (Pemán, *et al* 2008). Además de que los azoles parecen funcionar mejor en ambientes anaeróbicos, debido a que *Candida* no crece óptimamente en condiciones anaeróbicas, tales condiciones ambientales no se espera que contribuyan de manera significativa a la resistencia a los antifúngicos. Estos estudios indican que el estado fisiológico de la biopelícula de *Candida* desempeña un papel mínimo en impartir resistencia contra una mayoría de agentes antifúngicos. En lo que refiere al papel de la matriz extracelular (ECM), la formación de biopelículas por *Candida* se caracteriza por la presencia de ECM visible, además de la presencia de biopelículas bacterianas esto ha implicado la resistencia contra algunos agentes antimicrobianos, diferentes investigadores han estudiado la relación entre la resistencia antifúngica y ECM de biopelículas fúngicas. En uno de los estudios iniciales, la contribución de la ECM a la resistencia antifúngica de las biopelículas de *C. albicans* se investigó mediante la determinación de los perfiles de sensibilidad de las biopelículas cultivados estáticamente (exhibiendo mínimo ECM) o con agitación (máxima síntesis de ECM) (Coogan, *et al* 2011; Pranab, 2004). Las biopelículas que crecen con o sin agitación no mostraron diferencias significativas en la susceptibilidad a alguna de las drogas. Más recientemente, se demostró que el fenotipo de resistencia de *C. albicans* mantuvo biopelículas con células sésiles, lo que sugiere que la integridad de la biopelícula y la presencia de ECM no son los únicos determinantes de resistencia. Otra prueba en contra del papel de ECM en la resistencia de biopelículas, es la deficiencia ECM en biopelículas formadas por cepas mutantes defectuosas en la filamentation donde *C. albicans* parece mantener alto nivel de resistencia antifúngica. Un estudio informó de que la biopelícula de *C. parapsilosis* son tan resistentes como la formada por *C. albicans*, a pesar de ser considerablemente menos compleja la formación de ECM (Pranab, 2004).

Finalmente el Fluconazol y otros azoles orientan la biosíntesis fúngica del ergosterol mediante la inhibición de la citocromo P-450 hemoproteína implicada en la ruta biosintética. La disminución resultante en los niveles de ergosterol y la variación en la composición de esteroides de membrana ha sido previamente postulado que produce resistencia antifúngica de células plactónicas de *C. albicans*. En un estudio reciente, se determinó las biopelículas de *C. albicans* si tienen variaciones en la composición de esteroides en diferentes fases de desarrollo, y si la resistencia a los antifungicos de las biopelículas de *C. albicans* pueden estar relacionados con tales variaciones. Total de esteroides de membrana fueron aisladas de biopelículas y de células planctónicas, y se analizó por cromatografía gas líquido. Los niveles de ergosterol de biopelículas que crecen a las fases intermedias y maduras se redujeron en un 41 y 50%, respectivamente, en comparación con la fase temprana de la biopelícula de *C. albicans*. Estos resultados mostraron que el nivel de esteroides se modula durante la formación de biopelícula de *C. albicans* y sugirió que dicha modulación puede contribuir a la resistencia a los medicamentos de una manera específica de fases (Merino, *et al* 2011, Pranab, 2004).

1.11 Tratamiento

Las biopelículas son difíciles de eliminar por los mecanismos defensivos inmunológicos, y con el tratamiento antimicrobiano habitual. Las biopelículas pueden convertirse en un reservorio y fuente de infección humana, el crecimiento microbiano sobre los dispositivos biomédicos puede alterarlos, disminuir su funcionalidad o inhabilitarlos. En 1995, Hawser *et al* Observo que las biopelículas de *C. albicans* desarrolladas sobre discos de cloruro de polivinilo (PVC), eran entre 30 y 2.000 veces más resistentes a fluconazol, anfotericina B, 5-fluorocitosina, itraconazol y ketoconazol que las células planctónicas. Después de su publicación, la mayoría de los estudios realizados sobre la actividad antifúngica en biopelículas han constatado que el fluconazol y los nuevos triazoles (posaconazol, ravuconazol y voriconazol) carecen de una actividad importante contra las biopelículas de *C. albicans* y otras especies diferentes de *Candida*. Sin embargo, las formulaciones lipídicas de la anfotericina B y

las equinocandinas son más activas sobre las biopelículas que la anfotericina B desoxicolato o los azoles (Cuadro 5) (Quindos, 2009).

Cuadro 5. Actividad antifúngica *in vitro* de antifúngicos utilizados en el tratamiento de las candidosis invasoras.

Especie o genero	Células	Antifúngico							
		ABD	ABL	FLC	VCR	PSC	ANI	CAS	MICA
<i>Candida albicans</i>	Planctónicas	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sésiles(biopelícula)								
	Adhesión	¿?	¿?	¿?	+	¿?	¿?	¿?	+
	Formación	¿?	¿?	¿?	+	¿?	+		+
	Erradicación	-	+	-(+)	-(+)	-(+)	+	+	+
<i>Candida glabrata</i>	Planctónicas	+	+	¿?	+	+	+	+	+
	Sésiles(biopelícula)								
	Erradicación	¿?	-(+)	-(+)	-(+)	¿?	¿?	+	+
<i>Candida krusei</i>	Planctónicas	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sésiles(biopelícula)								
	Erradicación	¿?	-(+)	¿?	¿?	¿?	¿?	¿?	+
<i>Candida parapsilosis</i>	Planctónicas	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sésiles(biopelícula)								
	Erradicación	¿?	-(+)	¿?	-(+)	¿?	¿?	-(+)	-(+)
Otras especies	Planctónicas	+	+	¿?	+	+	+	+	+
	Sésiles(biopelícula)								
	Adhesión	¿?	¿?	+	+	¿?	¿?	¿?	+
	Formación	¿?	¿?	+	+	¿?	+	¿?	+
	Erradicación	-	+	-	-(+)	-(+)	+	+	+

+: activo; -: inactivo; ¿?: contradictorio; ABD: anfotericina B desoxicolato; ABL: formulaciones lipídicas de anfotericina B, ANI: anidulafungina; CAS: caspofungina; FLC: fluconazol; MICA: micafungina; PSC: posaconazol; VCR: voriconazol. (Quindos, 2009)

En las biopelículas maduras se ha descrito una disminución del contenido de ergosterol y una reducción de la expresión de ERG11, lo que provoca que los azoles (fluconazol, posaconazol o voriconazol) que actúan inhibiendo la síntesis de

ergosterol y los polienos (anfotericina B y nistatina) cuyo mecanismo de acción implica la unión del antifúngico a esta molécula de la membrana celular, vean disminuida su actividad antifúngica (Quindos, 2009).

2.- ANTECEDENTES

Se tiene registros fósiles de la formación de biopelículas desde aproximadamente 3.2 mil millones de años, por lo que se considera que esta organización celular representa el modo de crecimiento que permite a las células sobrevivir en ambientes hostiles, dispersarse para formar nuevos nichos y les otorga ventajas significativas de protección frente a fluctuaciones del ambiente como la humedad, temperatura y pH, así como la concentración de nutrientes y la eliminación de desechos (Ramage, *et al* 2001). Información sobre las características estructurales asociadas a las biopelículas proviene de los experimentos *in vitro* en el que se han desarrollado una gran variedad de modelos de biopelículas por diferentes grupos de investigadores (Estivill, *et al* 2011). Estos sistemas comprenden modelos de discos de catéteres, laminas y tubos de diferentes materiales, diapositivas de vidrio, un fermentador de biopelícula perfundido, filtros cilíndricos de celulosa, las tiras de acrílico y discos, sustrato de germanio, placas de microtitulación, y los frascos de cultivo de tejidos, entre otros sistemas, e incluyen biopelículas formadas bajo condiciones estáticas (Franca, *et al* 2011; Ramage, *et al* 2005). Con estos modelos se analiza la cuantificación y crecimiento del organismo mediante la evaluación de peso seco, incorporación de isotopos radiactivos, reducciones de sal de tetrazolio (XTT). Estos ensayos se acompañan de estudios de ultraestructura microscópica, como la electrónica de barrido laser confocal de Raman, 2008 que permiten ver en tercera dimensión la formación de biopelículas, lo que ha permitido la descripción de diferentes modelos de organización de las biopelículas (Ramage, *et al* 2005). Recientemente se desarrollaron estudios *in vivo* para la detección temprana de la infección en tejidos e implantes biomédicos (Castañón, 2012). La mayoría de estos sistemas modelo se enfocan en la cuantificación de la biomasa de biopelícula, la cual se realiza mediante

recubrimiento convencional, que es un trabajo intensivo y lento. En los últimos años, varios ensayos de sustitución para la cuantificación de biopelículas en placas de microtitulación se han descrito los cuales se pueden clasificar dependiendo el tipo de biomasa de la biopelícula (basado en la cuantificación de la matriz, células vivas y muertas), ensayos de viabilidad (sobre la base de la cuantificación de células viables) y ensayos de cuantificación de la matriz (en base a la tinción específica de componentes de la matriz) (Elke, *et al* 2008; Franca, *et al* 2011). Actualmente, dos modelos animales diferentes, asociados a infecciones de catéter por *Candida* se han descrito y visualizado *in vivo* indicando las características estructurales de las biopelículas que resultan ser similares a los estudios *in vitro* (Ramage, *et al* 2005). Las biopelículas también se han recuperado directamente a partir de muestras clínicas y se visualizaron utilizando diferentes técnicas de microscopia. Una vez mas estos datos sugieren que los modelos *in vitro* imitan a los eventos *in vivo* por lo tanto las observaciones pueden ser clínicamente relevantes (Ramage, *et al* 2005; Pemán, 2007). El pionero Douglas (2002) en su trabajo sobre la estructura de la biopelícula de *Candida* formadas sobre discos de catéter se examino por primera vez por microscopia electrónica de barrido (SEM), observando que la unión celular de las levaduras fue seguido por la formación de tubos germinativos dentro las primeras 6 horas, y que la madures se alcanzaba de 24 a 48 horas después de la incubación, que esta constaba de redes de levaduras, hifas, pseudohifas, y de material polimerico extracelular que era visible en algunas de estas estructuras (Ramage, *et al* 2005). Los investigadores Douglas y Baillie (2005), demostraron que las hifas son elementos esenciales para proporcionar la integridad estructural y características de la arquitectura de la biopelícula madura. Bases moleculares que regulan la fermentación que están involucrados en la formación de biopelículas fueron estudiados por Ramage (2005) que utilizando una serie de organismos genéticamente definidos de *C. albicans*, cepas mutantes que se caracterizan por su incapacidad para formar biopelículas fueron incapaces de formar filamentos lo que dio lugar a biopelículas pobres que carecen de la estructura tridimensional y está compuesta principalmente de monocapas de células dispersas, lo que demuestra que la proteína reguladora gen

EFG1 es un factor clave en el desarrollo y la formación de una biopelícula madura en superficies artificiales (Ramage, *et al* 2005; Pemán, 2007). Varios grupos han demostrado que los estilos de vida de la biopelículas de *Candida* conducen a niveles muy elevados de resistencia a los antifúngicos más utilizados. Sin embargo agentes antifúngicos tales como las equinocandinas y formulaciones liposomales de anfotericina B, muestran una mayor actividad contra las biopelículas de *Candida*. Es importante señalar que se están empleando nuevas técnicas de sensibilidad antifúngica contra biopelículas de *Candida*, en este contexto tiene importantes implicaciones clínicas ya que pueden guiar las decisiones terapéuticas que puedan afectar los resultados de los pacientes que sufren de estas infecciones difíciles de tratar. Un reciente desarrollo el modelo en placa de microtitulación ha demostrado su utilidad para la determinación y la estandarización de las pruebas de sensibilidad antifúngica en biopelículas de *Candida* (Estivill, *et al* 2011). El fundamento de este sistema es proporcionar una metodología rápida y reproducible para probar una variedad de cepas clínicas y de laboratorio contra una batería de compuestos antifúngicos. El ensayo se basa en la medición de actividades metabólicas de las células sésiles que crecen dentro de la biopelícula y se basa en la reducción de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil) -2 H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT) para dar una sal soluble en agua desarrollando color del producto que se puede medir en un lector de placas de microtitulación (Ramage, *et al* 2005). Hasta ahora, no parece que haya un factor de resistencia específico responsable de la resistencia de biopelículas, es un fenómeno complejo multifactorial que aún queda por dilucidar y comprender. Algunos mecanismos que pueden ser responsables de la resistencia intrínseca de las biopelículas de *Candida* pueden incluir los siguientes: a) alta densidad dentro de la biopelícula, b) los efectos de la matriz de la biopelícula, c) disminución de la tasa de crecimiento y la limitación de nutrientes, d) la expresión de genes de resistencia (Ramage, *et al* 2005).

3.- JUSTIFICACIÓN

Considerada como enfermedad por hongos oportunistas, la Candidosis se presenta de manera endógena, casi siempre atribuible a cuatro procesos: a) el desequilibrio de la flora microbiana, que favorece el incremento de levaduras de *Candida*, lo cual se puede deber a cambios de pH, cúmulos de nutrientes como el glucógeno, b) por disminución de la flora bacteriana por antibióticos, c) por enfermedades, d) por procesos que influyan en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular, los casos exógenos siempre se inician por el ingreso al organismo de grandes cantidades de levaduras por ejemplo la drogadicción que facilita su encuentro con biomateriales implantados y de superficies de acogida, además dispositivos como prótesis, implantes, tubos endotraqueales, marcapasos y varios tipos de catéteres, han demostrado que facilitan la colonización (Andes, *et al* 2004; Estivill, *et al* 2011; Hasan, *et al* 2009).

El desarrollo de la candidosis está influido por una serie de factores de virulencia que actúan de manera coordinada, donde uno de los más importantes es la formación de biopelículas, propiedad de patogenicidad que se presenta como una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie y mantenidos por una matriz de exopolisacarido, la formación de biopelículas está asociada con el aumento de las infecciones en dispositivos de implantes médicos sobre todo en pacientes inmunosuprimidos, esto implica un reto en la salud pública ya que principalmente *Candida* es la tercera causa principal de infecciones asociada a catéteres, lo que representa la tasa mas alta de colonización y la mayor en lo referente a la mortalidad. La formación de biopelículas de *Candida* tiene importantes repercusiones clínicas debido a una mayor resistencia a la terapia antifungica y la capacidad de las células dentro de las biopelículas para resistir las defensas del huésped, además de que, puede servir como depósito para futuras infecciones.

El objetivo es comparar la producción de Biopelículas a partir de aislamientos de *Candida* provenientes de diversas muestras clínicas y saber si existe diferencia entre las especies de *Candida*.

4.- HIPÓTESIS.

- Existe diferencia entre la producción de biopelículas de las diferentes especies de *Candida*, aisladas a partir de distintas muestras clínicas.

5.- OBJETIVOS.

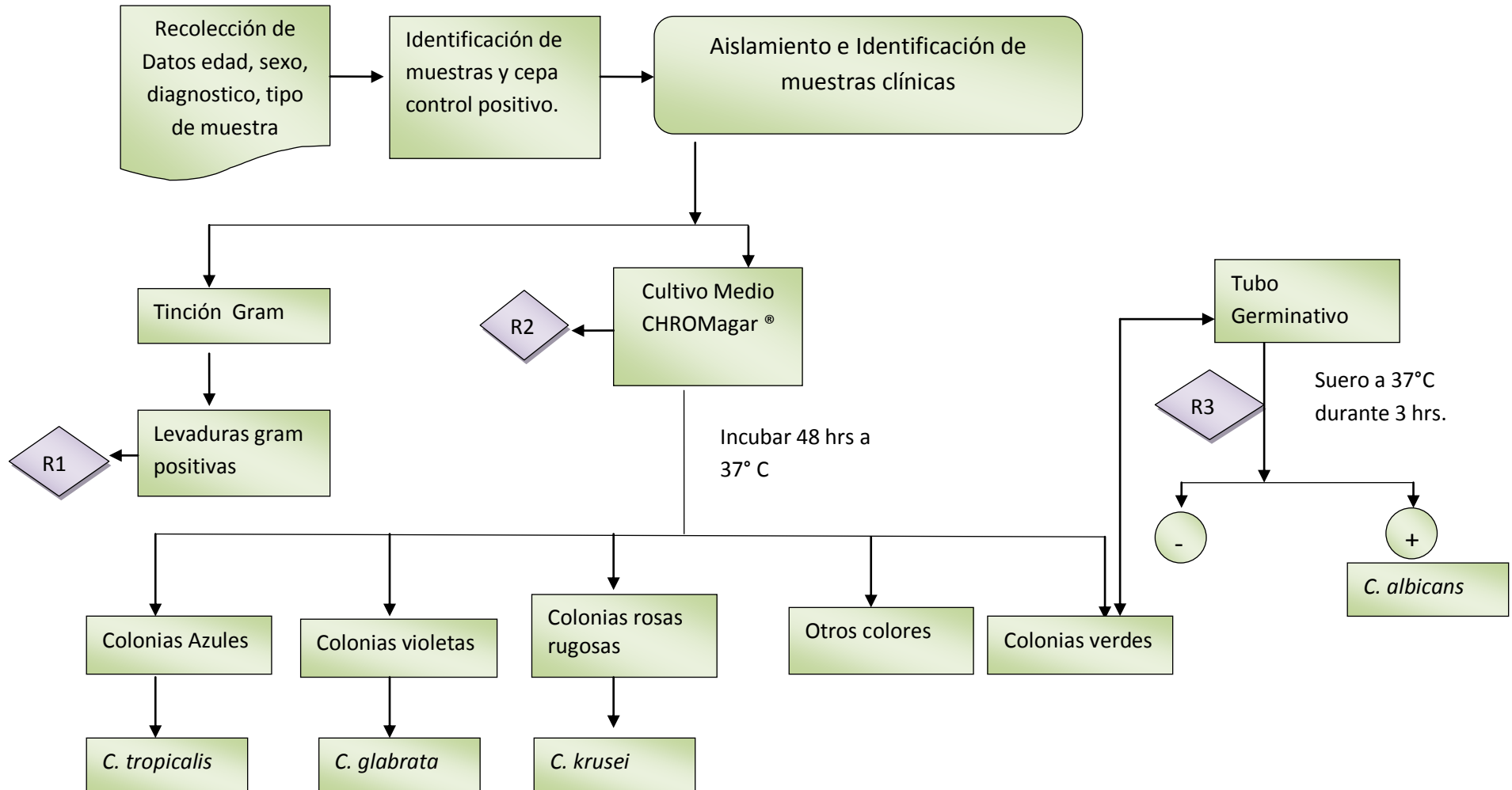
5.1 OBJETIVO GENERAL.

- Comparar la producción de biopelículas a partir de aislamientos de *Candida* provenientes de diversas muestras clínicas.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Recolectar muestras clínicas humanas de unidades Hospitalarias y clínicas.
- Se identificarán las cepas empleando pruebas microbiológicas.
- Estandarizar la prueba para formación de biopelículas.

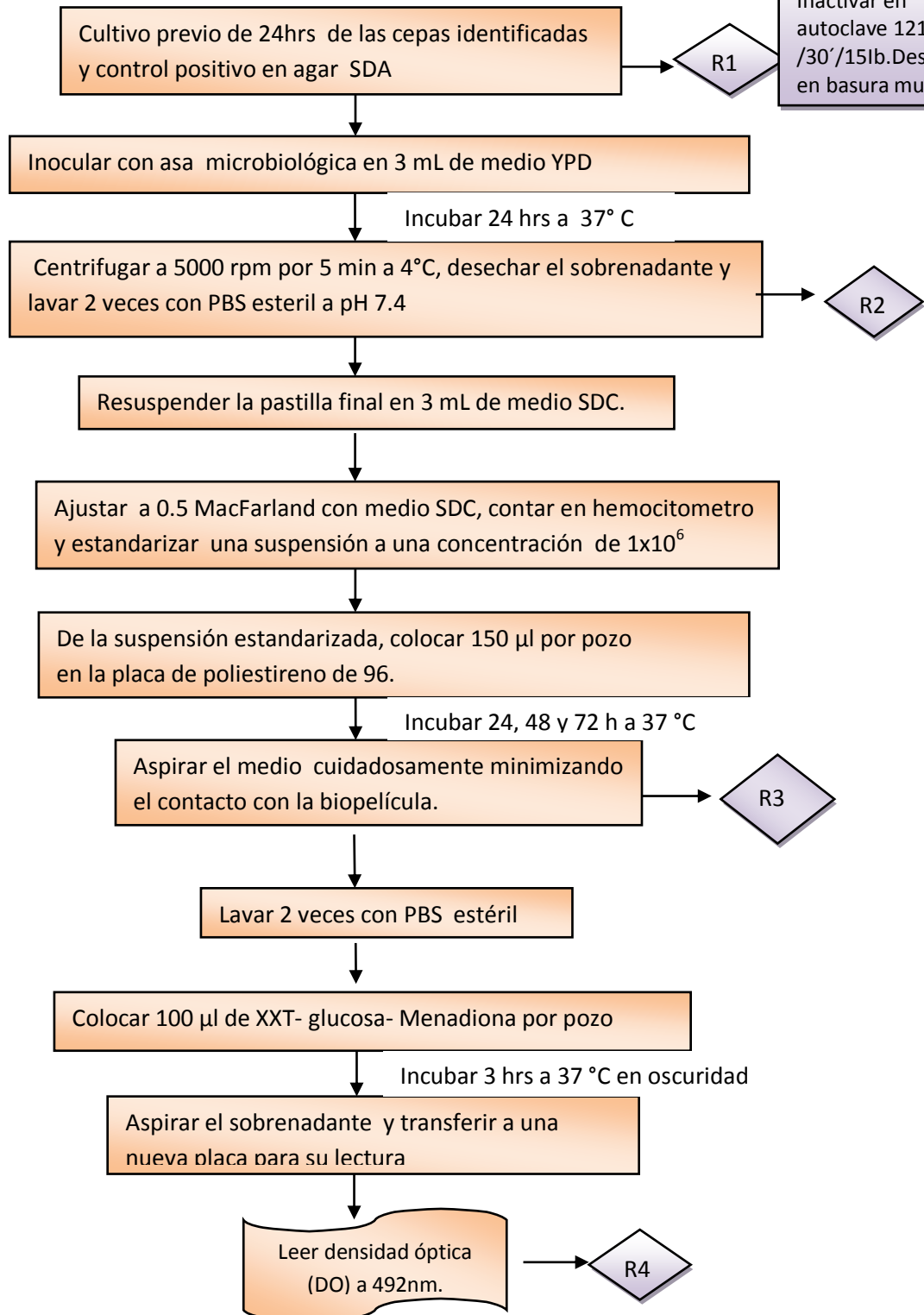
6.- DIAGRAMA DE TRABAJO.



R1 Residuos de Frotis
 R2 Caja CHROMagar® con crecimiento
 R3 Residuos de suero con crecimiento
 T1, T2 y T3: Inactivar en autoclave
 121 °C /30' /15lb. Desechar en basura municipal

Figura 5. Estrategia experimental para realizar la identificación de muestras.

Figura 6. Diagrama experimental para la Formación de Biopelículas.



T1 Caja SDA con crecimiento:
Inactivar en autoclave 121 °C /30'/15lb.Desechar en basura municipal

R2 Residuos de medio y PBS
R3 Residuos de medio
R4 Residuos de XTT-menadiona
T2, T3 Y T4: Inactivar en autoclave 121 °C /30'/15lb.Desechar al drenaje.

7.- MATERIALES Y METODOS

7.1.- Cepas utilizadas

Se tomo el registro de 106 muestras clínicas humanas recolectadas de un conjunto de Clínicas y unidades Hospitalarias en una población de entre 20 y 40 años con una presuntiva identificación del género *Candida* en agar biggy tomando como datos principales el sexo, edad, diagnóstico y finalmente tipo de muestra clínica. (ANEXO 1 Identificación y origen de la cepa).

Cepa de Referencia: *Candida albicans* ATCC 32354 control positivo para formación de Biopelículas.

7.2.- Identificación de cepas

En los diferentes ensayos, las levaduras fueron identificadas mediante criterios microscópicos como la tinción de Gram, observando levaduras gram positivas, posteriormente fueron crecidas en CHROMagar para identificación de especies de *Candida* en función de los sustratos cromogenicos que se desarrollan en este medio y finalmente se realizo tubo Germinativo para identificar a *C. albicans* colocando en tubo eppendorf 300 µL de suero fetal bovino y un inculo de la muestra incubadas 3 hrs a 37°C (Castañon, 2012; Hasan, *et al* 2009; Koneman, 2007; Pemán, 2007).

7.3.- Evaluación de la Formación de biopelículas.

Para la formación de biopelículas se empleó el método descrito por Ramage (2001) modificado (Ramage, *et al* 2005). A partir de un cultivo de 24 h de los aislamientos en Agar Dextrosa Saboraud®BDBioxon, se inoculó un tubo con 3 mL de medio de Peptona, Extracto de Levadura y Dextrosa (YPD), el cual se incubo 24 h a 37 °C (Taniguchi & Faria, 2009; Xiaogang, 2003; Ye Jin, *et al* 2004). Las células se cosecharon por centrifugación 5 min a 5000 rpm y la pastilla se lavó 2 veces con 2 mL de Buffer de fosfato salino estéril a pH 7,4 (PBS, ®Sigma-Aldrich), dado que las células tienden a adherirse o agregarse se

utilizó el vórtex, después del lavado, se ajustó a una concentración de 1×10^6 UFC/ml con la ayuda de la cámara de Neubauer en Caldo Dextrosa Sabouraud. Para permitir el desarrollo de las biopelículas, se añadió 150 μ l de esta suspensión celular a cada uno de los pocillos de las placas estériles de poliestireno de fondo plano que, posteriormente, se incubaron durante 24, 48 y 72 h a 37 °C. Después de la incubación, las placas se lavaron dos veces con PBS con la finalidad de eliminar las células no adheridas. La formación de biopelículas se evaluó mediante el ensayo de reducción de sales de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT,[®]SigmaAldrich). Para realizar esta cuantificación, se preparó una solución de XTT en PBS-Dextrosa (0,5 g/L) que después se filtro a través de un filtro de 0,22 μ m y almacenó en alícuotas a -70 °C (Paiva, *et al* 2012). Antes de cada ensayo, se descongeló una alícuota de XTT y se le añadió Menadiona 10 mM en acetona (Sigma-Aldrich) (Dalleau & Cateau, 2008; Silva, *et al* 2008). A cada uno de los pocillos de la placa con las biopelículas se añadió 100 μ l de la solución XTT-Menadiona. Las placas se incubaron en oscuridad a 37 °C durante 3 h, después el sobrenadante fue retirado del pocillo y trasladado a una nueva placa para su lectura, leyéndose la densidad óptica (DO) de cada pocillo con un espectrofotómetro (Stat Fax 3200) a 492 nm (Pierce & Tristan, 2008). La determinación se realizó por triplicado, considerándose cepas productoras de biopelículas aquéllas con una $DO \geq 0.200$, una vez restada la densidad óptica del pocillo de control de esterilidad (blanco con medio SDC)(Valentín & Cantón, 2007; Pierce & Tristan, 2008; Ramage, *et al* 2001) (ANEXO 2 Reactivos).

8.- RESULTADOS

De un total de 106 muestras provenientes de las unidades médicas familiares (UMF) y de hospitales generales (ANEXO 1) con un diagnóstico presuntivo de *Candida albicans* en medio de crecimiento Biggy, a las cuales se les realizó un diagnóstico para confirmar la identificación de especie (fig 5). Las muestras fueron clasificadas considerando: Género, edad, tipo de muestra, diagnóstico. (ANEXO 1)

Las muestras se agruparon según el género Masculino (M), y femenino (F) como podemos observar en el gráfico 4, observando que 78.3 % eran mujeres, el 14.1 % hombres y el 7.5 % de origen desconocido. (Gráfico 4)

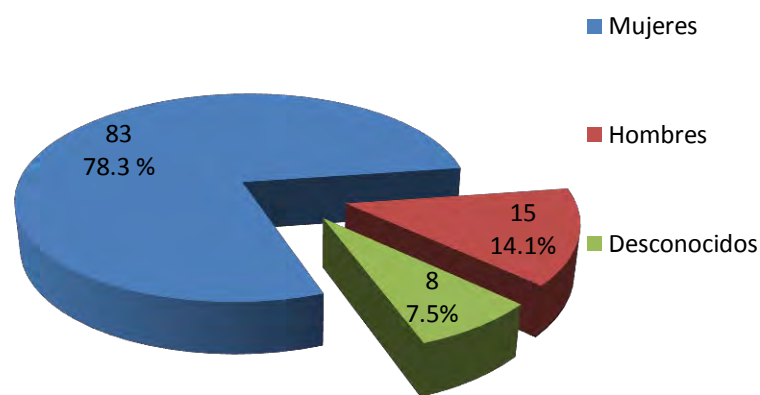


Gráfico No. 4 Distribución de muestras según el género

También las muestras fueron de acuerdo a la edad de los pacientes en intervalos de 10 años como se muestra en el cuadro 6, observando que la incidencia de infecciones se ubica entre los 21 a 30 años de edad con un 18 % y en segundo lugar con un 17% en el rango entre los 31 a 40 años de edad de los pacientes, aunque el mayor porcentaje recae en el No Determinado con un 33%.

Cuadro 6. Distribución de muestras según la edad.

Edad	Individuos	%
0-10 años	9	8.5
11-20años	4	3.8
21-30años	19	18
31-40 años	18	17
41-50años	13	12
51-60 años	6	5.7
61-70años	2	1.9
ND	35	33
total	106	100%

ND: No Determinado

Las muestras fueron agrupadas según su origen de la siguiente forma, apreciando en el grafico 5 que la mayoría de las muestras provienen de un exudado vaginal con el 67 %, en segundo lugar expectoración/ Ex. Faríngeo con un 22.6 %.

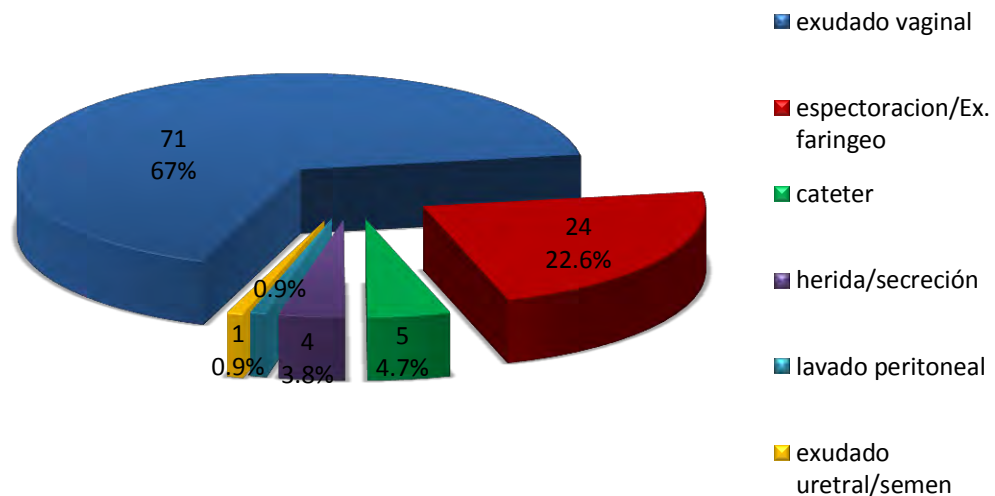


Grafico 5. Distribución de muestras según el origen.

Las muestras se agruparon según el diagnóstico del paciente. (Cuadro 7) apreciando que la mayoría provienen de cervicovaginitis con 44% e infección vaginal con 21 %.

Cuadro 7. Distribución de muestras según el diagnóstico.

Diagnostico	Muestras	%
Tuberculosis	1	0.9
Neumonia	1	0.9
Rinitis alergica	3	3
Tos cronica	1	0.9
Asma	1	0.9
Infeccion vaginal	21	20
Cervicovaginitis	44	41.5
Insuficiencia Renal	5	4.7
Diabetes tipo 2	2	2
Herida	1	0.9
Neoplasia intraepitelial c.	1	0.9
Miomatosis uterina	1	0.9
Faringitis	7	6.6
Rinofaringitis	6	5.7
Abseso cerebral	1	0.9
P. cesaria	1	0.9
Balanitis	1	0.9
POP	1	0.9
ND	7	6.6
TOTAL	106	100%

ND: No Determinado

Las muestra, estas se distribuyeron finalmente según la clínica de procedencia como lo podemos observar en el cuadro 8, Observando que la mayoría de las muestras recolectadas provienen de (UMF) y en el menor porcentaje a los Hospitales Generales.

Cuadro 8. Distribución de muestras según la clínica de procedencia.

Clínica de procedencia	Muestras	%
UMF-52	36	33.9
UMF-62	28	26.4
UMF-63	23	21.7
H.GRAL.-57	10	9.4
H.GRAL.-VV	9	8.5
total	106	100%

Despues de realizar las pruebas de identificación para *Candida* a las 106 muestras, se lograron identificar con la ayuda del medio CHROMagar (fig. 5) ,100 muestras con aislamiento de una cepa y 6 muestras que contenían 2 especies del género *Candida*, haciendo un total de las 112 cepas, las cuales fueron distribuidas según la especie. (Grafico 6), observando que el 82.1 % corresponden a *Candida albicans*, con un 14.3% *Candida parapsilosis*, y con un 1.8% *C. glabrata* y *C. krusei*.

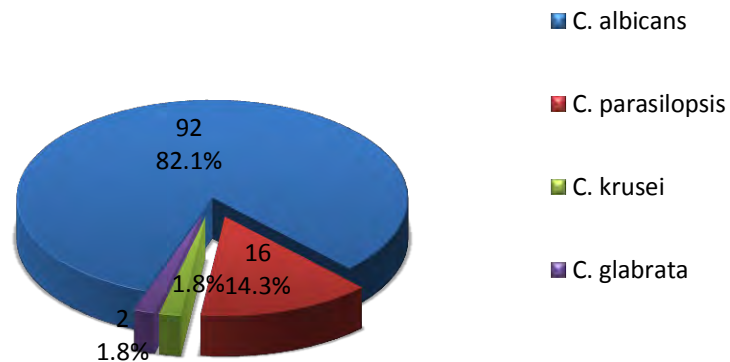


Grafico 6. Distribución de cepas según la especie.

En el cuadro 9 se muestran las 6 muestras identificadas con dos cepas, identificadas según la clínica de procedencia, genero, edad, tipo de muestra, especie y diagnóstico.

Cuadro 9. Distribución de muestras con dos cepas identificadas.

FOLIO	SUBFOLIO	CLINICA	SEXO	EDAD	TIPO DE MTA	ESPECIE	DIAGNÓSTICO
LTV022	LTV022.1	H. GRAL -57	ND	ND	Lavado Peritoneal	<i>C. albicans</i>	Insuficiencia Renal
	LTV022.2	H. GRAL -57	ND	ND	Lavado Peritoneal	<i>C. parapsilosis</i>	Insuficiencia Renal
LTV023	LTV023.1	H. GRAL -57	ND	ND	Catéter	<i>C. albicans</i>	Neumonía
	LTV023.2	H. GRAL -57	ND	ND	Catéter	<i>C. parapsilosis</i>	Neumonía
LTV030	LTV030.1	H. GRAL -VV	F	42	Exudado Vaginal	<i>C. albicans</i>	Infección Vaginal
	LTV030.2	H. GRAL -VV	F	42	Exudado vaginal	<i>C. parapsilosis</i>	Infección Vaginal
LTV047	LTV047.1	UMF-62	F	40	Exudado vaginal	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
	LTV047.2	UMF-62	F	40	Exudado vaginal	<i>C. parapsilosis</i>	Cervicovaginitis
LTV104	LTV104.1	UMF-63	F	53	Exudado faríngeo	<i>C. albicans</i>	Rinitis alérgica
	LTV104.2	UMF-63	F	53	Exudado faríngeo	<i>C. parapsilosis</i>	Rinitis alérgica
LTV105	LTV105.1	UMF-52	F	31	Exudado vaginal	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
	LTV105.2	UMF-52	F	31	Exudado vaginal	<i>C. parapsilosis</i>	Cervicovaginitis

ND: No Determinado

Para determinar si una cepa tiene la capacidad de producir biopelículas se realizó el método modificado de Ramage, (2001), el cual se realizó a las 112 cepas por triplicado, en periodos de 24, 48 y 72 horas, mostrando que son positivas y productoras de Biopelículas según Valentín & Cantón, 2007, aquellas que tuvieron un resultado ≥ 0.200 DO y tomando a las 48 horas como tiempo de referencia para leer la formación de Biopelículas. Como podemos observar en el ANEXO 3 son positivas a las 24 hrs, 111 cepas de un total de 112, a las 48 hrs fueron positivas 110 cepas, a las 72 hrs 92 cepas.

Grado de Formación de biopelículas:

La literatura no tiene registro sobre qué medidas son asignadas a las muestras positivas para tener un rango en la que podamos asignar a las cepas en baja, media y alta producción de biopelículas, por lo que según los datos obtenidos estos fueron asignados en base a la distribución de las (DO) obtenidas como se muestra a continuación:

Cepas negativas aquellas que tienen una lectura < 0.200 DO

Cepas con baja producción a las que tienen una lectura ≥ 0.200 a 1.0 DO

Cepas con media producción a las que tienen una lectura ≥ 1.1 a 2.0 DO

Cepas con alta producción a las que tienen una lectura ≥ 2.1 a 3.0 DO

Como podemos observar en el ANEXO 4 a las 24 hrs se encontró que 1 cepa es negativa para la formación de biopelículas, además de 23 cepas con baja producción de biopelículas, 53 cepas con media producción de biopelículas y 35 alta producción de biopelículas. A las 48 hrs, 2 cepas son negativas para la formación de Biopelículas, además de 21 cepas con baja producción de biopelículas, 33 con media producción de biopelículas y 56 cepas con alta producción de biopelículas. A las 72 hrs, 20 cepas son negativas para la producción de biopelículas, además de 42 cepas con baja producción de biopelículas, 22 con media producción de biopelículas y 28 con alta producción de biopelículas.

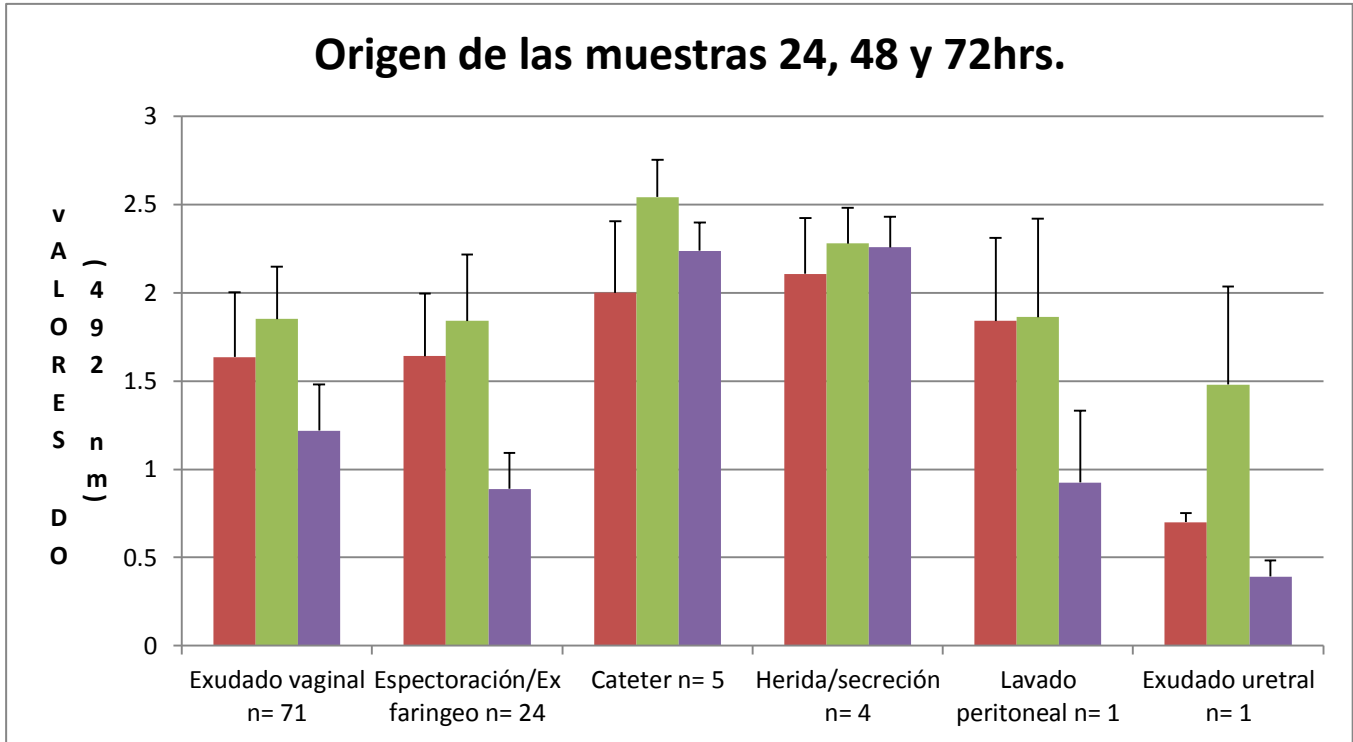


Grafico 7. DO formación de biopelículas por origen de las muestras a 24, 48 y 72 hrs

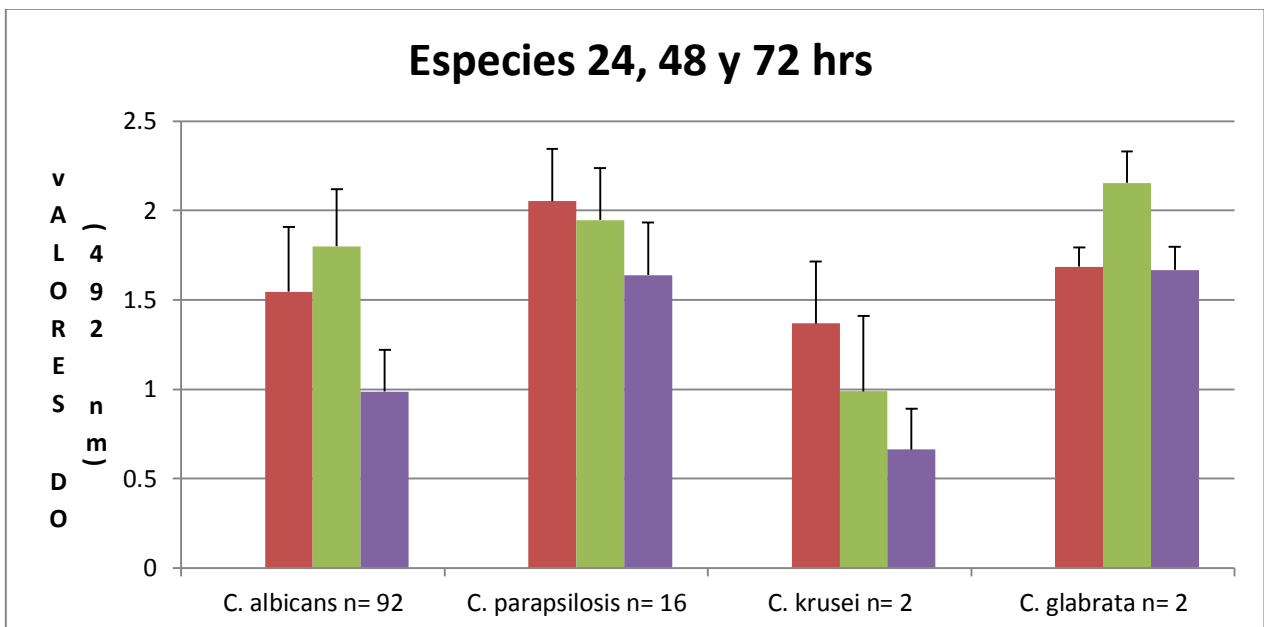


Grafico 8. DO formación de Biopeliculas por especie a 24, 48 y 72 hrs.

9. DISCUSIÓN

Debido a estudios recientes sabemos que las especies del género *Candida* tienen mayor capacidad para formar biopelículas en una gama de diversos sitios anatómicos, (cavidad oral, vías respiratorias bajas y altas, tracto gastrointestinal y urinario además de heridas), de ahí la razón más importante para su estudio y nuestra incapacidad para diagnosticar la presencia de biopelículas, lo que provoca altas tasas de morbilidad y mortalidad (Castrillón 2010; Ramage *et al* 2005). La hospitalización del paciente favorece la infección fúngica y la formación de biopelículas y más en la población de pacientes que están expuestos con biomateriales temporales o permanentes, por otra parte, los antibióticos de amplio espectro, la nutrición parenteral y la inmunosupresión debido a la quimioterapia, la radioterapia y la alteración de las barreras como las mucosas a causa de cirugías son algunos de los factores predisponentes más importantes para la micosis invasiva (Coogan *et al* 2011).

Si bien existen estudios sobre la importancia de las biopelículas bacterianas como principal causa de infección nosocomial hay polémica con las levaduras ya que existe una lista de especies de levaduras asociadas con biomateriales implantados que ha proporcionado un panorama de la verdadera magnitud de las biopelículas fúngicas clínicamente importantes relacionadas directamente con el huésped. También podemos observar que se ven afectadas indirectamente por biopelículas fúngicas aquella población relacionada con la infraestructura hospitalaria, las biopelículas crecen y persisten en una variedad de ubicaciones anatómicas, lo que resulta en la necesidad de un buen diagnóstico clínico, ya que existen referencias sobre la duración de la estancia hospitalaria y el costo de la terapia antifúngica, ya que fue mayor en los pacientes con aislamientos positivos por la formación de biopelículas y estos pacientes presentaban un riesgo mayor de mortalidad hospitalaria (Castrillón 2010).

Por otra parte, la colonización por especies de *Candida* ha representado un mayor riesgo en los aislamientos, porque este género se presenta con más frecuencia en

mucosas en diversos sitios anatómicos además de presentar resistencia a fármacos, sin embargo, se requieren estudios clínicos para resaltar la importancia de la formación de biopelículas de cepas de *C. albicans* y especies *no-albicans* como una de las principales infecciones nosocomiales. Aun no hay criterios diagnósticos definitivos para la detección de infecciones producidas por biopelículas fúngicas, sin embargo, en ciertas especialidades clínicas hay conocimiento clínico específico del alcance y la variedad de muestras que darán valor diagnóstico significativo. Estas muestras incluyen, pero no se limitan a, hisopos, biopsias, y fluidos corporales, que pueden incluir orina, sangre entera, suero, esputo, pus, moco. Estos se pueden tomar directamente desde tejido infectado, tales como heridas y la mucosa, pero también puede ser extraída directamente desde los biomateriales infectados, tales como dentaduras postizas, los tubos del pecho, y los implantes protésicos, catéter, entre muchos otros dispositivos médicos (Ramage *et al* 2005; Ramage *et al* 2013).

Aunque existen varias técnicas para medir *in vitro* la formación de biopelículas y su sensibilidad a los antifúngicos, en nuestro estudio hemos sustituido reactivos y equipo respecto al método propuesto por Ramage *et al* 2001, del XTT. Se trata de un método, eficaz y reproducible, en el cual se forman biopelículas sobre microplacas estériles de poliestireno con fondo plano de 96 pozos. Este método permite un análisis semicuantitativo de la actividad metabólica de las biopelículas mediante un ensayo colorimétrico, utilizando una sal de tetrazolio (XTT) que se convierte, por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas, en un producto de color naranja soluble en agua que puede ser medido espectrofotométricamente (Valentín 2007). Se recolectaron un total de 106 muestras clínicas provenientes de unidades medicas y hospitales, las cuales fueron identificadas, y clasificadas como se muestra en el anexo 1 y donde podemos observar que el mayor porcentaje lo ocupan muestras provenientes de mujeres con un 78.3 % , en el caso de hombres fue un 14.1 % y de origen desconocido 7.5% (grafico 4); la edad de incidencia de infecciones se ubica entre los 21-30 años de edad con un 18%, (cuadro 6); el 82 % de las muestras provienen de UMF y el 18 % de Hopitales, (cuadro 8); lo que demuestra que la población se encuentra en etapa de reproducción, y se relaciona con el origen de la

muestra ya que el 67% de éstas, provienen de exudado vaginal, (grafico 5) por lo que la mayoría de nuestra población son mujeres en edad reproductiva y según estudios recientes las infecciones vaginales afectan a millones de mujeres en todo el mundo debido al crecimiento excesivo de levaduras de la flora normal vaginal por lo que se sabe que entre el 40-50% de las mujeres experimentará episodios adicionales y que el 5% desarrollaría la candidiasis recurrente. En nuestra investigación, esto se relaciona con el diagnóstico ya que podemos observar que el 41.5 % proviene de un diagnóstico por cervicovaginitis y el 20% por infección vaginal (cuadro 7). El tracto urinario por sus características fisiológicas y químicas favorece la colonización de bacterias y hongos patógenos, no obstante, se sugiere que el 75% de las mujeres experimentarían candidiasis vulvovaginal en algún momento de su vida, lo que sugiere que las especies de *Candida* son importantes en este sitio del cuerpo. Especies de *Candida* se han asociado con pielonefritis, cistitis y prostatitis, donde se puede favorecer la producción de biopelículas de *Candida* ya que se ha demostrado que para crecer en este sitio la adherencia a la mucosa es indispensable (Pemán 2007; Ramage *et al* 2013).

Por otra parte las muestras provenientes de expectoraciones o exudados faríngeos representan un 22.6%, (grafico 5) proviniendo de infecciones en las vías respiratorias como la faringitis, rinofaringitis, con un 6.6% y 5.7% (cuadro 7) respectivamente. La estrecha proximidad de la tráquea y bronquiolos a la cavidad oral y su entorno cálido y húmedo hace un nicho atractivo para la formación de biopelícula. Los estudios han demostrado que las especies de *Candida* aisladas solas o en combinación de las secreciones respiratorias en las personas con sospecha de Neumonía demostro un aumento en la mortalidad (Ramage *et al* 2013). Dada las condiciones de los espacios en el medio ambiente, y con miles de conidios siendo inhalados cada día, no es sorprendente que los hongos patógenos pueden adherirse, colonizar y formar múltiples complejos de biopelículas en este nicho (Pemán, 2007). Otra posible causa de la incidencia de hongos dentro de las muestras provenientes del tracto respiratorio puede ser debido al uso de antibióticos de amplio espectro (Castrillón 2010; Ramage *et al* 2013).

El porcentaje de muestras provenientes de catéter fue de 4.7%, (grafico 5) los catéteres urinarios son un factor de riesgo importante en las unidades de cuidados intensivos que favorece las infecciones fúngicas nosocomiales. Especies de *Candida* como *albicans*, *parapsilosis* predominan en este campo, como la cuarta causa más común de infección del torrente sanguíneo en pacientes que requieren cuidados intensivos y el agente etiológico más común de infección de biopelículas fúngicas relacionadas, estas infecciones son inherentemente difíciles de resolver y pueden requerir tanto la terapia antifúngica a largo plazo y la extracción física del implante para controlar la infección. No es sorprendente que la presencia de un catéter permanente sea un factor de riesgo definido para el desarrollo de candidemia (Douglas, 2002).

Las muestras provenientes de heridas represento un 3.8%, (grafico 5) cuando la piel se daña por heridas o traumatismos del tejido se inicia el proceso de curación que incluye las fases inflamatoria, proliferativa y de remodelación; sin embargo, con la exposición del tejido subcutáneo que normalmente es estéril, este puede ser infectado por la flora normal cutánea o ambiental, heridas que no cicatrizan se han asociado con la presencia y persistencia de las biopelículas microbianas y representan un porcentaje clínico significativo para los pacientes, ya que recientemente se ha demostrado que las biopelículas son la principal barrera para retrasar la cicatrización de heridas (Castrillón, 2010). La presencia de úlceras y secreciones, donde *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* son los patógenos más importantes involucrados en este proceso, que a menudo se encuentran aislados y se ha demostrado que tienen una asociación no aleatoria dentro de la zona de la herida, ya que participan como flora normal de la piel junto con otros microorganismos. Estudios han demostrado que la necrosis en el proceso de la herida y la infección fúngica por levaduras del genero *Candida* son las más frecuentes, pero *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Engyodontium*, *Malassezia*, *Trichophyton* y *Ulocladium* también se ha reportado que son frecuentes entre las infecciones polimicrobianas. En general, las especies de hongos representaban más del 50% de la carga microbiana en

la mayoría de los especímenes examinados, lo que provocó tratamientos empíricos antifúngicos (Ramage *et al* 2013).

Con respecto a la muestra proveniente de lavado peritoneal, (grafico 5) esta fue extraída de un paciente con diagnóstico de insuficiencia renal que estaba tratado con diálisis, el lavado peritoneal se obtiene para diagnosticar lesiones en pacientes traumatizados por la diálisis, la presencia de hongos patógenos en el área de diálisis favorece la adhesión y colonización de especies de *Candida* así mismo la producción de biopelículas, casi siempre como infección nosocomial (Ramage *et al* 2001).

La muestra de exudado uretral (grafico 5) proviene de un diagnóstico por balanitis, el contanto con este tipo de agentes patógenos en la mucosa de los genitales favorece la formación de biopelículas como forma de resistencia, además de que especies de *Candida* se han asociado con pielonefritis, cistitis, prostatitis y recientes estudios han detectado Biopelículas de *Candida* en los dispositivos uretrales (SINAVE/DGE/SALUD 2009).

Como podemos observar en el grafico 7, la producción de biopelículas en su fase de maduración se presenta alas 48 hrs, con DO mayores a 1.5, ademas podemos observar que la mayoría presenta una disminución de la formación de biopeliculas posterior a las 72 hrs, (fase de dispersión) sin embargo se observa que las DO mas altas fueron presentadas en muestras provenientes de catéter y herida/secresión con una tendencia a conservar su etapa de maduración por mas horas lo que se esperaba en base a la literatura. Por otra parte aunque nadamas se obtuvo una muestra de lavado peritoneal y exudado uretral podemos esperar comportamiento igual al de otras muestras ya que como hemos observado la formación de biopeliculas es diferente entre especies del género y el tipo de muestra.

Al analizar la distribución de cepas según la especie, (grafico 6) observamos que el 82.1 % de las cepas identificadas pertenecen a *C. albicans*, relacionado con el hecho de que la mayoría de las muestras provienen de exudados vaginales, donde *C. albicans* forma parte de la flora normal de la vagina, por otra parte, observamos en segundo

lugar las cepas identificadas como *C. parapsilopsis* con un 14.3 % que aunque la mayoría fueron identificadas en exudado vaginal, también están presentes en otras muestras, anteriormente se menciona que el 67 % de los aislamientos pertenecían a exudado vaginal causadas la mayor parte por cervicovaginitis, causadas por la especie *albicans*, sin embargo, las especies no-*albicans*: *glabrata*, *guilliermondii*, *tropicalis*, *parapsilosis* y *krusei*, han aumentado últimamente, lo que provoca una alta incidencia de las especies no-*albicans* en los casos de cervicovaginitis, sin embargo no está bien establecida la causa (Pemán, 2008). Para la candidemia la ocurrencia de tales especies se ha atribuido a la resistencia a los antifungicos, por lo que no es de extrañar que las especies no-*albicans* estén presentes en este tipo de muestra (Douglas 2003; Ramage *et al* 2001; Ramage *et al* 2005; Ramage *et al* 2013).

Aunque los aislamientos de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, y *C. krusei* fueron significativamente menos, con respecto la producción de biopelículas en comparación con *C. albicans*, Douglas, 2002 menciona que las no-*albicans*, *C. tropicalis* y en particular *C. parapsilosis*, puede producir cantidades significativas de biopelícula cuando se cultivan en medio que contiene 8% de glucosa (Douglas 2002). Esto lo podemos observar en el grafico 8 ya que *albicans*, *parapsilosis* y *glabrata* muestran mayor producción de biopelículas. Esta propiedad que posee *parapsilosis* puede causar candidemia en pacientes que reciben nutrición parenteral, donde la concentración de glucosa en la solución administrada es generalmente alta, por lo que el uso de dispositivos médico, y las soluciones administradas ahora representan otro enfoque para reconocer la verdadera magnitud del problema sobre la formación de biopelículas, que valdría la pena estudiar.

Al identificar las muestras seis presentaban dos cepas las cuales fueron identificadas como *albicans* y *parapsilosis*, (cuadro 9). Si bien existen estudios sobre biopelículas polimicrobianas *in vivo*, y que en estas, las bacterias se encuentran a menudo con especies de *Candida*, modelos *in vitro* en catéter se han utilizado para investigar las posibles interacciones entre especies donde las biopelículas de especies mixtas como *C. albicans* y *Staphylococcus epidermidis* los agentes más comunes relacionadas con el

catéter, han sugerido que las células fúngicas pueden modular la acción de los agentes antibacterianos mientras que las bacterias pueden afectar la actividad de agentes antifúngicos en estas biopelículas mixtas. Por ejemplo, la presencia de *C. albicans* en una biopelícula aumenta la resistencia de estafilococos gram-positivos a la vancomicina. Sin embargo, la resistencia de *Candida* a fluconazol mejoró con la presencia de los estafilococos. Similares observaciones se han hecho con las biopelículas mixtas entre *C. albicans* y estreptococos orales (*Streptococcus gordonii* y *Streptococcus salivarius*) en prótesis de acrílico (Douglas, 2003). Sin embargo, aun no se tiene muchos estudios sobre biopelículas mixtas entre especies del género *Candida*, sería interesante para determinar si una mezcla de especies del género *Candida* produce una matriz más viscosa y si el aumento de la viscosidad en la matriz pueda explicar la resistencia antimicrobiana mejorada de estas biopelículas mixtas (Douglas, 2003; Pranab, 2004).

En este trabajo se demostró que el 98% de las levaduras *Candida albicans*, *parapsilosis*, *glabrata* y *krusei* demostraron la capacidad para formar una biopelícula sobre placas de microtitulación, además de evaluar la viabilidad a las 24, 48 y 72 h de ensayo, (ver gráfico 8) determinando que las 48 h es el tiempo óptimo para evaluar la viabilidad de la biopelícula madura como menciona la literatura (ANEXO 3). Se observó que *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabratai* mostraron el mismo comportamiento para la formación de biopelículas, es decir la actividad metabólica fue alta para la formación de biopelículas mostrando valores de DO mayores a 1.5, por el contrario *C. krusei* mostro valores más bajos DO menor a 1.5 para la formación de biopelícula (ver gráfico 8).

La formación de biopelículas por *Candida* en superficies inertes ha sido recientemente un tema de investigación, y los autores han descrito una relación directa con la virulencia de las especies y su capacidad para producir biopelículas, además de que se ha demostrado que las biopelículas cultivadas con o sin agitación no exhiben diferencias significativas en su producción en pruebas de resistencia a fármacos (Douglas, 2002). En nuestro estudio, las biopelículas fueron clasificadas de la sigue

forma: baja producción de biopelículas (≥ 0.200 a 1.0 DO), media producción de biopelículas (≥ 1.1 a 2.0 DO) y alta producción de biopelículas (≥ 2.1 a 3.0 DO) (ANEXO 4), en base a la distribución de las DO obtenidas. Como lo hemos observado en nuestro estudio con poliestireno y en comparación con otros, (Ramage *et al* 2005) las especies de *Candida* son capaces de adherirse a otros tipos de superficies, demostrando que *C. albicans* identificadas en exudados vaginales demostró una alta capacidad para formar biopelículas pudiendo ser causa de que el huésped se encuentra susceptible, también se detectó la capacidad de *C. parapsilosis* aislado de las muestras de exudado vaginal para adherirse y crecer como biopelículas, si bien es sabido que las biopelículas de *Candida* están influenciadas por factores ambientales y de naturaleza fisicoquímica en su relación con superficies, (Ramage *et al* 2005) y que los mecanismos de adherencia son complejos, e incluyen varios factores; diferentes temperaturas y condiciones de crecimiento en relación a los utilizados en este estudio observamos que *C. parapsilosis* y *C. glabrata*, cuando se compara con *C. albicans*, demostraron una tendencia al aumento en la adherencia a las superficies acrílicas, estos resultados coinciden con la evidencia clínica de que el uso de dispositivos médicos predispone al paciente a desarrollar candidiasis.

La formación de biopelículas es evaluada midiendo la viabilidad presente en la células contenidas en la biopelícula, mediante un ensayo colorimétrico, utilizando una sal de tetrazolio (XTT) que se convierte, por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas, en un producto de color naranja soluble en agua que puede ser medido espectrofotométricamente (Valentín 2007), como se menciono anteriormente, en base a esto, observamos el mismo comportamiento en la viabilidad de las células presentes en las biopelículas de especies como: *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* demostrando una mayor capacidad para formar biopelículas a las 48 h del ensayo, y observando una disminución en la viabilidad a las 72 h pudiéndose presentar la fase de dispersión donde las células adheridas en la biopelículas empiezan a desprenderse para iniciar un nuevo ciclo de colonización, diferencia de *C. krusei* que demostró su máxima viabilidad dentro de las primeras 24 h de la formación de biopelícula, y después se observa su disminución, lo que

demuestra que la formación de biopelículas como factor de virulencia esta en su máximo de maduración en las primeras 48 h después de la infección (ANEXO 4). Nuestro estudio coincide con otros (Ramage *et al* 2013) en cuanto a que existe una gran variabilidad en la producción de biopelícula entre aislamientos clínicos de diversos orígenes anatómicos, en la actualidad existe la necesidad de propuestas diferentes como sistemas y mecanismos para el tratamiento de las infecciones asociadas a biopelículas. Estas propuestas incluyen materiales que resisten la colonización, nuevos dispositivos recubiertos de antimicrobianos, moléculas inhibidoras del *Quorum-sensing* o, incluso, dispositivos capaces de emitir ultrasonidos o corrientes eléctricas para impedir su colonización o aumentar la disgregación de la biopelícula. Además de estos dispositivos modificados, también se está evaluando la eficacia de nuevos antibióticos o la inmersión de los dispositivos en soluciones microbicidas.

10. CONCLUSIÓN

Se determinó la formación de biopelículas estandarizando el método descrito por Ramage, (2001) con XTT en muestras clínicas recolectadas de unidades hospitalarias y clínicas, las cuales fueron identificadas mediante pruebas microbiológicas.

La mayor cantidad de especies aisladas correspondió a *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

La capacidad de producir biopelículas se presentó en el 98.1 % de los aislamientos clínicos demostrando que existe diferencia en la producción de biopelícula entre las especies de *candida* y el tipo de muestra clínica aislada.

C. albicans y *C. parapsilosis* mostraron mayor capacidad para adherirse y formar biopelículas en comparación con otras especies.

Por otro lado, el método que se propone podría ser de gran utilidad para profundizar en el conocimiento científico sobre este tema que es de notable importancia clínica, teniendo en cuenta la ausencia de equipos y reactivos en laboratorios clínicos de unidades hospitalarias para diagnosticar y producir la formación de biopelículas y demostrar que la formación de biopelícula está íntimamente asociado con la capacidad de provocar una infección y como tal debe ser considerada como un factor determinante durante la candidosis.

REFERENCIAS

1. Andes D, Nett J, & Oschel P. (2004) Development and Characterization of an In Vivo Central Venous Catheter *Candida albicans* Biofilm Model. *Infection and Immunity, Microbiology*. 72, (10) 6023-6031.
2. Arenas R. (2011) *Micología Médica Ilustrada*, México: Mc Graw Hill. pp.
3. Bonifaz A. (2010) *Micología Médica*, México: Mc Graw Hill. pp. 279-300
4. Calderone R. (2002) *Candida and Candidiasis*. *ESM Press*. Washington, D.C
5. Carvalho A, Gursky L, & Rosa R. (2010) Non-steroidal anti-inflammatory drugs may modulate the protease activity of *Candida albicans*. *Microbial Pathogenesis*. 49, 315-322.
6. Castañón Olivares L. (2012) *Candidiasis ó Candidosis*, Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Recuperado el día 10 de abril del 2013.
7. Castrillón Rivera, L. E., Palma Ramos, A., & Padilla Desgarenes, C. (2005) Factores de Virulencia de *Candida sp*. *Revista Mexicana de Dermatología*, 49 (1), 12-27.
8. Castrillón Rivera, L. E., Palma Ramos, A., & Padilla Desgarenes, M. (2010). Importancia de las Biopelículas en la Práctica Médica. *Revista Mexicana de Dermatología*. 54 (1), 14-24.
9. Coogan M, fidel P, & Komesu M. (2011) *Candida* and Mycotic Infections. *International and American Associations for Dental Research*. 19, 130-138.
10. Dalleau S, & Cateau E. (2008) In Vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 31, 572 – 576.
11. Douglas J, L. (2002) Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19: 139-143.
12. Douglas J, L. (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *TRENDS in Microbiology*. 11 (1) 30-36.

13. Elke Peters, & Hans J Nelis, (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*. 72, 157-165.
14. Estivill D, Arias A, & Torres A. (2011) Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials, *Journal of Microbiological Methods*. 86, 238-242.
15. Franca E, Andrade C, Furantelo L, & Serpa R. (2011) Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of a clinical strain of *Candida tropicalis* and biofilm formation by variant phenotypes. *Micron*, 42, 726-732.
16. Hasan F, Xess I, & Wang X. (2009) Biofilm Formation in Clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and Infection*. 11, 753-761.
17. Ibarra C, Villar M, & Gaitán L. (2012) formation and quantification assay of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* mixed biofilm. *Revista Iberoamericana de Micología*. 02,(003),1-9
18. Jagath L. Kadurugamuwa. (2003) Direct Continuous Method for Monitoring Biofilm Infection in a Mouse Model. *Infection and Immunity*. 71 (2) 882-890.
19. Kimberly k. Scott. (2007) Microplate alamar blue assay for susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *ISHAM Medical Mycology*. 45, 603-607.
20. Koneman. (2008) *Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas en color*. (6Ed) Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. p. 1171.
21. Lopez M. Ruben, & Mendez T. (2012) *Micología Médica procedimientos para el Diagnóstico del Laboratorio*. México, Trillas. pp.91-98.
22. Mandal S, Migliolo L, & Franco O. (2011) Identification of an antifungal peptide from *Trapa natans* fruits with inhibitory effects on *Candida tropicalis* biofilm formation. *Peptides*. 32, 1741-1747.
23. Merino G, & Cedillo R. (2011) Análisis Morfológico de Biopelículas de *Candida albicans* producidas en diferentes condiciones de pH y temperatura analizadas por microscopía óptica y de fuerza atómica. *Revista Mexicana de Micología*. 33,1-8.

24. Messier C, Epifano F, & Genovese S. (2011) Inhibición of *Candida albicans* biofilm formation and yeast-hyphal transition by 4-hydroxycordoin. *Phytomedicine*, 18, 380-383.
25. Paiva L, & Vidigal P, & Donatti L. (2012) Assessment of *in vitro* biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. *Micron* 43, 497-502.
26. Pemán J. (2007) Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. *Revista Iberoamericana de Micología*, cap 11.
27. Pemán J. Cantón, E. & Valentín A. (2008). Actividad de la anidulafungina sobre Biopelículas de *Candida*. *Revista Iberoamericana de Micología* 25, 124-128.
28. Pierce G, Uppuluri P, & Tristan A. (2008) A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal seceptibility testing. *NIH-PA Author Manuscript*. 3 (9),1494-1500.
29. Pranab K. Mukherjee. (2004) *Candida* biofilm resistance. *Drug Resistance Updates*. 7, 301-309.
30. Quindós G, & Villar M. (2009). Actividad de la micafungina contra las biopelículas de *Candida*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26 (1), 49-95.
31. Ramage G, & Craig Wiliams. (2013) The Clinical Importance of Fungal Biofilms. *Advances in Applied Microbiology* 84, 27-83
32. Ramage G., & Saville, S. (2005) *Candida* Biofilms: an Update. *American Society for Microbiology*. 4 (4), 633- 638.
33. Ramage G., & Vande Walle, K. (2001) Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 18, 163-170.
34. Ruzicka f, Horka M, & Hola V. (2010) The differences in the isoelectric points of biofilms- positive and biofilm- negative *Candida parapsilosis* strains. *Journal of Microbiological Methods*. 80, 299-301.
35. Silva V, & Cabrera M. (2003) Prevalencia de los serotipos de *Candida albicans* en aislamientos de hemocultivo en Chile y primer caso de candidemia por *Candida dubliniensis*. *Revista Iberoamericana de Micología* 20, 46-51.

36. Silva J, Seneviratne J, Prarahitiyawa N, & Rosa E. (2008) Improvement of XTT Assay Performance for Studies Involving *Candida albicans* Biofilms. *Brazil Dentistry J.* 19, (4) 364- 369.
37. SINAVE/DGE/SALUD/Información epidemiológica de morbilidad, Anuario 2009, Versión ejecutiva. Candidiasis Urogenital
38. Taniguchi L, & Faria B. (2009) Proposal of a low-cost protocol for colorimetric semi-quantification of secretory phospholipase by *Candia albicans* grown in planktonic and biofilm phases. *Journal of Microbiological Methods.* 78, 171- 174.
39. Valentín A, & Cantón, E. (2007) Actividad in vitro de la anfotericina B y la anidulafungina sobre Biopelículas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. *Revista Iberoamericana de Micología,* 24, 272-277.
40. Xiaogang Li. (2003) Cuantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. Department of biology, *Microbiology,* 149, 353-362.
41. Ye Jin, & Lakshman P. Samaranayake. (2004) Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Archives of oral Biology.* 49, 789-798.

ANEXOS

ANEXO 1

Identificación y origen de la cepa.

FOLIO	DONACIÓN	FECHA DE RECIBIDO	GRO F/M	EDAD	TIPO DE MUESTRA	IDENTIFICACIÓN		DIAGNÓSTICO
						PRESUNTIVO	CONFIRMATIVO	
LTV001	UMF-52	13/06/12	F	23	E.VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	ND
LTV002	UMF-52	22/06/12	F	23	E.VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	POP
LTV003	H. GRAL -57	22/06/12	F	ND	ESPECTORACION	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	PB.Tuberculosis
LTV004	UMF-52	31/07/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV005	UMF-52	31/07/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV006	UMF-52	31/07/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV007	UMF-52	31/07/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV008	UMF-52	31/07/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV009	UMF-52	31/07/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV010	UMF-52	31/07/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV011	UMF-52	31/07/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV012	UMF-52	31/07/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV013	UMF-52	13/08/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV014	UMF-52	13/08/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV015	UMF-52	13/08/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV016	UMF-52	13/08/12	F	40	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV017	UMF-52	13/08/12	F	32	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV018	UMF-52	13/08/12	F	33	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV019	UMF-52	13/08/12	F	39	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV020	H. GRAL -57	14/08/12	ND	ND	Herida	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección
LTV021	H. GRAL -57	14/08/12	ND	ND	Catéter	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Dialisis
LTV022.1	H. GRAL -57	14/08/12	ND	ND	L. Peritoneal	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Dialisis
LTV022.2	H. GRAL -57	14/08/12	ND	ND	L. Peritoneal	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Dialisis
LTV023.1	H. GRAL -57	14/08/12	ND	ND	Cateter	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Neumonía

FOLIO	DONACIÓN	FECHA DE RECIBIDO	GRO F/M	EDAD	TIPO DE MUESTRA	IDENTIFICACIÓN		DIAGNÓSTICO
						PRESUNTIVO	CONFIRMATIVO	
LTV023.2	H. GRAL -57	14/08/12	ND	ND	Cateter	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Neumonía
LTV024	UMF-52	17/08/12	F	36	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV025	UMF-52	17/08/12	F	43	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV026	UMF-52	17/08/12	F	22	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV027	UMF-52	17/08/12	F	20	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV028	H. GRAL -VV	20/08/12	F	ND	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	ND
LTV029	H. GRAL -VV	20/08/12	F	17	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Inf. V.U/Cervicovaginitis
LTV030.1	H. GRAL -VV	20/08/12	F	42	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Infección Vag.
LTV030.2	H. GRAL -VV	20/08/12	F	42	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Infección Vag.
LTV031	H. GRAL -VV	20/08/12	M	3	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	ND
LTV032	H. GRAL -VV	20/08/12	M	44	ESPECTORACION	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Neumonía
LTV033	UMF-62	20/08/12	F	25	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Neoplasia intraepitelial cervical
LTV034	UMF-62	20/08/12	F	52	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Diabetes Tipo II
LTV035	UMF-62	20/08/12	F	41	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Miomatosis uterina
LTV036	UMF-62	20/08/12	F	45	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV037	UMF-62	20/08/12	F	23	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV038	UMF-52	24/08/12	F	22	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV039	UMF-52	24/08/12	F	27	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV040	UMF-52	24/08/12	F	49	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV041	UMF-62	27/08/12	F	30	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV042	UMF-62	27/08/12	F	22	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV043	UMF-62	27/08/12	F	47	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Cervicovaginitis
LTV044	UMF-62	27/08/12	F	36	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	Cervicovaginitis
LTV045	UMF-62	27/08/12	F	45	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	Cervicovaginitis
LTV046	UMF-62	27/08/12	F	32	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Cervicovaginitis
LTV047.1	UMF-62	27/08/12	F	40	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV047.2	UMF-62	27/08/12	F	40	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Cervicovaginitis

FOLIO	DONACIÓN	FECHA DE RECIBIDO	GRO F/M	EDAD	TIPO DE MUESTRA	IDENTIFICACIÓN		DIAGNÓSTICO
						PRESUNTIVA	CONFIRMATIVO	
LTV048	UMF-62	27/08/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV049	UMF-62	27/08/12	F	24	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV050	UMF-52	31/08/12	F	63	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV051	UMF-52	31/08/12	F	41	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Cervicovaginitis
LTV052	UMF-52	31/08/12	F	41	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV053	UMF-52	31/08/12	F	36	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV054	UMF-52	31/08/12	F	26	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV055	UMF-52	31/08/12	F	34	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Cervicovaginitis
LTV056	UMF-52	31/08/12	F	16	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV057	UMF-52	31/08/12	F	24	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Cervicovaginitis
LTV058	UMF-52	31/08/12	F	22	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV059	UMF-62	03/09/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV060	UMF-62	03/09/12	F	38	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV061	UMF-62	03/09/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV062	UMF-62	03/09/12	F	24	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV063	UMF-62	03/09/12	F	32	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Cervicovaginitis
LTV064	UMF-62	03/09/12	F	52	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV065	UMF-62	03/09/12	F	39	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Cervicovaginitis
LTV066	UMF-62	03/09/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV067	UMF-62	03/09/12	F	ND	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV068	UMF-62	03/09/12	F	39	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV069	UMF-62	03/09/12	F	40	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV070	UMF-62	03/09/12	F	30	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV071	H. GRAL -VV	03/09/12	ND	ND	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	ND
LTV072	H. GRAL -VV	03/09/12	ND	ND	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	ND
LTV073	H. GRAL -VV	03/09/12	ND	ND	SECRECION	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	ND
LTV074	H. GRAL -VV	03/09/12	ND	ND	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	ND
LTV075	UMF-62	03/09/12	F	38	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis

LTV076	H. GRAL-57	03/09/12	M	ND	CATETER	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Dialisis
FOLIO	DONACIÓN	FECHA DE RECIBIDO	GRO F/M	EDAD	TIPO DE MUESTRA	IDENTIFICACIÓN		DIAGNÓSTICO
						PRESUNTIVO	CONFIRMATIVO	
LTV077	H. GRAL-57	03/09/12	M	ND	CATETER	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Dialisis
LTV078	H. GRAL-57	03/09/12	F	ND	CATETER	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Dialisis
LTV079	H. GRAL-57	03/09/12	F	ND	HERIDA	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Absceso cerebral
LTV080	H. GRAL-57	03/09/12	M	ND	H.MUÑO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Diabetico
LTV081	UMF-63	05/09/12	M	4	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	RINITIS
LTV082	UMF-63	05/09/12	M	1	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	RINOFARINGITIS
LTV083	UMF-63	05/09/12	F	26	E. VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Cervicovaginitis
LTV084	UMF-63	05/09/12	F	6	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	FA. CRONICA
LTV085	UMF-63	05/09/12	F	6	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	FA. CRONICA
LTV086	UMF-62	17/09/12	F	28	E.VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	P.O Cesaría
LTV087	UMF-63	20/09/12	M	7	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	FARINGITIS
LTV088	UMF-63	20/09/12	F	ND	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	FARINGITIS
LTV089	UMF-63	20/09/12	M	ND	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	FARINGITIS
LTV090	UMF-63	20/09/12	M	56	E.URETRAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	BALANITIS
LTV091	UMF-63	20/09/12	F	42	E.VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	CERVICOVAGINITIS
LTV092	UMF-63	20/09/12	F	67	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	FARINGITIS
LTV093	UMF-63	20/09/12	M	ND	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	FARINGITIS
LTV094	UMF-63	20/09/12	F	45	E.VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	CERVICOVAGITIS
LTV095	UMF-63	20/09/12	F	37	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	FARINGITIS
LTV096	UMF-63	20/09/12	M	24	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	TOS CRONICA
LTV097	UMF-63	20/09/12	M	5	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	RINOFARINGITIS
LTV098	UMF-63	20/09/12	F	18	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	FARINGITIS
LTV099	UMF-63	20/09/12	F	22	E.VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	CERVICOVAGINITIS
LTV100	UMF-63	20/09/12	F	43	E.VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	CERVICOVAGINITIS
LTV101	UMF-63	20/09/12	M	3	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	RINOFARINGITIS

LTV102	UMF-63	20/09/12	M	7	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	RINOFARINGITIS
LTV103	UMF-63	20/09/12	F	53	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	ASMA

FOLIO	DONACIÓN	FECHA DE RECIBIDO	GRO F/M	EDAD	TIPO DE MUESTRA	IDENTIFICACIÓN		DIAGNÓSTICO
						PRESU	CONFI	
LTV104.1	UMF-63	20/09/12	F	53	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	RINITIS ALERGICA
LTV104.2	UMF-63	20/09/12	F	53	E.FARINGEO	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	RINITIS ALERGICA
LTV105.1	UMF-52	21/09/12	F	31	E.VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis
LTV105.2	UMF-52	21/09/12	F	31	E.VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	Cervicovaginitis
LTV106	UMF-52	21/09/12	F	54	E.VAGINAL	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Cervicovaginitis

ND: No Determinado.

ANEXO 2

Preparación y cálculos de reactivos

Medios de cultivo y conservación de hongos

- **Agar Dextrosa Sabouraud®BDBioxon**

- **Caldo Dextrosa Sabouraud**

Formula aproximada para 1000 mL de agua purificada.

Dextrosa®BDBioxon 40.0 g

Peptona de carne ®BDBioxon 5.0 g

Peptona de caseína ®BDBioxon 5.0 g

pH 5.6 ± 0.2

- **Caldo YPD**

Formula aproximada para 1000 mL de agua purificada.

YeastExtract®DIFCO 10g

Peptone Bacteriological Technical
 ®DIFCO 20g

Dextrosa ®BDBioxon 20g

pH 7.4 ± 0.2

Reactivos para formación de Biopelículas

- **Menadiona ®SIGMA-ALDRICH**

Synonym: 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, Vitamin K3

Formula: C₁₁H₈O₂

Molecular Weight: 172.18

- **Phosphate Buffered Saline ®SIGMA-ALDRICH**
- **PBS - DEXTROSA**

PBS ®SIGMA-ALDRICH

Dextrosa ®BDBioxon

- **XTT Sal de sodio ®SIGMA-ALDRICH**

Synonym: **2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt.**

Formula: C₂₂H₁₆N₇NaO₁₃S₂

Molecular Weight: 673.5

ANEXO 3. Resultados Desviación Estandar (DS) y Densidad Optica (DO) de la formación de Biopelículas por muestra.

					24 horas		48 horas		72 horas	
FOLIO	GENERO	EDAD	MUESTRA/DX	ESPECIE	DS	DO	DS	DO	DS	DO
C. Ref	ND	ND	ATCC 32354 CONTROL +	<i>C. albicans</i>	0.1045	1.803	0.221	2.121	0.3082	2.341
LTV001	F	23	E.VAGINAL/ND	<i>C. albicans</i>	0.118	1.145	0.362	2.387	1.033	1.273
LTV002	F	23	E.VAGINAL/POP	<i>C. albicans</i>	0.204	1.417	0.607	2.108	0.143	0.191
LTV003	F	ND	EXPECTORACION/TUBERCULOSIS	<i>C. albicans</i>	0.047	0.341	0.057	2.841	0.145	2.345
LTV004	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.435	0.683	0.104	2.692	0.284	2.072
LTV005	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.003	0.431	0.180	2.710	0.668	1.411
LTV006	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.742	1.058	0.536	2.375	0.675	0.844
LTV007	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.378	0.678	0.516	1.862	0.594	2.361
LTV008	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.483	0.879	0.065	0.373	0.146	0.392
LTV009	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.315	0.669	0.734	2.064	0.451	0.390
LTV010	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.536	0.891	0.127	2.359	0.126	0.311
LTV011	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.436	1.484	1.055	2.431	0.050	0.342
LTV012	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.410	1.198	0.712	2.106	0.574	1.231
LTV013	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.645	1.284	0.860	1.245	0.023	0.128
LTV014	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.408	1.063	0.636	0.900	0.446	0.561
LTV015	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	1.032	1.025	0.107	0.280	0.091	0.198
LTV016	F	40	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.458	1.394	0.395	0.406	0.011	0.044
LTV017	F	32	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.437	1.369	0.335	0.496	0.113	0.197
					24 horas		48 horas		72 horas	
FOLIO	GENERO	EDAD	MUESTRA/DX	ESPECIE	DS	DO	DS	DO	DS	DO
LTV018	F	33	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.622	0.848	0.108	0.105	0.332	0.198
LTV019	F	39	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.196	0.899	0.912	1.514	0.107	0.236

LTV020	ND	ND	HERIDA/INFECCIÓN	<i>C. albicans</i>	0.731	1.139	0.492	2.315	0.054	0.810
LTV021	ND	ND	CATETER/I.RENAL	<i>C. albicans</i>	0.163	1.608	0.018	3.033	0.516	2.044
LTV022.1	ND	ND	LAVADO PERITONEAL/I. RENAL	<i>C. albicans</i>	0.258	1.525	0.668	1.970	0.152	0.733
LTV022.2	ND	ND	LAVADO PERITONEAL/I. RENAL	<i>C.parapsilosis</i>	0.686	2.156	0.444	1.754	0.661	1.117
LTV023.1	ND	ND	CATETER/NEUMONIA	<i>C. albicans</i>	0.577	1.897	0.124	2.870	0.218	1.242
LTV023.2	ND	ND	CATETER/NEUMONIA	<i>C.parapsilosis</i>	1.024	1.531	0.843	2.290	0.163	1.249
LTV024	F	36	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.808	1.605	0.452	0.906	0.276	0.577
LTV025	F	43	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.357	1.081	0.009	3.052	0.175	0.282
LTV026	F	22	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	1.027	1.343	0.902	2.025	0.237	0.303
LTV027	F	20	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.681	1.775	0.756	0.993	0.076	0.104
LTV028	F	ND	E.FARINGEO/ND	<i>C. albicans</i>	0.340	1.336	0.199	1.582	0.168	1.365
LTV029	F	17	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.865	1.978	0.199	0.674	0.159	0.475
LTV030.1	F	42	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.350	1.434	0.416	2.744	0.219	0.730
LTV030.2	F	42	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C.parapsilosis</i>	0.082	0.710	0.446	2.763	0.608	2.333
LTV031	M	3	E.FARINGEO/ND	<i>C. albicans</i>	0.160	1.155	0.318	1.683	0.085	0.204
LTV032	M	44	ESPECTORACION/NEUMONIA	<i>C. albicans</i>	0.247	0.945	0.016	3.015	0.326	0.348
LTV033	F	25	E. VAGINAL/NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL	<i>C. albicans</i>	0.018	0.649	0.010	2.976	0.600	1.687
LTV034	F	52	E. VAGINAL/DIABETES TIPO II	<i>C. albicans</i>	0.012	0.643	0.213	2.861	0.375	1.000
					24 horas		48 horas		72 horas	
FOLIO	GENERO	EDAD	MUESTRA/DX	ESPECIE	DS	DO	DS	DO	DS	DO
LTV035	F	41	E. VAGINAL/MIOMATOSIS UTERINA	<i>C. albicans</i>	0.069	0.652	0.039	2.994	0.246	0.350
LTV036	F	45	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.129	0.816	0.047	2.969	0.052	0.223
LTV037	F	23	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.763	1.671	0.258	2.433	1.010	0.937
LTV038	F	22	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.374	1.839	0.105	2.507	0.087	0.354
LTV039	F	27	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.634	1.690	0.070	1.417	0.203	0.401
LTV040	F	49	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.232	0.693	0.365	1.947	0.162	0.815

LTV041	F	30	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.122	1.191	0.542	1.750	0.190	0.602
LTV042	F	22	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	1.120	0.887	0.215	0.674	0.117	0.512
LTV043	F	47	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>	0.187	2.300	0.091	2.533	0.532	1.791
LTV044	F	36	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. glabrata</i>	0.121	1.533	0.110	1.697	0.110	0.964
LTV045	F	45	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. krusei</i>	0.197	0.431	0.162	0.487	0.032	0.182
LTV046	F	32	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>	0.204	1.863	0.038	2.485	0.162	1.786
LTV047.1	F	40	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.794	1.890	0.134	0.237	0.077	0.493
LTV047.2	F	40	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>	0.565	2.032	0.051	2.665	0.211	2.372
LTV048	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.062	0.459	0.221	0.583	0.222	0.581
LTV049	F	24	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.519	1.190	0.152	0.444	0.112	0.501
LTV050	F	63	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.378	0.906	0.076	0.221	0.083	0.210
LTV051	F	41	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>	0.231	2.241	0.199	1.854	0.065	2.490
LTV052	F	41	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.144	0.194	0.073	0.133	0.026	0.115
LTV053	F	36	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.283	2.235	0.130	2.385	0.195	2.881
LTV054	F	26	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.023	2.525	0.229	2.288	0.163	1.805
					24 horas		48 horas		72 horas	
FOLIO	GENERO	EDAD	MUESTRA/DX	ESPECIE	DS	DO	DS	DO	DS	DO
LTV055	F	34	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>	0.062	2.519	0.123	2.204	0.240	2.755
LTV056	F	16	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.029	2.196	0.061	2.244	0.010	2.903
LTV057	F	24	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>	0.083	2.583	0.405	0.656	0.045	0.095
LTV058	F	22	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.247	2.257	0.087	2.299	0.282	2.140
LTV059	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.836	1.423	0.027	2.357	0.031	2.981
LTV060	F	38	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.053	2.384	0.597	1.358	0.270	1.359
LTV061	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.854	1.148	0.092	0.462	0.202	0.574
LTV062	F	24	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.152	2.316	0.552	1.239	0.179	1.279
LTV063	F	32	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>	0.115	2.121	0.226	0.420	0.107	0.432

LTV064	F	52	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.062	1.891	0.256	2.303	0.377	2.453
LTV065	F	39	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>	0.159	2.448	0.044	2.441	0.029	2.904
LTV066	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.180	2.398	0.186	1.663	0.594	2.593
LTV067	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.563	1.789	0.074	2.381	0.220	1.554
LTV068	F	39	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.411	2.049	0.590	2.037	0.281	2.721
LTV069	F	40	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.100	2.501	0.118	2.261	0.192	0.635
LTV070	F	30	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.108	2.487	0.079	2.315	0.274	0.561
LTV071	ND	ND	E.FARINGEO/ND	<i>C. albicans</i>	0.350	2.119	0.584	1.741	0.394	2.516
LTV072	ND	ND	E.FARINGEO/ND	<i>C. albicans</i>	0.601	1.692	0.130	0.324	0.037	0.102
LTV073	ND	ND	SECRECION/ND	<i>C. albicans</i>	0.087	2.404	0.076	2.386	0.028	2.959
LTV074	ND	ND	E.FARINGEO/ND	<i>C. albicans</i>	0.063	2.231	0.407	1.955	0.118	2.805
LTV075	F	38	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.027	3.052	0.091	2.261	0.184	2.855
					24 horas		48 horas		72 horas	
FOLIO	GENERO	EDAD	MUESTRA/DX	ESPECIE	DS	DO	DS	X	DS	X
LTV076	M	ND	CATETER/I.RENAL	<i>C. albicans</i>	0.094	2.394	0.004	2.321	0.027	2.958
LTV077	M	ND	CATETER/I.RENAL	<i>C. albicans</i>	0.181	1.993	0.178	2.294	0.022	2.955
LTV078	F	ND	CATETER/I. RENAL	<i>C. albicans</i>	0.396	2.571	0.095	2.446	0.022	2.983
LTV079	F	ND	HERIDA/ABSCESEO CEREBRAL	<i>C. albicans</i>	0.289	2.729	0.082	2.479	0.586	2.326
LTV080	M	ND	SECRECIÓN MUÑON/DIABETES	<i>C. albicans</i>	0.163	2.157	0.158	1.933	0.029	2.939
LTV081	M	4	E.FARINGEO/RINITIS	<i>C. albicans</i>	0.444	0.560	0.373	0.385	0.076	0.222
LTV082	M	1	E.FARINGEO/RINOFARINGITIS	<i>C. albicans</i>	0.302	0.943	0.097	0.201	0.009	0.036
LTV083	F	26	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>	0.116	1.814	0.163	2.470	0.689	1.974
LTV084	F	6	E.FARINGEO/FARINGOAMIGDALITIS CRONICA	<i>C. albicans</i>	0.822	1.167	0.389	1.864	0.089	0.430
LTV085	F	6	E.FARINGEO/FARINGOAMIGDALITIS CRONICA	<i>C. albicans</i>	0.326	1.054	0.370	1.673	0.041	0.195
LTV086	F	28	E.VAGINAL/EMBARAZO POR CESARIA	<i>C. parapsilosis</i>	0.095	1.996	0.098	2.503	0.133	2.234

LTV087	M	7	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. glabrata</i>	0.221	1.737	0.117	2.613	0.134	2.373
LTV088	F	ND	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. albicans</i>	0.616	1.831	0.143	1.373	0.133	1.501
LTV089	M	ND	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. albicans</i>	0.481	1.679	0.580	1.724	0.047	0.087
LTV090	M	56	E.URETRAL/BALANITIS	<i>C. albicans</i>	0.056	0.701	0.556	1.480	0.090	0.392
LTV091	F	42	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.093	1.943	0.087	2.277	0.039	0.080
LTV092	F	67	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. albicans</i>	0.105	1.893	0.617	1.587	0.018	0.139
LTV093	M	ND	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. albicans</i>	0.521	1.826	0.488	1.929	0.384	0.320
LTV094	F	45	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C.krusei</i>	0.500	2.305	0.681	1.489	0.422	1.142
					24 horas		48 horas		72 horas	
FOLIO	GENERO	EDAD	MUESTRA/DX	ESPECIE	DS	X	DS	X	DS	X
LTV095	F	37	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. albicans</i>	0.248	2.108	0.725	1.536	0.080	0.149
LTV096	M	24	E.FARINGEO/TOS CRONICA	<i>C. albicans</i>	0.431	2.004	0.202	2.264	0.606	1.478
LTV097	M	5	E.FARINGEO/RINOFARINGITIS	<i>C. albicans</i>	0.045	2.126	0.094	2.134	0.711	1.601
LTV098	F	18	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. albicans</i>	0.168	1.944	0.940	1.293	0.059	0.137
LTV099	F	22	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.508	1.576	0.236	2.296	0.094	0.197
LTV100	F	43	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.713	1.650	0.172	2.338	0.167	0.206
LTV101	M	3	E.FARINGEO/RINOFARINGITIS	<i>C. albicans</i>	0.953	1.704	0.715	1.427	0.023	0.158
LTV102	M	7	E.FARINGEO/RINOFARINGITIS	<i>C. albicans</i>	0.230	1.796	0.076	2.376	0.335	1.340
LTV103	F	53	E.FARINGEO/ASMA	<i>C.parapsilosis</i>	0.655	2.683	0.549	0.771	0.489	1.513
LTV104.1	F	53	E.FARINGEO/RINITIS ALERGICA	<i>C. albicans</i>	0.342	2.125	0.514	1.357	0.137	0.217
LTV104.2	F	53	E.FARINGEO/RINITIS ALERGICA	<i>C.parapsilosis</i>	0.225	2.020	0.716	1.420	0.418	0.668
LTV105.1	F	31	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C.albicans</i>	0.530	1.696	0.497	1.453	0.611	0.737
LTV105.2	F	31	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C.parapsilosis</i>	0.200	1.844	0.239	1.912	0.196	0.523
LTV106	F	54	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.239	2.230	0.985	1.581	0.990	1.523

ANEXO 4. Distribución según el rango de producción de formación de Biopelículas.

FOLIO	GRO	EDAD	MUESTRA/DX	ESPECIE	DO a 24 horas						DO a 48 horas						DO a 72 horas			
					≤ 0.200	≥ 0.2 a 1.0	≥ 1.1 a 2.0	≥ 2.1 a 3.0	≤ 0.200	≥ 0.2 a 1.0	≥ 1.1 a 2.0	≥ 2.1 a 3.0	≤ 0.200	≥ 0.2 a 1.0	≥ 1.1 a 2.0	≥ 2.1 a 3.0				
LTV001	F	23	E.VAGINAL/ND	<i>C. albicans</i>			1.145					2.387							1.273	
LTV002	F	23	E.VAGINAL/POP	<i>C. albicans</i>			1.417					2.108	0.191							
LTV003	F	ND	ESPECTORACION/TUBERCULOSIS	<i>C. albicans</i>		0.341						2.841								2.345
LTV004	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>		0.683						2.692								2.072
LTV005	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>		0.431						2.710							1.411	
LTV006	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.058					2.375		0.844						
LTV007	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>		0.678					1.862									2.361
LTV008	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>		0.879				0.373				0.392						
LTV009	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>		0.669						2.064		0.390						
LTV010	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>		0.891						2.359		0.311						
LTV011	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.484					2.431		0.342						
LTV012	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.198					2.106				1.231				
LTV013	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.284				1.245		0.128							
LTV014	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.063			0.900				0.561						
LTV015	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.025			0.280				0.198						
LTV016	F	40	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.394			0.406				0.044						
LTV017	F	32	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.369			0.496				0.197						
LTV018	F	33	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>		0.848			0.105					0.198						
LTV019	F	39	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>		0.899					1.514			0.236						
LTV020	ND	ND	HERIDA/INFECCIÓN	<i>C. albicans</i>			1.139					2.315		0.810						
LTV021	ND	ND	CATETER/I. RENAL	<i>C. albicans</i>			1.608					3.033								2.044
LTV022.1	ND	ND	LAVADO PERITONEAL/I.RENAL	<i>C. albicans</i>			1.525				1.970			0.733	1.117					
LTV022.2	ND	ND	LAVADO PERITONEAL/I.RENAL	<i>C.parapsilosis</i>				2.156			1.754									1.242
LTV023.1	ND	ND	CATETER/NEUMONIA	<i>C. albicans</i>			1.897					2.870								1.249
					DO a 24 horas						DO a 48 horas						DO a 72 horas			

FOLIO	GRO	EDAD	MUESTRA/DX	ESPECIE	≤ 0.200	≥0.2 a 1.0	≥1.1 a 2.0	≥2.1 a 3.0	≤ 0.200	≥0.2 a 1.0	≥1.1 a 2.0	≥2.2 a 3.0	≤ 0.200	≥0.2 a 1.0	≥1.1 a 2.0	≥2.1 a 3.0
LTV023.2	ND	ND	CATETER/NEUMONIA	<i>C.parapsilosis</i>			1.531					2.290				
LTV024	F	36	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.605		0.906					0.577		
LTV025	F	43	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.081					3.052		0.282		
LTV026	F	22	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.343					2.025		0.303		
LTV027	F	20	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.775		0.993				0.104			
LTV028	F	ND	E.FARINGEO/ND	<i>C. albicans</i>			1.336				1.582				1.365	
LTV029	F	17	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.978		0.674					0.475		
LTV030.1	F	42	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.434					2.744		0.730		
LTV030.2	F	42	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C.parapsilosis</i>		0.710						2.763				2.333
LTV031	M	3	E.FARINGEO/ND	<i>C. albicans</i>			1.155				1.683			0.204		
LTV032	M	44	ESPECTORACION/NEUMONIA	<i>C. albicans</i>		0.945						3.015		0.348		
LTV033	F	25	E. VAGINAL/NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL	<i>C. albicans</i>		0.649						2.976			1.687	
LTV034	F	52	E. VAGINAL/DIABETES TIPO II	<i>C. albicans</i>		0.643						2.861			1.000	
LTV035	F	41	E. VAGINAL/MIOMATOSIS UTERINA	<i>C. albicans</i>		0.652						2.994		0.350		
LTV036	F	45	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>		0.816						2.969		0.223		
LTV037	F	23	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.671					2.433		0.937		
LTV038	F	22	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.839					2.507		0.354		
LTV039	F	27	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.690				1.417			0.401		
LTV040	F	49	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>		0.693					1.947			0.815		
LTV041	F	30	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.191				1.750			0.602		
LTV042	F	22	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>		0.887			0.674					0.512		
LTV043	F	47	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>				2.300				2.533			1.791	
LTV044	F	36	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. glabrata</i>				2.235				2.520				2.432
LTV045	F	45	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. krusei</i>		0.431			0.487				0.182			

**DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS A PARTIR DE
Candida AISLADAS DE CASOS CLÍNICOS HUMANOS.**

2013

FOLIO	GRO	EDAD	MUESTRA/DX	ESPECIE	DO a 24 horas				DO a 48 horas				DO a 72 horas			
					≤ 0.200	≥0.2 a 1.0	≥1.1 a 2.0	≥2.1 a 3.0	≤ 0.200	≥0.2 a 1.0	≥1.1 a 2.0	≥2.2 a 3.0	≤ 0.200	≥0.2 a 1.0	≥1.1 a 2.0	≥2.1 a 3.0
LTV046	F	32	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>				1.863					2.485			1.786
LTV047.1	F	40	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>				1.890		0.237					0.493	
LTV047.2	F	40	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>				2.032				2.665				2.372
LTV048	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>		0.459				0.583				0.581		
LTV049	F	24	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.190			0.444				0.501		
LTV050	F	63	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>		0.906				0.221				0.210		
LTV051	F	41	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>				2.241			1.854					2.490
LTV052	F	41	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>	0.194				0.133				0.115			
LTV053	F	36	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>				2.235				2.385				2.881
LTV054	F	26	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>				2.525				2.288			1.805	
LTV055	F	34	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>				2.519				2.204				2.755
LTV056	F	16	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>				2.196				2.244				2.903
LTV057	F	24	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>				2.583		0.656			0.095			
LTV058	F	22	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>				2.257				2.299				2.140
LTV059	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.423					2.357				2.981
LTV060	F	38	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>				2.384			1.358				1.359	
LTV061	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.148			0.462				0.574		
LTV062	F	24	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>				2.316			1.239				1.279	
LTV063	F	32	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>				2.121		0.420				0.432		
LTV064	F	52	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.891					2.303				2.453
LTV065	F	39	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>				2.448				2.441				2.904
LTV066	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>				2.398			1.663					2.593
LTV067	F	ND	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.789					2.381			1.554	

**DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS A PARTIR DE
Candida AISLADAS DE CASOS CLÍNICOS HUMANOS.**

2013

LTV068	F	39	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>					2.049				2.037				2.721						
LTV069	F	40	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>					2.501				2.261		0.635								
LTV070	F	30	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>					2.487				2.315		0.561								
LTV071	ND	ND	E.FARINGEO/ND	<i>C. albicans</i>					2.119			1.741					2.516						
LTV072	ND	ND	E.FARINGEO/ND	<i>C. albicans</i>			1.692				0.324			0.102									
LTV073	ND	ND	SECRECION/ND	<i>C. albicans</i>					2.404				2.386				2.959						
					DO a 24 horas					DO a 48 horas					DO a 72 horas								
FOLIO	GRO	EDAD	MUESTRA/DX	ESPECIE	≤ 0.200	≥ 0.2 a	1.0	≥ 1.1 a	2.0	≥ 2.1 a	3.0	≤ 0.200	≥ 0.2 a	1.0	≥ 1.1 a	2.0	≥ 2.2 a	3.0	≤ 0.200	≥ 0.2 a	≥ 1.1 a	≥ 2.1 a	
LTV074	ND	ND	E.FARINGEO/ND	<i>C. albicans</i>						2.231					1.955								2.805
LTV075	F	38	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>						3.052							2.261						2.855
LTV076	M	ND	CATETER/I. RENAL	<i>C. albicans</i>						2.394							2.321						2.958
LTV077	M	ND	CATETER/I.RENAL	<i>C. albicans</i>				1.993									2.294						2.955
LTV078	F	ND	CATETER/I.RENAL	<i>C. albicans</i>						2.571							2.446						2.983
LTV079	F	ND	HERIDA/ABSCESO CEREBRAL	<i>C. albicans</i>						2.729							2.479						2.326
LTV080	M	ND	SECRECIÓN MUÑON/DIABETES	<i>C. albicans</i>						2.157					1.933								2.939
LTV081	M	4	E.FARINGEO/RINITIS	<i>C. albicans</i>		0.560							0.385							0.222			
LTV082	M	1	E.FARINGEO/RINOFARINGITIS	<i>C. albicans</i>		0.943							0.201						0.036				
LTV083	F	26	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. parapsilosis</i>				1.814									2.470					1.974	
LTV084	F	6	E.FARINGEO/FARINGOAMIGDALITIS CRONICA	<i>C. albicans</i>				1.167							1.864					0.430			
LTV085	F	6	E.FARINGEO/FARINGOAMIGDALITIS CRONICA	<i>C. albicans</i>				1.054							1.673				0.195				
LTV086	F	28	E.VAGINAL/EMBARAZO POR CESARIA	<i>C. parapsilosis</i>				1.996									2.503						2.234
LTV087	M	7	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. glabrata</i>				1.737									2.613						2.373
LTV088	F	ND	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. albicans</i>				1.831							1.373							1.501	

**DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS A PARTIR DE
Candida AISLADAS DE CASOS CLÍNICOS HUMANOS.**

2013

LTV089	M	ND	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. albicans</i>			1.679			1.724		0.087		
LTV090	M	56	E.URETRAL/BALANITIS	<i>C. albicans</i>		0.701				1.480			0.392	
LTV091	F	42	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.943				2.277	0.080		
LTV092	F	67	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. albicans</i>			1.893			1.587		0.139		
LTV093	M	ND	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. albicans</i>			1.826			1.929			0.320	
LTV094	F	45	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C.krusei</i>				2.305		1.489				1.142
LTV095	F	37	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. albicans</i>			2.108			1.536		0.149		
LTV096	M	24	E.FARINGEO/TOS CRONICA	<i>C. albicans</i>			2.004				2.264			1.478
LTV097	M	5	E.FARINGEO/RINOFARINGITIS	<i>C. albicans</i>			2.126				2.134			1.601
LTV098	F	18	E.FARINGEO/FARINGITIS	<i>C. albicans</i>			1.944			1.293		0.137		
LTV099	F	22	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.576				2.296	0.197		

LTV100				F	43	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.650				2.338		0.206		
								DO a 24 horas				DO a 48 horas				DO a 72 horas		
FOLIO	GRO	EDAD	MUESTRA/DX	ESPECIE	≤ 0.200	≥ 0.2 a 1.0	≥ 1.1 a 2.0	≥ 2.1 a 3.0	≤ 0.200	≥ 0.2 a 1.0	≥ 1.1 a 2.0	≥ 2.2 a 3.0	≤ 0.200	≥ 0.2 a 1.0	≥ 1.1 a 2.0	≥ 2.1 a 3.0		
LTV101	M	3	E.FARINGEO/RINOFARINGITIS	<i>C. albicans</i>			1.704				1.427		0.158					
LTV102	M	7	E.FARINGEO/RINOFARINGITIS	<i>C. albicans</i>			1.796					2.376				1.340		
LTV103	F	53	E.FARINGEO/ASMA	<i>C.parapsilosis</i>				2.683		0.771						1.513		
LTV104.1	F	53	E.FARINGEO/RINITIS ALERGICA	<i>C. albicans</i>				2.125			1.357			0.217				
LTV104.2	F	53	E.FARINGEO/RINITIS ALERGICA	<i>C.parapsilosis</i>				2.020			1.420			0.668				
LTV105.1	F	31	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>			1.696				1.453			0.737				
LTV105.2	F	31	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C.parapsilosis</i>			1.844				1.912			0.523				
LTV106	F	54	E. VAGINAL/CERVICOVAGINITIS	<i>C. albicans</i>				2.230			1.581					1.523		