



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y FORMACIÓN DE
BIOPELÍCULA DE AISLADOS DE *Candida* spp. OBTENIDOS DE LECHE**

DE CABRA.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

ITZEL LÓPEZ ORTIZ

ASESORA:

DRA. CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA



Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis padres:

A ustedes que además de darme la vida, han dado mucho más, por ser parte de este sueño y mejor aun ayudarme a cumplirlo, porque sin ustedes esto no sería ya un hecho. Gracias por todo, por las enseñanzas, el tiempo, por el desvelo, la comprensión, el empuje y por todos esos valores y virtudes que fueron fomentando en mí, porque nunca podre pagar tanto que me han dado y me siguen dando, porque hoy más que mío es de ustedes este gran logro. Los ama infinitamente su hija.

A mi hermana:

A ti que a pesar de ser tan diferentes y no comprender mi pasión por los animales nunca dudaste que lo lograría, porque siempre confiaste en mí y me apoyaste, porque has estado cuando más lo he necesitado, porque ambas fuimos criadas por los mejores, a ti muchas gracias por regalarme el placer de ser tía y darme la oportunidad de ser un ejemplo para él. Te adoro hermana mía.

A Ithan A. Rizo. Cano.

A ti por apoyarme en todo momento, por confiar y estar en los momentos más críticos en mi vida, por siempre creer que puedo ser la mejor y ayudarme a lograrlo, por haber llegado a mi vida de la manera menos pensada, porque la carrea nos unió como compañeros de profesión, pero nosotros decidimos ser compañeros de vida. Te amo, por eso y más colega mío, gracias.

AGRADECIMIENTOS

A mí gran asesora Carolina Segundo Zaragoza, gracias por involucrarme en el mundo de la micología, por siempre estar dispuesta a compartir lo mucho que sabes, por brindarme cada momento para aprender de ti y estar dispuesta a aprender de mí, porque además de ser un excelente aportadora de conocimiento, eres una gran persona que apoyó y respaldó cada paso que daba. Gracias por no solo ser mi asesora, sino también por reconfortarme cuando más lo necesitó esta tesista suya. Infinitamente gracias.

A ti Luz Olivia Castillo Sánchez, por compartir conmigo ese gran conocimiento que tienes, por tenerme la paciencia de explicarme e investigar conmigo, porque además de las miles de cosas que hacías, supiste brindarme el momento para aconsejarme y para que aprendiera de ti. Por eso y más gracias.

A mi Jurado por tomarse el tiempo de leer y corregir cada uno de los detalles de esta tesis, por su comprensión y consejos, para hacer de este trabajo uno mejor. Gracias.

A ti Itzel J. Jiménez Becerril. porque desde hace 17 años decidimos ser mejores amigas que nos ayudamos y apoyamos con cada uno de los sueños y las metas que tenemos, por tu amistad incondicional y por cada palabra de aliento que siempre has tenido para mi, gracias y te quiero.

A ti Sandra E. Balbuena Pérez, por ser una de mis mejores amigas desde hace 8 años, por apoyarme en todo momento y creer en mí así como yo creo en ti, por estar en los mejores pero sobre todo en los peores, muchas gracias.

A ti Rolando San Germán Raya, por siempre ser una persona que nunca ha tenido miedo a señalar mis errores, porque qué crees en mi y sabes lo que puedo llegar a ser, por todos esos años de amistad donde yo he aprendido tanto de ti, gracias amigo mío, en verdad gracias.

A todos mis amigos y compañeros de generación y ahora colegas, a ti Marcos Jiménez, Fernando Juárez, Paola Ávila, Valeria Becerril, Mariana Domínguez, Stephanie Hernández, Tatiana Torres, Sonia López, Alberto Juárez, Pablo Juárez, Iván Ortega, Elsy Jiménez, Alejandra Alcántara, Mariana Hernández, Marco Serrano, Miguel López, David Delgado, Tomas Meraz, Sara Muñoz, Mariana Bermejo, Brenda Estrella, Olga Girón, Nancy González y Giselle Castañeda, por compartir este rumbo, por ser parte de este mundo de la Medicina Veterinaria y Zootecnia y querer generar un cambio ante la sociedad sobre esta difícil pero hermosa profesión. Gracias.

A mi Facultad por darme todo ese conocimiento y práctica para poder ser una gran profesionalista, por dejarme estudiar en la mejor universidad de Latinoamérica, también gracias al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA), a los académicos que me impartieron su conocimiento y ayudaron en la obtención de muestras cuando lo requerí, por brindarme la oportunidad de culminar una etapa de esta larga decisión, a todo el personal de la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación (USEDICO), por siempre cumplir con sus funciones para el desarrollo de cada estudiante.

¡A todos gracias, infinitamente, gracias!

CONTENIDO

TEMA	PÁGINA
Índice de Figuras.	VII
Índice de Tablas.	IX
Índice de Esquemas.	X
RESUMEN	XI
1. Introducción	1
1.1. Generalidades. Importancia de la leche de cabra.	1
1.2. Características del género <i>Candida</i> .	3
1.3. Actividad enzimática del género <i>Candida</i>	4
1.3.1. Proteasas.	4
1.3.2. Fosfolipasas.	5
1.3.3. Hemolisinas.	5
1.4. Biopelículas del género <i>Candida</i>	6
2. HIPOTESIS	7
3. OBJETIVOS	7
4. MATERIAL Y METODOS	7
4.1. Obtención de aislados de <i>Candida</i> spp	7
4.2. Cepas control	7
4.3. Confirmación de la identificación bioquímica de los aislados en medios CHROMagar <i>Candida</i> y Biggy.	8
4.3.1. Desarrollo de los aislados en caldo YEPD al 2% (peptona dextrosa extracto de levadura).	8
4.3.2. Tinción de Gram	8
4.3.3. Siembra en medio de Biggy y CHROMagar <i>Candida</i>	9
4.4. Evaluación de la actividad enzimática de <i>Candida</i> spp	11
4.4.1. Lectura y cálculo de la actividad enzimática	11
4.5. Formación de Biopelícula de <i>Candida</i> spp	12
4.6. Análisis Estadístico	15
5. Resultados	16
5.1. Confirmación de la identificación bioquímica de los aislados en medios Biggy y CHROMagar <i>Candida</i> .	
5.2. Evaluación de las actividades enzimáticas de proteasas, fosfolipasas y hemolisinas de las diferentes especies de <i>Candida</i> .	
5.3. Formación de biopelículas.	
6. Discusión	65

7. Conclusión	71
8. Anexos	72
9. Referencias	84

Índice de figuras.

N° de figura	Descripción	Pág.
1	Tinción de Gram de aislados de <i>C.guilliermondii</i> .	16
2	Cultivos de <i>C.guilliermondii</i> en medio CHROMagar <i>Candida</i> y agar Biggy	17
3	Tinción de Gram de aislados de <i>C.famata</i>	17
4	Cultivos de <i>C.famata</i> en medios CHROMagar <i>Candida</i> y agar Biggy	18
5	Tinción de Gram de aislados de <i>C.tropicalis</i>	19
6	Cultivos de " <i>C.tropicalis</i> " en medios CHROMagar <i>Candida</i> y agar Biggy	20
7	Producción de tubo germinativo	20
8	Tinción de Gram de aislados de <i>C.kefyr</i>	21
9	Cultivos de <i>C.kefyr</i> en medios CHROMagar <i>Candida</i> y agar Biggy	21
10	Tinción de Gram de aislados de <i>C.lusitaniae</i>	22
11	Cultivos de " <i>C.lusitaniae</i> " en medios CHROMagar <i>Candida</i> y agar Biggy	23
12	Tinción de Gram de aislados de <i>C.glabrata</i>	23
13	Cultivos de <i>C.glabrata</i> en medios CHROMagar <i>Candida</i> y agar Biggy	24
14	Tinción de Gram de aislado de <i>C.parapsilosis</i>	24
15	Cultivo de <i>C.parapsilosis</i> en medio CHROMagar <i>Candida</i>	25
16	Cultivo de <i>C.parapsilosis</i> en medio agar Biggy	25
17	Tinción de Gram de aislado de <i>Candida</i> spp	26
18	Cultivo de " <i>Candida</i> spp" en medio CHROMagar <i>Candida</i>	26
19	Cultivo de " <i>Candida</i> spp" en medio agar Biggy	27
20	Actividad enzimática de proteasas de <i>C.kefyr</i>	30
21	Actividad enzimática de fosfolipasas de <i>C.kefyr</i>	31
22	Actividad enzimática de hemolisinas de <i>C.kefyr</i>	31
23	Actividad enzimática de proteasas de <i>C.guilliermondii</i>	35
24	Actividad enzimática de fosfolipasas de <i>C.guilliermondii</i>	35
25	Actividad enzimática de hemolisinas de <i>C.guilliermondii</i>	36
26	Actividad enzimática de proteasas de <i>C.famata</i>	39
27	Actividad enzimática de fosfolipasas de <i>C.famata</i>	40
28	Actividad enzimática de hemolisinas de <i>C.famata</i>	41
29	Actividad enzimática de proteasas de <i>C.glabrata</i>	43
30	Actividad enzimática de fosfolipasas y hemolisinas de <i>C.glabrata</i>	44

31	Actividad enzimática de proteasas de <i>C.albicans</i>	45
32	Actividad enzimática de fosfolipasas de <i>C.albicans</i>	45
33	Actividad enzimática de hemolisinas de <i>C.albicans</i>	46
34	Actividad enzimática de proteasas de <i>C.parapsilosis</i>	47
35	Actividad enzimática de fosfolipasas y hemolisinas de <i>C.parapsilosis</i> .	47
36	Formación de biopelícula de <i>C.kefyr</i>	55
37	Formación de biopelícula de <i>C.guilliermondii</i>	58
38	Formación de biopelícula de <i>C.famata</i>	60
39	Formación de biopelícula de <i>C.glabrata</i>	62
40	Formación de biopelícula de <i>C.albicans</i> y <i>C.parapsilosis</i>	63

Índice de Tablas

N° de Tabla	Descripción	Pág.
1	Composición básica de los nutrientes de la leche de rumiantes.	2
2	Interpretación del medio selectivo agar Biggy	9
3	Interpretación de medio CHROMagar <i>Candida</i> .	10
4	Colores de las colonia en CHROMagar <i>Candida</i> y agar Biggy de las especies del género <i>Candida</i>	28
5	Reclasificación de aislados	29
6	Actividades enzimáticas de aislados de <i>C.kefyr</i> . Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz).	32
7	Actividades enzimáticas de aislados de <i>C.guilliermondii</i> . Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz).	36
8	Actividades enzimáticas de aislados de <i>C.famata</i> . Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz).	41
9	Actividades enzimáticas de aislados de <i>C.glabrata</i> . Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz).	44
10	Actividades enzimáticas de aislados de <i>C.albicans</i> . Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz).	46
11	Actividades enzimáticas de aislados de <i>C.parapsilosis</i> . Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz).	48
12	Actividad enzimática de las diferentes especies de <i>Candida</i> aisladas en leches de cabras clínicamente sanas.	49
13	Densidades Ópticas (DO) de los controles negativos	50
14	Formación de biopelícula de los aislados de <i>C.kefyr</i> (Densidades ópticas).	52
15	Formación de biopelícula de los aislados de <i>C.guilliermondii</i> (Densidades ópticas).	55
16	Formación de biopelícula de los aislados de <i>C.famata</i> (Densidades ópticas).	58
17	Formación de biopelícula de los aislados de <i>C.glabrata</i> (Densidades ópticas).	61
18	Formación de biopelícula de los aislados de <i>C.albicans</i> (Densidades ópticas).	62
19	Formación de biopelícula de las diferentes especies de <i>Candida</i> aisladas de leches de cabras clínicamente sanas.	64

Índice de Esquemas

N° de Esquema	Descripción	Pág.
1	Lectura y medición de la actividad enzimática.	11
2	Producción de biopelículas teñidas con safranina al 1%.	13

RESUMEN

LÓPEZ ORTIZ ITZEL. Evaluación de la actividad enzimática y formación de biopelícula de aislados de *Candida* spp. Obtenidos de leche de cabra (bajo la dirección de: Dra. Carolina Segundo Zaragoza).

La leche es un producto de interés en México y a nivel mundial, siendo los bovinos y recientemente los caprinos, los animales con un alto potencial lechero. La información con relación a la microbiota levaduriforme en la leche de cabra es escasa. Los reportes al respecto, se basan en estudios en la leche de bovinos sanos y con mastitis. El objetivo del presente trabajo fue corroborar la identificación bioquímica de diferentes especies del género *Candida*, obtenidas de la leche de cabras clínicamente sanas y evaluar la actividad enzimática, así como la formación de biopelículas. Se trabajaron 221 aislados de diferentes especies del género *Candida* utilizando para su identificación los medios CHROMagar *Candida* y agar Biggy. La evaluación de las actividades enzimáticas se realizó para fosfolipasas con SDA, adicionado con 4% de yema de huevo, para proteasas en agar bacteriológico con 0.2 % de albúmina sérica bovina y para hemolisinas en agar SDA adicionado con 7% de sangre de cordero. La evaluación de la formación de biopelícula se realizó en microplacas de 96 pozos y se tiñó con safranina al 1%. Las especies del género *Candida* identificadas en la leche de cabras clínicamente sanas fueron: 35.7% *C.kefyr*, 33% *C.guilliermondii*, 23.5%, *C.famata*, 5.9% *C.glabrata*, 1.4% *C.albicans* y 0.5% *C.parapsilosis*. La actividad enzimática de proteasas fue alta en los aislados de *C.kefyr*, *C.guilliermondii*, *C.famata*, *C.glabrata*, *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Para el caso de la producción de fosfolipasas, solo los aislados de *C. albicans* presentaron actividad. La actividad de las hemolisinas fue baja y media para *C.kefyr*, *C.guilliermondii*, *C.famata*, y *C.albicans*. El 100% de los aislados de *C.albicans* formaron biopelícula, seguida de un 84.61% de *C.glabrata*, 73.41% de *C.kefyr*, 71.23% de *C.guilliermondii* y 65.38%, *C.famata*.

La relevancia del estudio, en primer lugar permite conocer parte de la microbiota normal levaduriforme en la leche de cabra, y en segundo lugar la actividad enzimática y formación de biopelículas de las diferentes especies del género *Candida* aisladas, las cuales bajo factores predisponentes en los animales pueden actuar como patógenos oportunistas y causar daño en la glándula mamaria, reflejado en casos de mastitis subclínica y/o clínica como se han reportado en Bovinos lecheros.

1. Introducción.

1.1 Generalidades. Importancia de la leche de cabra.

La leche es un producto importante de origen animal, que aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo de los mamíferos incluido el humano. La mayoría de la leche que se consume a nivel mundial proviene de los bovinos y recientemente de los caprinos. Por mucho tiempo la leche de origen bovino así como sus subproductos han tenido relevancia en la industria lechera, en el caso de la leche de cabra y sus derivados, su consumo y comercialización se han incrementado en la última década. Actualmente representa poco más del 2% de la leche producida a nivel mundial, siendo México el país latinoamericano con el hato caprino más grande, teniendo una producción de 106.975 millones de litros de leche promedio de enero a agosto del año 2017, lo que representa un importante potencial de desarrollo económico y productivo [1].

La composición de la leche varía dependiendo de la especie animal que la produce, en el caso de la leche de cabra el porcentaje de carbohidratos es de 4.1% en comparación con la leche de bovino que es de 4.7% y de las borregas con un 4.9%. Por lo que se refiere al contenido de proteínas y grasas, la leche de cabra tiene un 3.4% y un 3.8% respectivamente, los bovinos un 3.2% y un 3.6% y los ovinos un 6.2% y un 7.9% (Tabla 1). Estos nutrientes propician el medio idóneo para el crecimiento de diversos microorganismos, por ejemplo, las bacterias y los hongos filamentosos y levaduriformes.

Tabla 1. Composición básica de los nutrientes de la leche de rumiantes.

Componentes	Caprino (%)	Bovino (%)	Ovino (%)
Agua	87.9	87.5	80.1
Proteínas	3.4	3.2	6.2
Grasas	3.8	3.6	7.9
Hidratos de carbono	4.1	4.7	4.9
Caseína	2.4	2.6	4.2
Albúmina, globulina	0.6	0.6	1.0
Cenizas	0.8	0.7	0.9

* López, A.L., Barriga, D. La leche. Composición y Características. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Sevilla, España. 2016

El desarrollo de estos microorganismos en la leche ocasiona una serie de modificaciones químicas que pueden dar lugar a procesos que alteran la composición de la misma. Estas alteraciones resultan en la degradación de las proteínas (actividad proteolítica), de los lípidos (actividad lipolítica), y de los carbohidratos (actividad sacarolítica) [2].

Las levaduras al igual que otros microorganismos requieren nutrientes que les permitan crecer y multiplicarse, entre los que se encuentran: azúcares, proteínas, ácidos, grasas, minerales (fósforo, potasio, azufre, magnesio, hierro, zinc, manganeso, cobre y molibdeno). La elevada concentración de carbohidratos en la leche como es la lactosa, glúcido muy estable frente al ataque enzimático y sensible a la acción microbiana (generación de ácido láctico por fermentación) favorece el desarrollo de hongos levaduriformes, como es el caso del género *Candida*, además de promover su actividad enzimática y formación de biopelícula [3]. Las actividades enzimáticas de este género micótico, se han estudiado principalmente en *C.albicans*, entre las que se mencionan las enzimas hidrolíticas como son las proteasas, fosfolipasas, hemolisinas, lipasas, esterases, fosfatasas, glucoamilasas, hialuronidasas, sulfatasas y metalopeptidasas [4,5]. Algunas de las cuales, como las proteasas, fosfolipasas y hemolisinas, son también consideradas

como factores de virulencia por contribuir a la adhesión de la levadura a los tejidos del huésped y su consiguiente invasión.

Con relación a la flora levaduriforme presente en la leche de cabra, la información es escasa, poco se ha reportado de cuáles son los géneros micóticos que se pueden encontrar. En un estudio previo (datos sin reportar) se aislaron a partir de leche de cabras sanas, diversas especies del género *Candida*. En muestras de leche de bovinos sanos y con mastitis clínica y subclínica se han reportado principalmente diversas especies del género *Candida*, seguidos de *Cryptococcus* spp, *Trichosporum* spp, *Pichia* spp, *Saccharomyces* spp y *Rhodotorula* spp, [6, 7, 8, 9, 10 y 11].

1.2. Características del género *Candida*.

El género *Candida* pertenece al reino Fungi del filum Ascomicota, subfilum Ascomicotina, clase Ascomicetes, orden Saccharomicetales, familia Saccharomicetaceae. Teniendo en cuenta la reproducción sexual de las levaduras se las incluye en las subdivisiones Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina (cuando no se conoce la reproducción sexual) [12].

Actualmente, se han descrito cerca de 200 especies del género *Candida*, son hongos levaduriformes, unicelulares y algunas especies forman parte de la microbiota normal de la piel, mucosas y tracto digestivo de los mamíferos (humanos, felinos, caninos, bovinos, caprinos, ovinos, roedores, etc.) siendo descritas como potencialmente patógenas: *C.albicans*, *C. dubliniensis*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.lusitaniae*, *C.parapsilosis*, *C.guilliermondii*, *C.utilis*, *C.famata* y *C.kefyr* [13].

Este género presenta diferentes morfologías y características fisiológicas que permiten su clasificación, se identifican como levaduras alargadas o ligeramente redondas de 2-6 x 3-9 μm que se reproducen por gemación. A excepción de *C. glabrata*, el resto de las especies pueden formar pseudomicelio; *C. albicans* y *C. dubliniensis* además son formadoras de hifas verdaderas y clamidococinidios [14], presentan diferentes patrones de asimilación y fermentación de

carbohidratos. Todas las especies asimilan y fermentan la glucosa como fuente de carbono, pero ninguna asimila el nitrato como fuente de nitrógeno [15].

Estas levaduras se desarrollan en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, a un pH entre 2.5 a 7.5 y a temperaturas de 20 a 38°C, aunque *C. albicans* y *C. tropicalis* crecen mejor a temperaturas próximas a 37°C. El medio que se utiliza para su primoaislamiento es el agar dextrosa Sabouraud (SDA) [16].

1.3. Actividad enzimática de *Candida spp.*

Las diferentes especies del género *Candida* poseen diversas actividades enzimáticas que favorecen la adherencia, la colonización e invasión a los tejidos del huésped. Entre las más estudiadas se encuentran las proteasas, fosfolipasas y hemolisinas, que además de su capacidad de adhesión a las células del hospedero también contribuyen a la inactivación de las células de defensa del sistema inmune [16].

1.3.1. Proteasas.

La producción de proteasas parece favorecer la evasión del sistema inmune del hospedador, ya que destruye un número importante de proteínas de defensa del huésped como las inmunoglobulinas, factores del complemento, citoquinas [17], albúmina y mucina [18]. Además, son capaces de degradar otras proteínas de la barrera epitelial y mucosas, tales como colágeno y queratina [19]. La actividad proteolítica extracelular es una de las actividades enzimáticas descritas en *Candida spp.*, y se debe a las enzimas aspartil proteasas que intervienen en la adherencia, en el daño tisular y en la afectación de la respuesta inmune del huésped. Son secretadas por las especies patógenas de *Candida in vivo* durante la infección e *in vitro* cuando el organismo se cultiva en presencia de proteínas exógenas (generalmente albúmina de suero bovino). Se sugiere que las proteasas podrían promover la liberación del manano de la pared celular, lo que produciría la estimulación o supresión de la inmunidad celular [20]. Entre las especies potencialmente patógenas con una alta actividad de proteasas, en primer lugar se encuentra *C. albicans*, teniendo mayor actividad de aspartil proteasa, seguida de

C. krusei, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii* [21], y con menor actividad *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. [22]

1.3.2. Fosfolipasas.

La actividad de fosfolipasas representa un potencial determinante de virulencia de las especies patógenas de *Candida* [23 y 24], ya que desempeñan un importante papel en la invasión de los tejidos del huésped debido a que rompen las membranas de las células epiteliales. Un alto nivel de actividad de fosfolipasa se relaciona con un aumento en la capacidad de adherencia [25]. Las especies que se han descrito con una mayor actividad de fosfolipasas son *C. albicans* y *C. krusei*, con una producción baja o nula a *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* [26].

1.3.3. Hemolisinas.

Las hemolisinas se consideran un factor de virulencia porque contribuyen a la patogénesis de las infecciones por *Candida*, debido a la capacidad de los organismos patógenos para secuestrar el hierro, que es de importancia en el establecimiento de la infección en el huésped [27]. En medios sólidos como el agar sangre se pueden observar dos tipos de hemólisis: a) Hemólisis alfa, que es una hemólisis parcial de los eritrocitos donde las hemolisinas actúan abriendo los poros de la membrana lo que ocasiona una salida de la hemoglobina, originando un halo verdoso alrededor de la colonia y b) Hemólisis beta en la cual se observa un halo transparente alrededor de la colonia lo que indica una destrucción total de los glóbulos rojos. En un estudio del 2001 realizado por Gang Luo y col, evaluaron ambas actividades hemolíticas, donde determinaron que *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. lusitaniae* presentaron hemólisis alfa y beta. En estas especies de *Candida*, la hemólisis tipo alfa se observó a las 24 h de incubación y la hemólisis beta a las 48 h de incubación, mientras que *C. famata*, *C. guilliermondii*, y *C. utilis* demostraron sólo hemólisis alfa. En el caso de *C. parapsilosis* refieren que no presenta ningún tipo de hemólisis. Sin embargo, en 2016 Fatahinia y col, reportan a esta especie como

productora de hemólisis tipo alfa y en menor proporción hemólisis tipo beta [28, 29 y 30].

1.4. Biopelículas del género *Candida*.

Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos asociadas a superficies dentro de una matriz extracelular, y son el tipo más prevalente de crecimiento microbiano [31]. En su mayoría están compuestas de carbohidratos y en menor proporción de proteínas y lípidos. La formación de biopelículas se inicia con la adhesión sobre una superficie abiótica, tejido o en la interface aire-liquido, ocurre como un proceso que se componen de cinco fases: a) acondicionamiento, b) adhesión, c) síntesis de matriz extracelular, d) maduración y e) dispersión [32]. Esta formación tiene diferentes etapas que se dividen en temprana (8-11 horas), intermedia (12-30 horas) y madura (38-72 horas) [33].

La adhesión y colonización de las poblaciones fúngicas se favorece por diversos factores, tales como, el flujo del medio que las rodeo (orina, sangre, saliva, leche, semen y moco), el pH, la temperatura, la osmolaridad, la superficie en la que se desarrollan, como catéteres, prótesis dentales y cardiacas, jeringas, sondas, instrumental quirúrgico y material de látex entre otros, la especie del género *Candida* implicada y el origen del aislado, que puede ser de una infección invasiva o cutáneas, así como de un aislado ambiental [34, 35 y 36].

La formación de biopelículas se han reportado como un factor importante de virulencia de varias especies del género *Candida*, en particular de *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* y *C.tropicalis*, ya que les confiere por un lado, resistencia significativa a la terapia antifúngica convencional, que incluye anfotericina B y compuestos azólicos, limitando la penetración de estas a través de la membrana citoplasmática de la levadura y por otro lado protege a la levadura de la respuesta inmune del huésped [26,37].

2. Hipótesis

La actividad enzimática de proteasas, fosfolipasas, hemolisinas y producción de biopelícula están relacionadas con la virulencia de las especies del género *Candida* aisladas de leche de cabras sanas.

3. Objetivos:

- Confirmar la identificación morfológica y bioquímica de las diferentes especies del género *Candida* aisladas de leche de cabras clínicamente sanas, utilizando los medios CHROMagar *Candida* y agar Biggy.
- Evaluar la actividad enzimática de proteasas, fosfolipasas y hemolisinas así como la formación de biopelículas de las diferentes especies del género *Candida* aisladas de leche de cabras clínicamente sanas.

4. Material y métodos.

4.1. Obtención de aislados de *Candida* spp.

Se utilizaron 221 aislados del género *Candida* obtenidos de leche de cabras clínicamente sanas, previamente identificados de acuerdo a sus características morfológicas y bioquímicas como: *C.guilliermondii* (73), *C.famata* (52), *C.tropicalis* (39), *C.kefyr* (24), *C.lusitaniae* (18), *C.glabrata* (13), *C.parapsilosis* (1) y *Candida* spp (1).

4.2. Cepas control.

Para los ensayos, se utilizaron las siguientes cepas como controles: *C.albicans* ATCC 14053, *C.krusei* ATCC 6258, *C.lusitaniae* ATCC 34449, *C.parapsilosis* ATCC 22019, *C.glabrata* del Instituto Pasteur. *C.guilliermondii*, *C.tropicalis*, *C.famata*, identificadas por la técnica de MALDIT TOF y *C.kefyr* identificada por asimilación y fermentación de carbohidratos.

4.3. Confirmación de la identificación bioquímica de los aislados en medios CHROMagar *Candida* y Biggy.

4.3.1- Desarrollo de los aislados en caldo YEPD al 2% (peptona-dextrosa-extracto de levadura).

Los 221 aislados de las diferentes especies del género *Candida* con los que se trabajó en el presente estudio, se encontraban conservadas en refrigeración a 4°C y en congelación a -20°C. De cada uno de los aislados conservados en refrigeración se tomó una asada del cultivo y se depositó por agitación del asa en un tubo de ensaye que contenía 2 ml de caldo YEPD al 2% (Anexo 1), y se incubaron a 37°C de 24 a 48h. En el caso de los aislados que no se desarrollaron a partir de los tubos en refrigeración, se utilizaron los aislados conservados en congelación. De estos se tomaron 200 µl del cultivo y se cultivaron a las mismas condiciones antes descritas.

Posteriormente, de los cultivos desarrollados en caldo YEPD se tomaron 20µl y se depositaron en una caja de Petri que contenía agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol (SDAc) (Anexo 1), la gota se dejó secar y se sembró en cultivo puro, incubando a 37°C por 24 horas.

4.3.2. Tinción de Gram

La tinción de Gram se realizó a cada uno de los aislados desarrollados en SDA para observar la morfología microscópica y verificar la pureza del cultivo.

En un portaobjetos limpio y desengrasado se colocó una gota de agua destilada estéril, y con la ayuda del asa microbiológica se tomó una colonia del cultivo y se mezcló con la gota de agua destilada estéril expandiendo de forma circular, la preparación se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se fijó al calor pasando la laminilla de 2 a 3 veces por la flama del mechero. El frotis se tiñó de acuerdo al procedimiento de la tinción de Gram, donde se depositó una gota del colorante primario (Cristal violeta) por 30 segundos, se lavó con agua destilada, se cubrió con una solución de Yodo Lugol por 30 segundos, nuevamente se lavó

con agua destilada, se cubrió con la solución decolorante (alcohol-acetona) de 1 a 3 segundos, se lavó con agua destilada y finalmente se adicionó el colorante secundario (safranina) por 30 segundos, el cual se lavó con agua destilada y la preparación se dejó secar a temperatura ambiente (Anexo 2) [38]. La observación se realizó en microscopio óptico, primero con el objetivo seco fuerte (40X) y finalmente con el objetivo de inmersión (100X).

4.3.3. Siembra en medio de Biggy y CHROMagar *Candida*

Para corroborar la identificación bioquímica y morfológica de los aislados se sembraron en dos medios que permiten la identificación del género *Candida*.

El medio de Biggy es considerado un medio diferencial para identificación del género *Candida* de otros géneros levaduriformes. Este medio tiene diversos componentes como glicina, extracto de levadura y sulfito de bismuto que favorecen que las especies de *Candida*, a través de un proceso de reducción hace que la sal de bismuto se reduzca a bismuto y el sulfito a sulfuro, la combinación de estos compuestos se manifiesta por una precipitación negra o café que pigmenta las colonias y en ocasiones se difunde al medio. Dependiendo de la especie de *Candida* es la pigmentación que se verá en la colonia (Tabla 2) [39 y 40].

Tabla 2. Interpretación del medio selectivo agar Biggy.

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

El CHROMagar *Candida* es un medio selectivo cromogénico que permite la identificación presuntiva de *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei* y *C.glabrata*. La mezcla cromogénica está formada por sustratos artificiales que son degradados por enzimas específicas de las distintas especies del género *Candida*, liberando compuestos que aportan un determinado color al medio dependiendo de la especie (Tabla 3) [41].

Tabla 3. Interpretación del medio CHROMagar *Candida*.

Especie de <i>Candida</i>	Color de las colonias
<i>C.albicans</i>	Verde esmeralda.
<i>C.krusei</i>	Rosa claro, colonia rugosa apariencia de gis.
<i>C.tropicalis</i>	Pistacho, azul/violeta claro.
<i>C.glabrata</i>	Lila a rosa claro mate.
<i>C.parapsilosis</i>	Blanco crema mate/ Rosa mate.
<i>C.famata</i>	Rosa, mate.
<i>C.guilliermondii</i>	Rosa claro brillante
<i>C.kefyr</i>	Beige a rosa claro mate
<i>C.lusitaniae</i>	Lila mate
<i>C.lipolytica</i>	Blanco-rosa, rugosa
<i>C.dublinskiensis</i>	Verde oscuro-verde esmeralda.
<i>C.colliculosa</i>	Blanco-rosa brillante
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Blanco-rosa brillante
<i>Rhodotorula</i> spp	Rojo, rosa, salmón.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lila, mate, halo, pequeña
<i>Trichosporon</i> spp	Turquesa, halo, rugosa.
<i>Pichia</i> spp	Azul-rosa, rugosa, mate
<i>Kloeckera apiculata</i>	Lila, halo, pequeña.

4.4. Evaluación de la actividad enzimática de fosfolipasas, proteasas y hemolisinas.

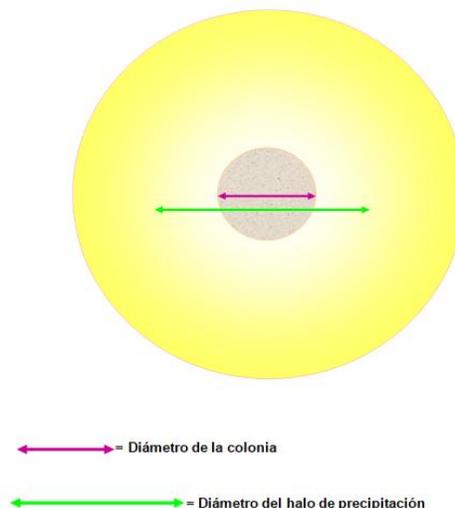
Cada uno de los aislados fue cultivado en SDA a 37°C por 24 h. A partir de este cultivo se tomaron de dos a tres colonias y se depositaron en un tubo que contenía Solución Salina Fisiológica (SSF) estéril (Anexo 3), para alcanzar una concentración al tubo 0.5 de Mc Farland, equivalente a 1×10^6 - 5×10^6 UFC/ml de levaduras [42].

Del inóculo en SSF de cada aislado se tomaron 10µl y se depositaron sobre discos de papel filtro estériles de un diámetro de 6 mm cada uno. Los discos impregnados con el cultivo se dejaron secar a temperatura ambiente de 5 a 6 horas, y posteriormente en condiciones de esterilidad se colocaron en el centro de cajas de Petri que contenían los diversos sustratos a evaluar: a) Albúmina sérica bovina para proteasas, b) Yema de huevo para fosfolipasas y c) Sangre de cordero para hemolisinas (Anexo 1). Las placas fueron incubadas a 37°C por 5 días. Los ensayos se realizaron por duplicado.

4.4.1. Lectura y cálculo de la actividad enzimática

La lectura de las pruebas, se realizó midiendo el diámetro de la colonia y el diámetro del halo de precipitación en milímetros (Esquema 1).

Esquema 1. Lectura de la actividad enzimática



El cálculo del índice de actividad enzimática P_z = Zona de precipitación, se realizó de acuerdo con la fórmula de Williamson y col, [43].

$$P_z = \frac{\text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro del halo}}$$

Estableciendo los siguientes rangos de actividad:

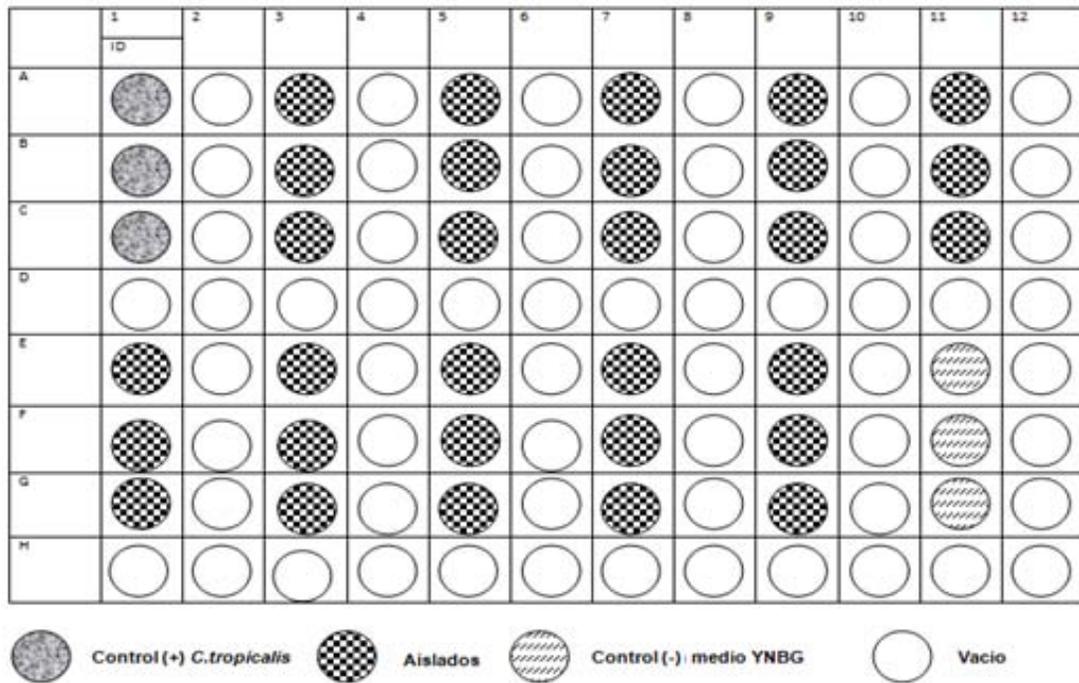
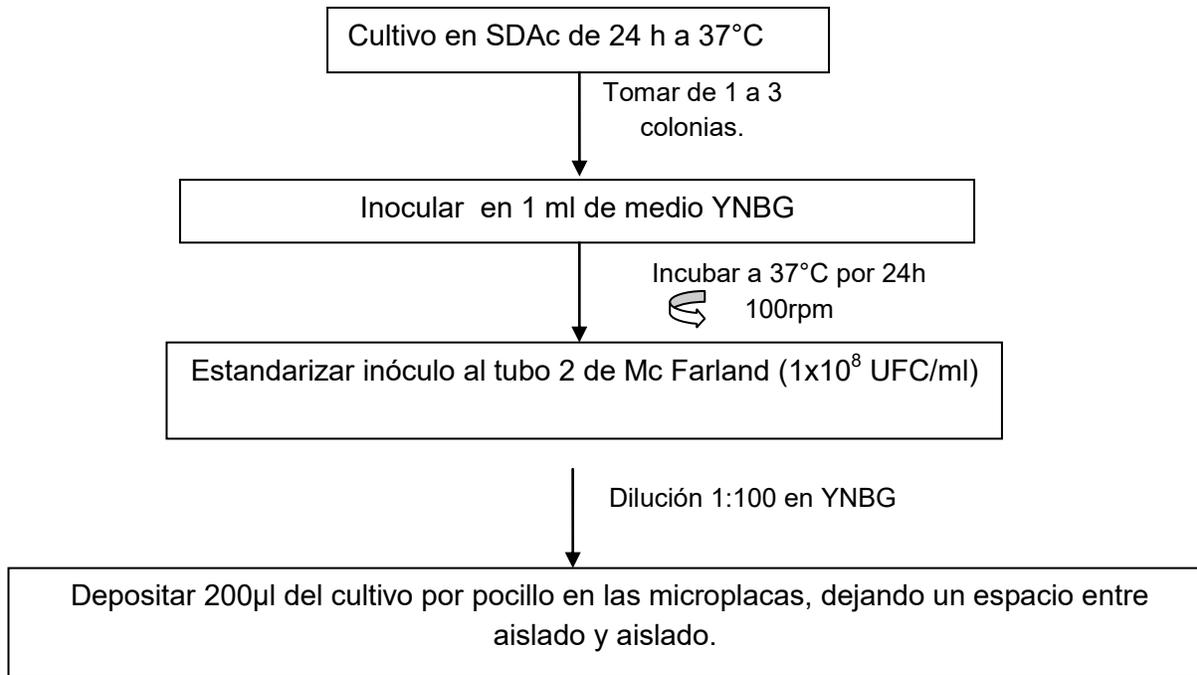
Pz= zona de precipitación	Actividad enzimática
< 0.40	Alta
0.41-0.60	Media
0.61- 0.99	Baja
1	Nula

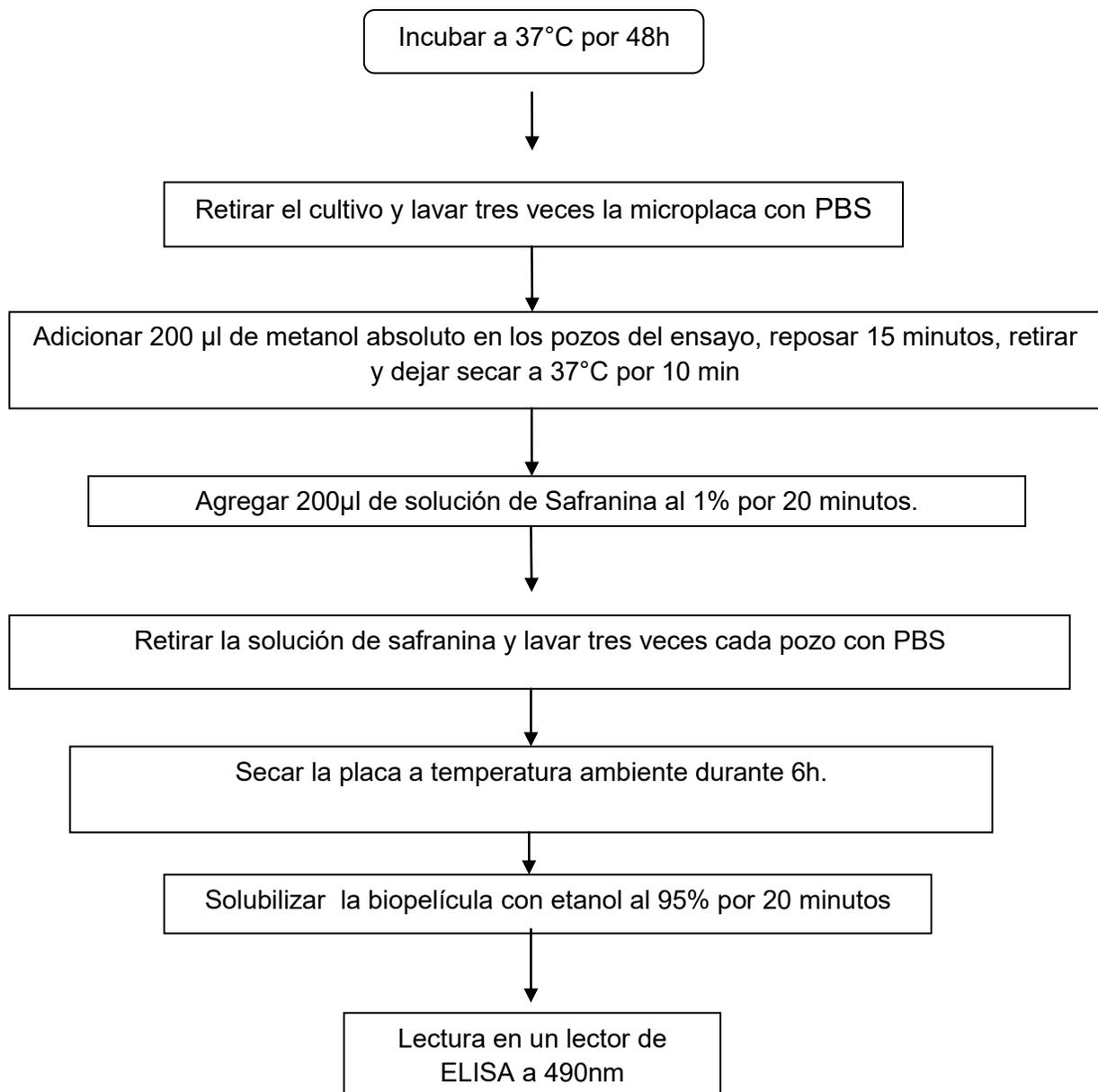
4.5 Formación de biopelículas de *Candida spp.*

Cada aislado fue sembrado en SDA adicionado con cloranfenicol por 24 h a 37°C. De este cultivo, se tomaron de 1 a 3 colonias que fueron depositadas en 1 ml del medio Yeast Nitrogen Base suplementado con glucosa (YNBG) al 8% (Anexo 1) y se incubaron a 37°C por 24 h con agitación orbital de 100 rpm, para obtener una concentración equivalente al tubo 2 de Mc Farland (1×10^8 UFC/ml) [44], a partir del cual se realizó una dilución 1:100 en medio YNBG. De esta dilución, se tomaron 200 µl que se depositaron en microplacas de fondo plano de poliestireno de 96 pozos. La prueba se realizó por triplicado para cada uno de los aislados. Las placas se incubaron a 37°C por 48 h. Posteriormente se retiró el YNBG y la placa se lavó tres veces con Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) estéril (Anexo 3). Enseguida se adicionaron 200 µl de metanol a cada uno de los pocillos y se dejó reposar durante 15 minutos para fijar la biopelícula. El metanol se retiró y la placa se colocó por 10 minutos a 37°C, luego se adicionaron 200 µl de la solución de safranina al 1% (Anexo 2), la cual se dejó actuar durante 20 minutos, la solución de safranina se retiró y la microplaca se lavó nuevamente tres veces con PBS estéril para retirar el exceso de colorante. La safranina retenida en la biopelícula se solubilizó añadiendo a cada pozo 200 µl de etanol al 95% por 20

minutos. La lectura de la densidad óptica (DO) se realizó en un lector de ELISA a 490 nm [45 y 46] (Esquema 2).

Esquema 2. Producción de biopelículas teñidas con safranina al 1%.





La interpretación de la formación de la biopelícula, se realizó tomando como base la DO del pozo utilizado como blanco (DO_b) y se asignaron categorías que van de [29]:

1. $DO < DO_b$ = No formadora
2. $DO_b < DO < 2DO_b$ = Poco formadora
3. $2DO_b < DO < 4DO_b$ = Medianamente formadora
4. $4DO_b < DO$ = Fuertemente formadora.

4.5. Análisis estadístico.

Se utilizó el análisis estadístico descriptivo para obtener las medidas de tendencia central (media aritmética) y el cálculo porcentual, para determinar el nivel de actividad enzimática de los aislados de las diferentes especies del género *Candida*, [47].

En el caso de la formación de biopelículas, se obtuvieron las medidas de tendencia central (media) y la desviación estándar, para obtener el punto de corte y los intervalos para realizar el cálculo porcentual de formación de biopelícula de cada especie de *Candida* [45 y 48].

5. Resultados

5.1. Confirmación de la identificación bioquímica de los aislados en medios Biggy y CHROMagar *Candida*.

5.1.1. Aislados de *C.guilliermondii*.

A partir del desarrollo en SDA de cada uno de los aislados, se realizó la tinción de Gram, observándose levaduras Gram positivas en gemación de formas ovoides a elípticas (Figura 1).

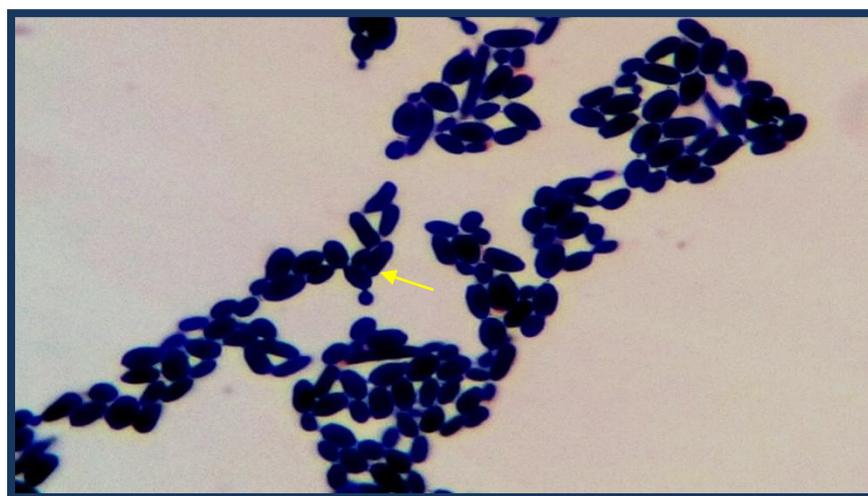


Figura 1. Tinción de Gram de *C.guilliermondii*. Levaduras ovoides a elípticas en gemación (100X).

De acuerdo a su crecimiento en agar Biggy y CHROMagar *Candida*, los 73 aislados correspondieron a *C.guilliermondii* (Figura 2).

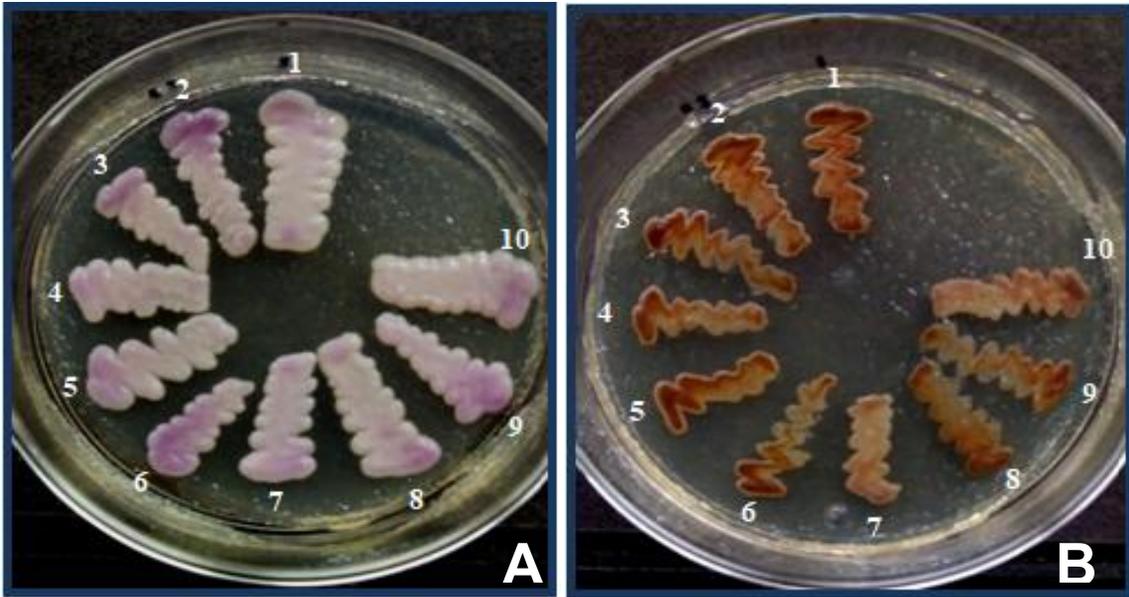


Figura 2. Cultivos de *C.guilliermondii* en: A) CHROMagar *Candida*, colonias en tonos rosas brillantes. B) Agar Biggy colonias de color marrón rojizo. Donde: 1= *C.guilliermondii* cepa control y 2-10= aislados.

5.1.1. Aislados de *C. famata*.

Del desarrollo en SDA de cada uno de los aislados, se realizó la tinción de Gram, observándose levaduras Gram positivas en gemación de formas elípticas (Figura 3).

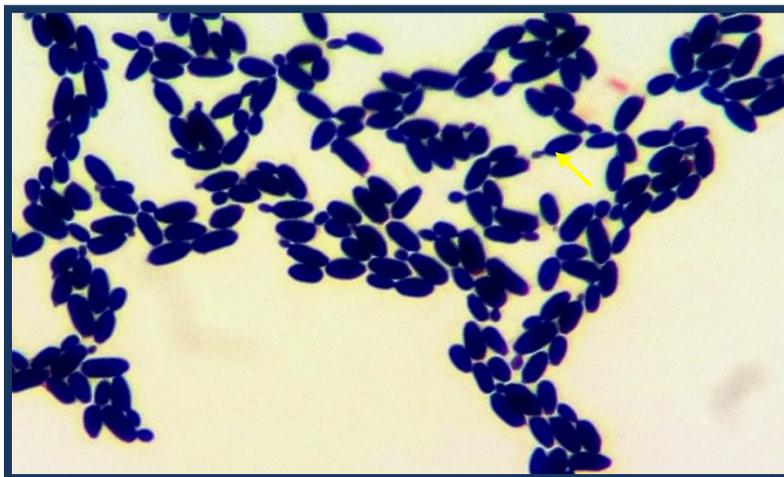


Figura 3.Tinción de Gram de *C.famata*. Levaduras elípticas en gemación (100X).

De acuerdo a su crecimiento en agar Biggy y CHROMagar *Candida*, los 52 aislados correspondieron a *C.famata* (Figura 4).

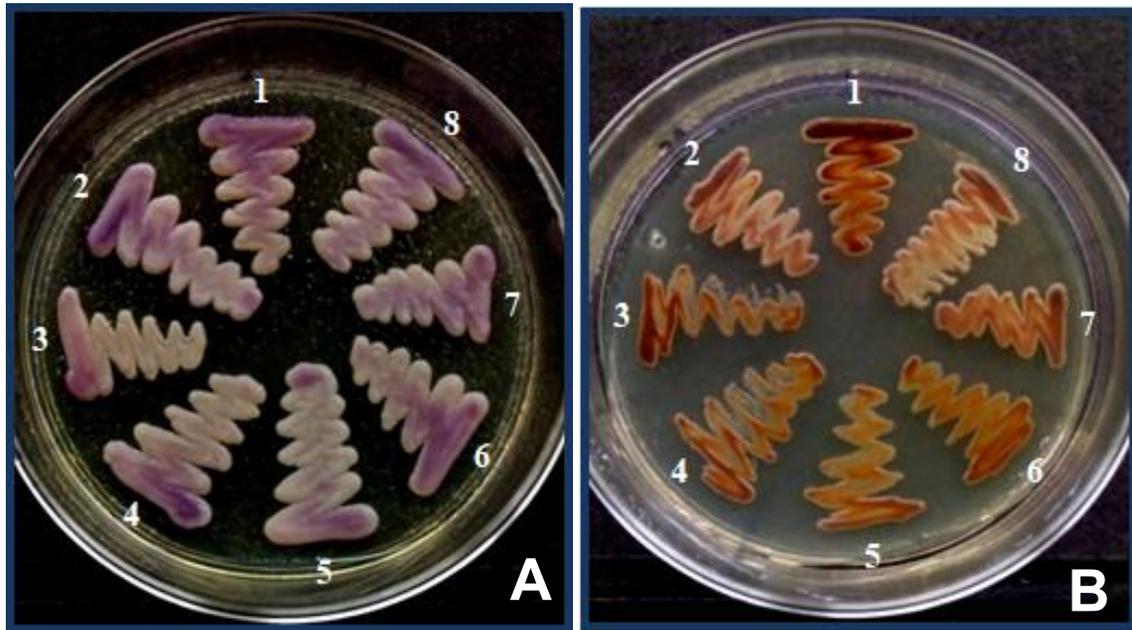


Figura 4. Cultivos de *C.famata* en: A) CHROMagar *Candida*, colonias en tonos rosas claro mate. B) Agar Biggy colonias de color marrón rojizo. Donde: 1-8= aislados.

5.1.2. Aislados de *C.tropicalis*

A cada uno de los 39 aislados en SDA se les realizó la tinción de Gram, observándose levaduras en gemación de forma ovoide a elípticas en gemación, compatibles por morfología con *C. tropicalis* (Figura 5A). Sin embargo, tres de los aislados presentaron una morfología redonda que no correspondía a la especie mencionada (Figura 5B).

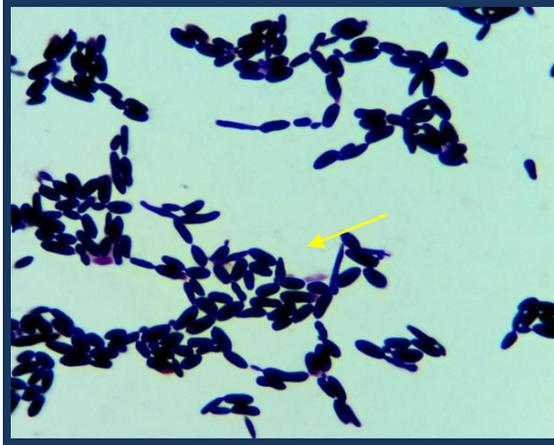


Figura 5A. Tinción de Gram de levaduras ovoides a elípticas compatibles con *C. tropicalis*. 100X

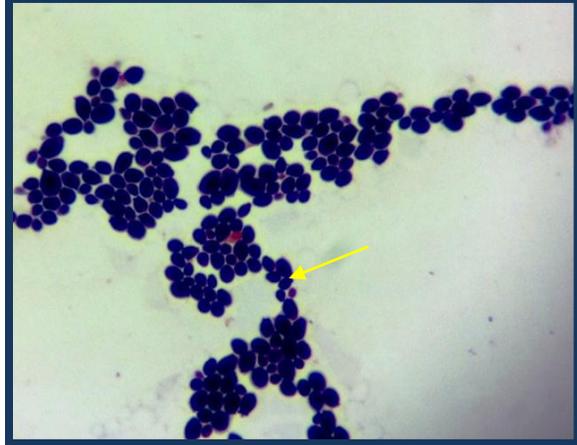


Figura 5B. Tinción de Gram de levaduras redondas en gemación. 100X.

Con relación al crecimiento en CHROMagar *Candida* y agar Biggy, de los 39 aislados identificados previamente como *C.tropicalis*, se observó que ninguno pertenece a esta especie, al compararlos con la cepa de *C. tropicalis* utilizada como control, la cual en CHROMagar *Candida* se observa de color azul fuerte y en agar Biggy con tonalidad café oscuro. En 36 (36/39) de los aislados, las colonias en CHROMagar *Candida*, se observaron en tonalidades rosa claro mate y en agar Biggy en color café claro, características compatibles con *C. kefyr*. Las colonias de los tres aislados (3/39) con morfología redonda en CHROMagar *Candida* se observaron de color verde esmeralda, mientras que en agar Biggy en café platinado, compatibles con *C. albicans* (Figura 6), confirmándose con la formación de tubo germinal (Figura 7).

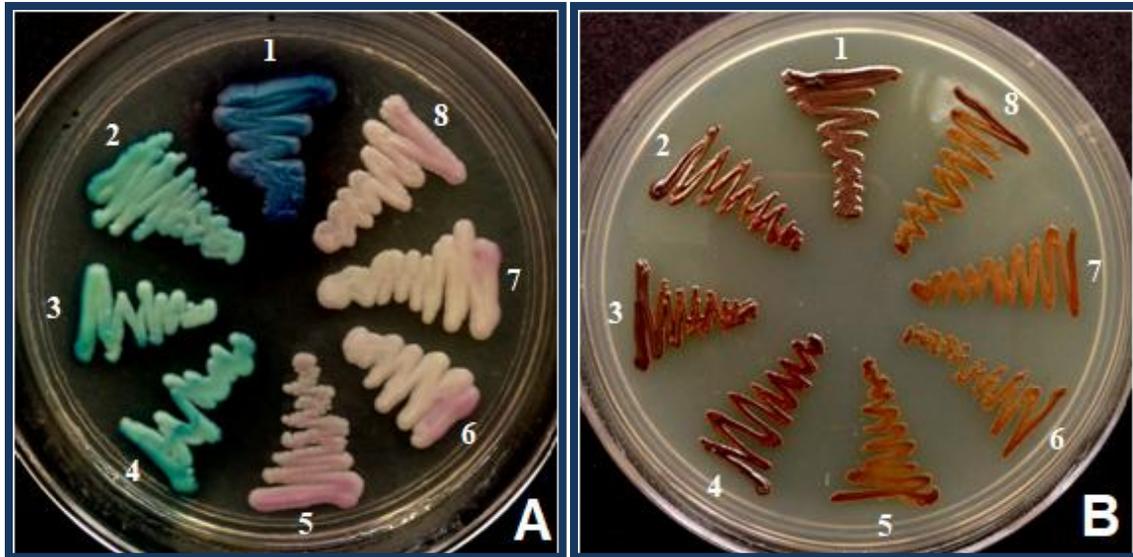


Figura 6. Cultivos de “*C.tropicalis*” en: A) CHROMagar *Candida*. B) Agar Biggy Donde: 1= *C.tropicalis* cepa control, 2-4 “*C tropicalis*” (reclasificado como *C. albicans*) y 5-8= aislados “*C. tropicalis*” (reclasificados como *C. kefyfyr*).



Figura 7. Produccion de tubo germinativo (40X).

5.1.3. Aislados de *C.kefyfyr*.

De los 24 cultivos desarrollados en SDA, a cada uno se le realizó la tinción de Gram, observándose levaduras Gram positivas de formas elípticas a cilíndricas en gemación (Figura 8).

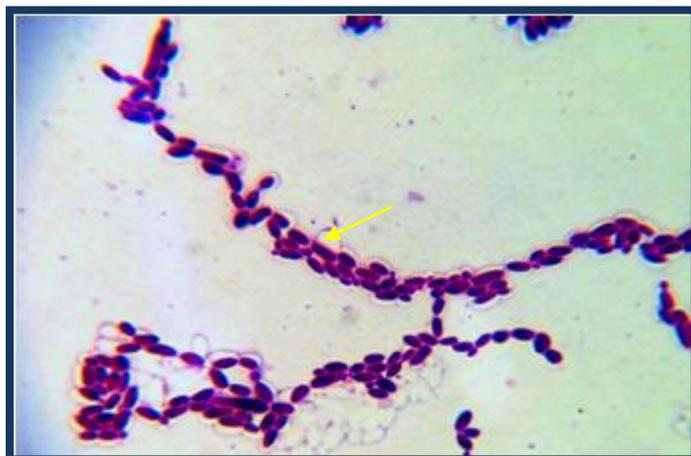


Figura 8. Tinción de Gram de aislados de *C.kefyri*, levaduras elipsoidales a cilíndricas en gemación (100X).

De acuerdo a su desarrollo en agar Biggy y CHROMagar *Candida*, los 24 aislados correspondieron a *C.kefyri* presentando tonos de color rosa claro mate en CHROMagar *Candida* y tonos café claro en agar Biggy (Figura 9).



Figura 9. Cultivos de *C.kefyri* en: A) CHROMagar *Candida*, colonias en tonos rosa claro mate. B) Agar Biggy, colonias en tono café claro. Donde: 1-8= aislados.

5.1.4. Aislados de *C.lusitaniae*

A los 18 cultivos desarrollados en SDA se les realizo la tinción de Gram, observándose levaduras en gemación de forma elíptica a cilíndrica, morfología compatible con la de *C.lusitaniae* ATCC 34449 (Figura 10).

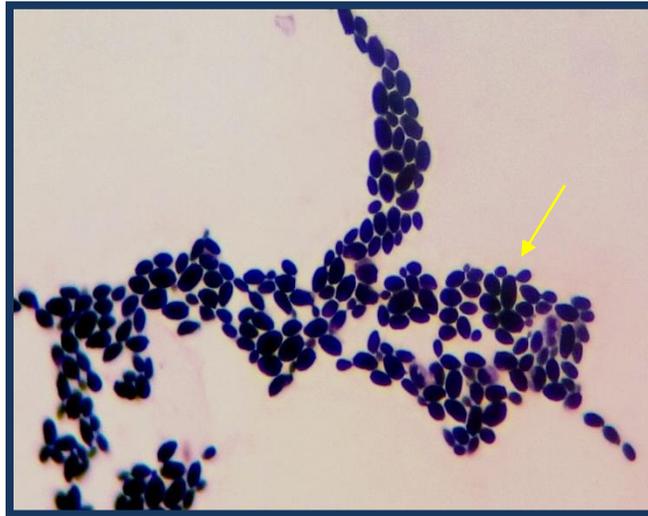


Figura 10. Tinción de Gram de aislados de *C.lusitaniae*. Levaduras en gemación de forma elíptica a cilíndrica (100X).

Con relación al desarrollo en CHROMagar *Candida* y agar Biggy, se observó que ninguno pertenece a *C. lusitaniae*, de acuerdo a la comparación con la cepa de *C. lusitaniae* ATCC 34449, la cual en CHROMagar *Candida* sus colonias se observan en tono morado y en agar Biggy no hay desarrollo. En CHROMagar las colonias de los 18 aislados se observaron en tonalidades rosa claro mate, mientras que en agar Biggy y a diferencia de la cepa control, los aislados sí se desarrollaron, y las colonias se observaron en tonalidades café claro. Por las características de desarrollo observados en estos medios, estos aislados fueron reclasificados como *Candida kefyr* (Figura 11).

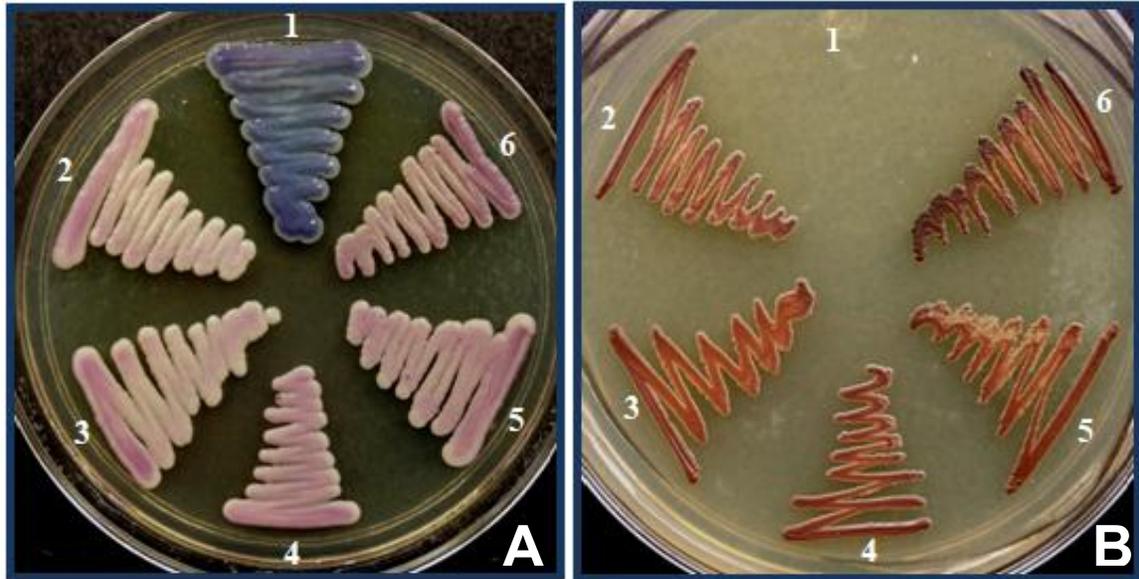


Figura 11. Cultivos de “*C.lusitanae*” en: A) CHROMagar *Candida*. 1= colonias en tonalidad morada y 2-6= colonias en tonos rosa claro mate. B) Agar Biggy, 1= sin desarrollo de colonia, 2-6= colonias de color café claro. Donde: 1= *C. lusitanae* ATCC 34449 y 2-6= aislados.

5.1.5. Aislados de *C.glabrata*.

A partir del desarrollo de los 13 aislados en SDA, se realizaron tinciones de Gram observándose levaduras en gemación de forma redonda a ovoide parecidas a *C. glabrata* (Figura 12).

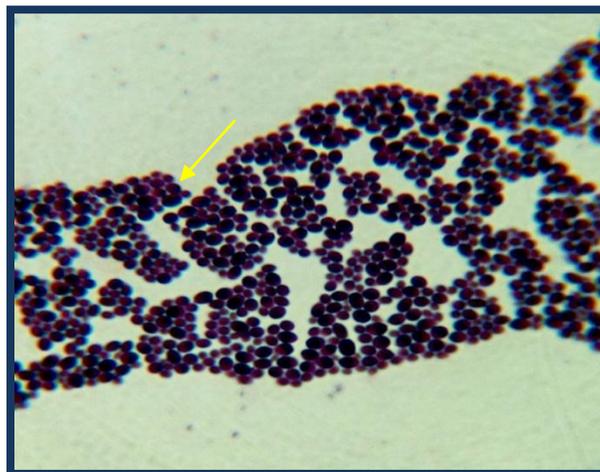


Figura 12. Tinción de Gram de *C.glabrata*. Levaduras en gemación de forma redonda a ovoides (100x).

De acuerdo al desarrollo en los medios, los 13 aislados en CHROMagar *Candida* presentaron colonias en tonos rosa claro mate y en agar Biggy de color café claro rojizo, lo cual coincidió con lo observado en la cepa control de *C.glabrata* (Instituto Pasteur) (Figura 13).

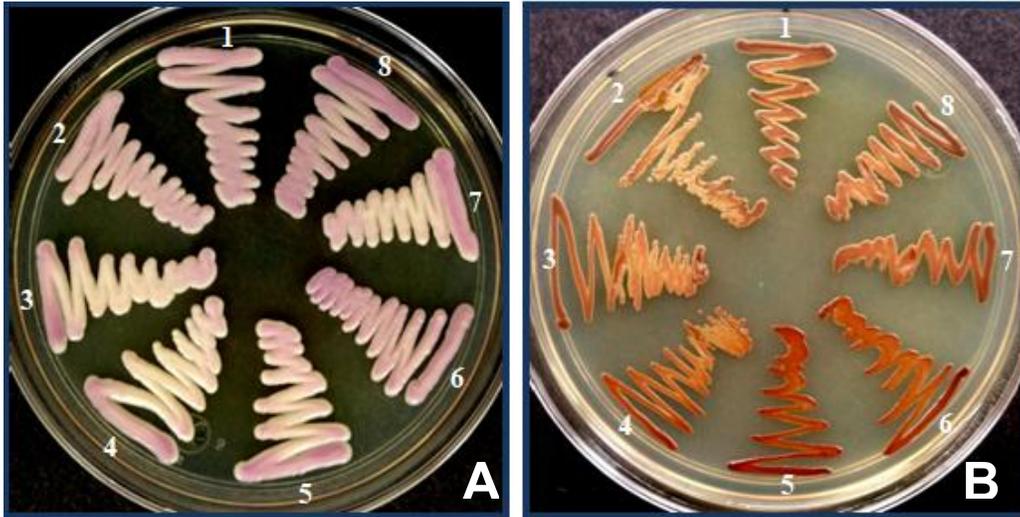


Figura 13. Cultivos de *C. glabrata* en: A) CHROMagar *Candida*, aislados en tonos rosas claro mate. B) Agar Biggy, aislados en tonos café rojizo. Donde: 1= *C.glabrata* (Instituto Pasteur) y 2-8= aislados.

5.1.6. Aislado de *C.parapsilosis*

Posterior al desarrollo en SDA se realizó la tinción de Gram del aislado identificado como *C.parapsilosis*, se observaron levaduras en gemación ovaladas, además de formación de pseudohifas (Figura 14).

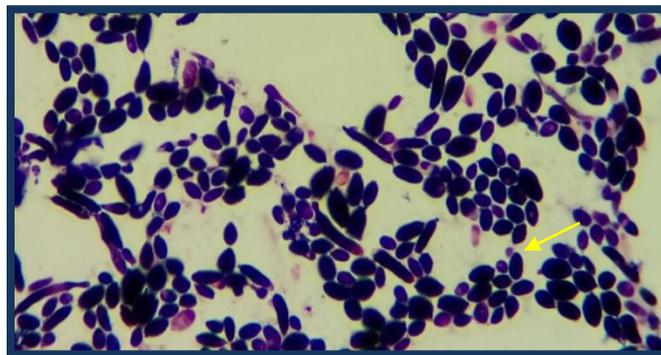


Figura 14. Tinción de Gram de *C.parapsilosis*. Levaduras ovaladas en gemación y presencia de pseudohifas (100 X).

De acuerdo al desarrollo en los medios CHROMagar *Candida* y agar Biggy del único aislado identificado como *C.parapsilosis*, presento un tono rosa pálido mate para el primer medio y un tono café rojizo para el segundo, dando características de color compatibles con *C.parapsilosis* ATCC 22019, que se utilizó como cepa control (Figura 15 y 16).

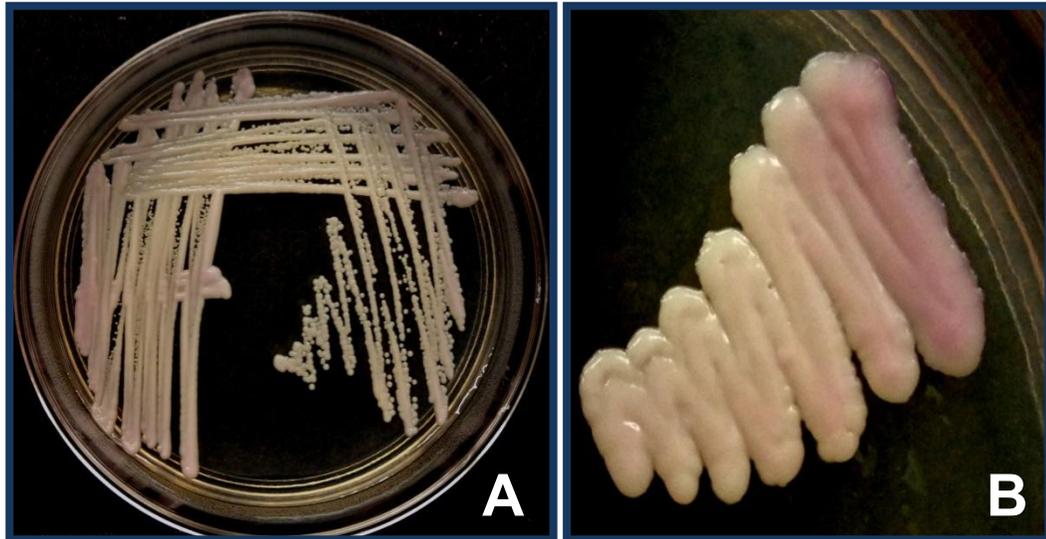


Figura 15. CHROMagar *Candida*. Donde: A) *C.parapsilosis* ATCC 22019 y B) Aislado *C.parapsilosis*, las colonias se observan, en tonos rosa claro mate.



Figura 16. Agar Biggy. Donde: A) *C.parapsilosis* ATCC 22019 y B) Aislado de *C.parapsilosis*. Las colonias se observan en tonos café claro rojizo.

5.1.7. Aislado de *Candida* spp.

Del cultivo en SDA de este aislado se realizó la tinción de Gram y se observaron levaduras en gemación de forma ovalada a cilíndrica con presencia de pseudohifas (Figura 17).

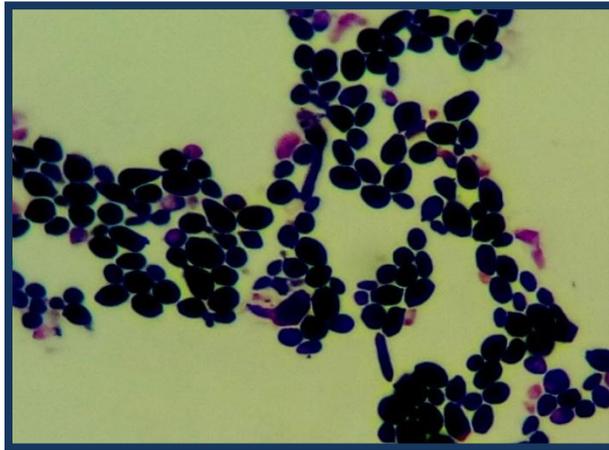


Figura 17. Tinción de Gram de *Candida* spp. Levaduras ovoides en gemación con presencia de pseudohifas (100X).

A partir del desarrollo en el CHROMagar *Candida* se observaron colonias con tonalidades en color rosa claro mate y en el agar Biggy colonias en tono café claro, características compatibles con *C.kefyr* (Figura 18 y 19).

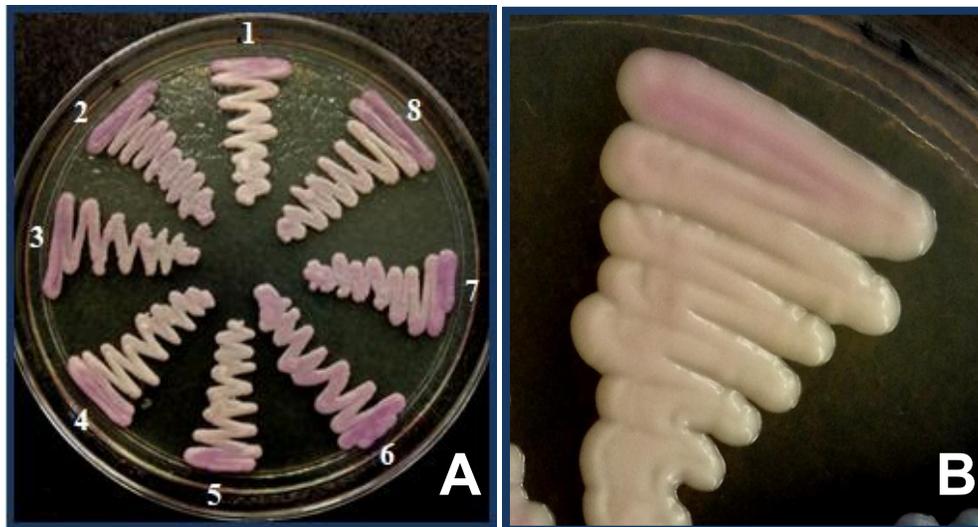


Figura 18. Medio CHROMagar *Candida*. Donde: A) 1-8 aislados de *C.kefyr* en tonos rosa claro y B) Aislado de *Candida* spp. en tono rosa claro mate.

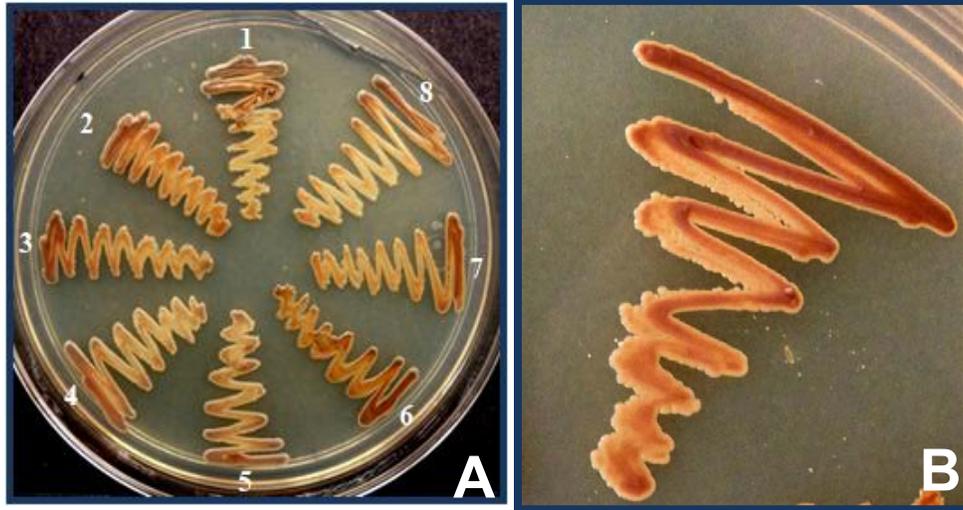


Figura 19. Agar Biggy. Donde: A) 1-8 =aislado de *C.kefyr* en tonos café claro. B) aislado de "*Candida spp*" en tono café claro.

Los resultados globales del desarrollo de las diferentes especies de *Candida* en CHROMagar *Candida* y agar Biggy se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Colores de las colonias en CHROMagar *Candida* y agar Biggy de las especies del género *Candida*.

Especies	CHROMagar <i>Candida</i>			Agar Biggy				
	N°	Verde Esmeralda	Rosa claro mate	Rosa brillante a lila	Café platinado	Café claro rojizo	Café claro	Café rojizo
<i>C.kefyr</i>	79	0	79	0	0	0	79	0
<i>C.guilliermondii</i>	73	0	0	73	0	0	0	73
<i>C.famata</i>	52	0	52	0	0	0	0	52
<i>C.glabrata</i>	13	0	13	0	0	0	0	13
<i>C.albicans</i>	3	3	0	0	3	0	0	0
<i>C.parapsilosis</i>	1	0	1	0	0	1	0	0
Total	221	3	145	73	3	1	79	138

5.2. Evaluación de las actividades enzimáticas de proteasas, fosfolipasas y hemolisinas de las diferentes especies de *Candida*.

Las mediciones de las diferentes actividades enzimáticas de todos los aislados se realizaron de acuerdo al protocolo descrito por Williamson *et al.*, 1986.

5.2.1. *Candida kefyr*.

El grupo de aislados de *C. kefyr* se conformó por: 24 aislados identificados previamente como *C. kefyr*, 36 identificados previamente como *C. tropicalis*, 3 identificados previamente como *C. lusitaniae* y un aislado identificado como *Candida* spp (Tabla 5).

Tabla 5. Origen de los aislados de *C.kefyr*.

Identificación morfológica y bioquímica	N° de aislados	Identificación CHROMagar <i>Candida</i> -agar Biggy
<i>Candida kefyr</i>	24	<i>Candida kefyr</i>
<i>Candida tropicalis</i>	36	<i>Candida kefyr</i>
<i>Candida lusitaniae</i>	18	<i>Candida kefyr</i>
<i>Candida spp.</i>	1	<i>Candida kefyr</i>
Total	79	<i>Candida kefyr</i>

Con respecto a la actividad enzimática de proteasas, fue alta para el 62% (49/79), media para el 25.3% (20/79), baja para el 1.3% (1/79) y sin actividad el 11.4% (9/79) (Figura 20).

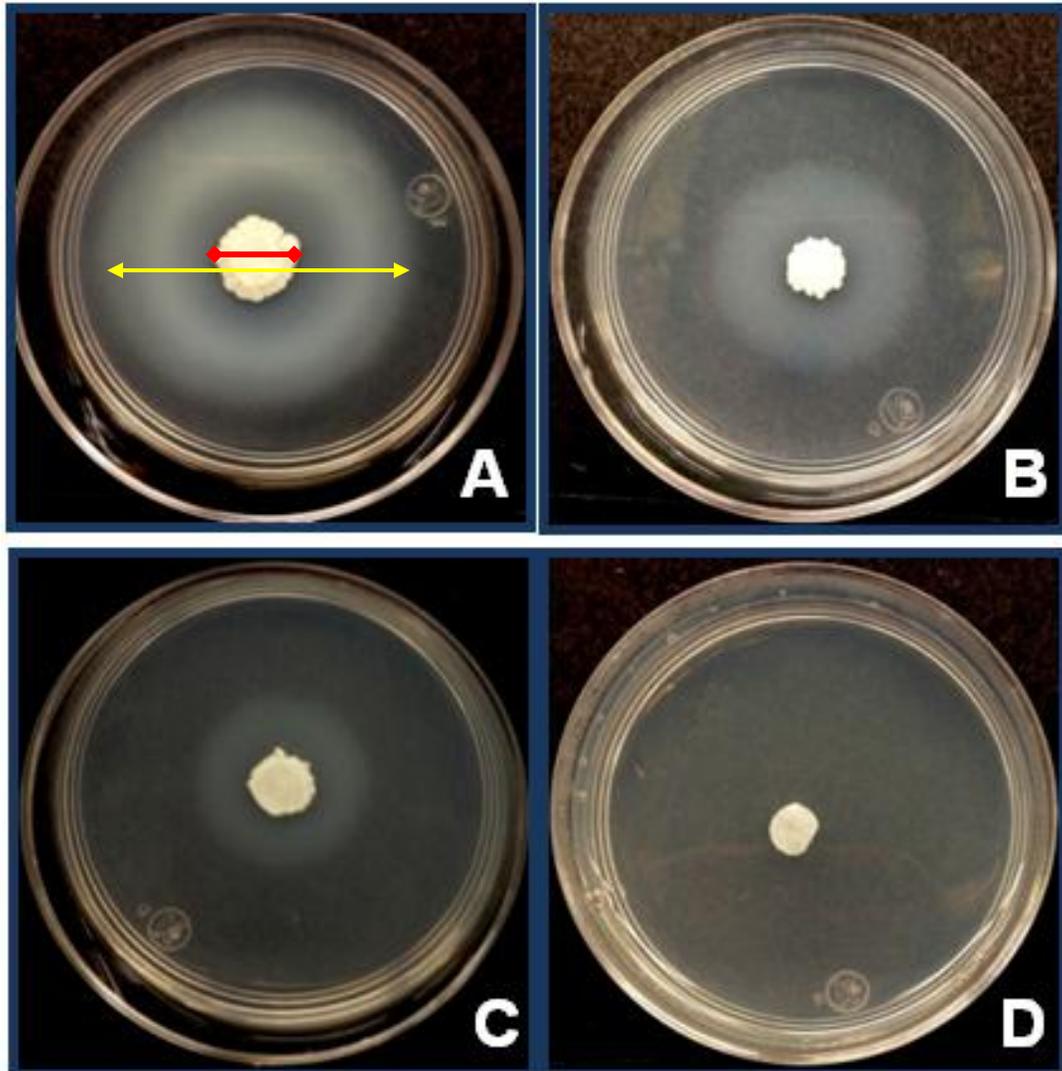


Figura 20. Actividades enzimáticas de proteasas de *C.kefyr*. Donde: A= alta. B= media. C= baja, y D=sin actividad. ↔ = Diámetro de la colonia. ↔ = Diámetro del halo.

Los aislados no presentaron actividad enzimática de fosfolipasas. (Figura 21).



Figura 21. Aislado de *C.kefyr* sin actividad enzimática de fosfolipasas

Para el caso de las hemolisinas, la actividad enzimática fue media para el 11.4% (9/79), baja para el 29.1% (23/79) y sin actividad el 59.5% (47/79) (Figura 22).

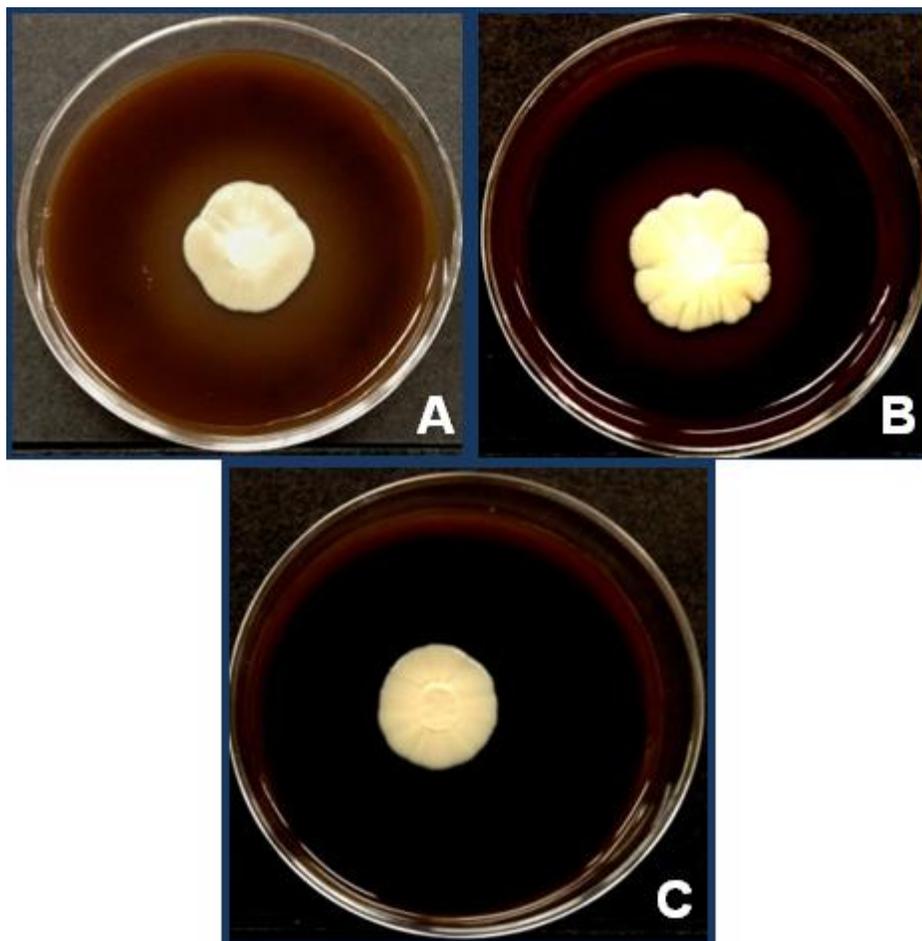


Figura 22. Actividades enzimáticas de hemolisinas de *C.kefyr*. Donde: A=media, B=baja y C= sin actividad.

En la Tabla 6 se encuentran los índices de actividad (Pz) obtenidos para cada uno de los aislados.

**Tabla 6. Actividades enzimáticas de aislados de *C.kefyr*.
Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz).**

N° de aislado	Pz		
	Proteasas	Fosfolipasas	Hemolisinas
1	0.36	1	1
2	0.45	1	1
3	0.52	1	1
4	0.33	1	1
5	0.6	1	1
6	0.47	1	1
7	0.58	1	1
8	0.34	1	1
9	0.34	1	1
10	0.43	1	1
11	0.33	1	1
12	0.37	1	1
13	0.32	1	1
14	0.34	1	1
15	0.32	1	1
16	0.35	1	1
17	0.64	1	1
18	0.34	1	1
19	0.31	1	1
20	1	1	1
21	0.48	1	1
22	0.35	1	1
23	0.48	1	1
24	1	1	1
25	0.37	1	1

Tabla 6. Actividades enzimáticas de aislados de <i>C.kefyr</i>.			
Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz).			
(Continuación a)			
26	0.25	1	1
27	0.29	1	0.78
28	0.41	1	0.81
29	0.29	1	0.76
30	0.41	1	1
31	0.32	1	1
32	1	1	1
33	0.44	1	0.56
34	0.32	1	1
35	0.36	1	1
36	0.38	1	1
37	0.33	1	1
38	0.36	1	1
39	0.35	1	0.56
40	0.31	1	0.81
41	0.31	1	0.65
42	0.34	1	0.54
43	0.44	1	0.57
44	0.45	1	1
45	0.37	1	0.55
46	0.31	1	0.73
47	0.26	1	0.63
48	1	1	0.67
49	0.39	1	1
50	0.3	1	0.55
51	0.3	1	0.68
52	1	1	0.66
53	1	1	0.67
54	0.4	1	1
55	1	1	0.69

Tabla 6. Actividades enzimáticas de aislados de <i>C.kefyr</i>. Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz). (Continuación b)			
56	0.35	1	0.69
57	0.35	1	1
58	0.35	1	1
59	0.36	1	0.64
60	0.36	1	1
61	0.42	1	1
62	0.38	1	0.8
63	0.37	1	0.71
64	0.34	1	0.52
65	0.28	1	0.71
66	1	1	0.48
67	0.37	1	0.64
68	0.42	1	1
69	0.44	1	0.76
70	1	1	0.5
71	0.3	1	1
72	0.45	1	1
73	0.35	1	1
74	0.32	1	0.73
75	0.3	1	0.7
76	0.31	1	1
77	0.44	1	0.66
78	0.44	1	0.8
79	0.38	1	1

5.4.2 *Candida guilliermondii*.

De los 73 aislados de *C.guilliermondii*, la actividad enzimática para proteasas fue la siguiente: alta el 82.1% (60/73), media el 9.8% (7/73), baja el 6.8% (5/73) y sin actividad el 1.3% (1/73) (Figura 23).

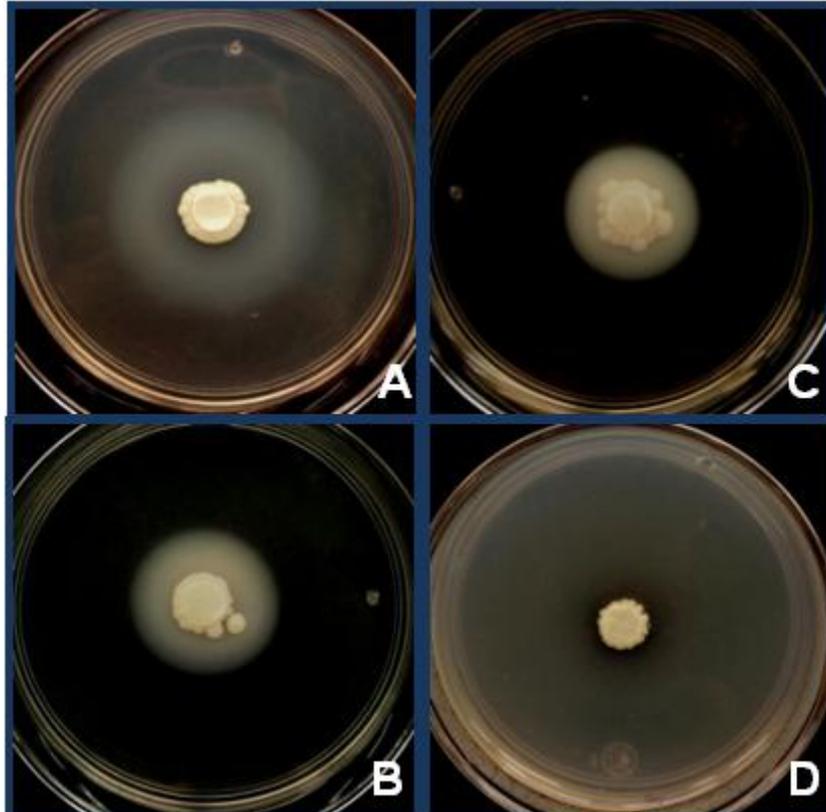


Figura 23. Actividades enzimáticas de proteasas de los aislados de *C.guilliermondii*.
A= alta. B= media, C= baja y D= sin actividad.

Los aislados no presentaron actividad enzimática de fosfolipasas (Figura 24).

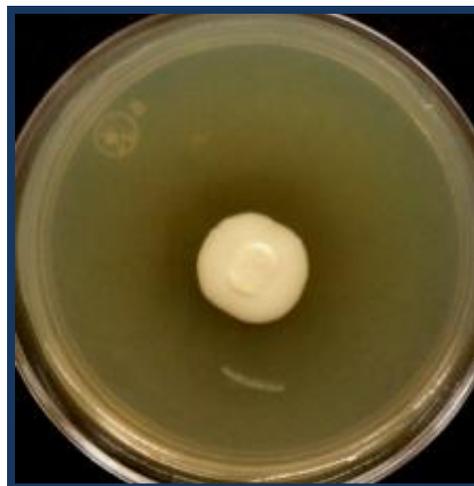


Figura 24. Aislados de *C.guilliermondii* sin actividad enzimática de fosfolipasas.

Con respecto a la producción de hemolisinas el 8.2% (6/73) presentaron actividad enzimática media, el 63% (46/73) presentaron una actividad baja y el 28.8% (21/73) no presentaron actividad de hemolisinas (Figura 25).

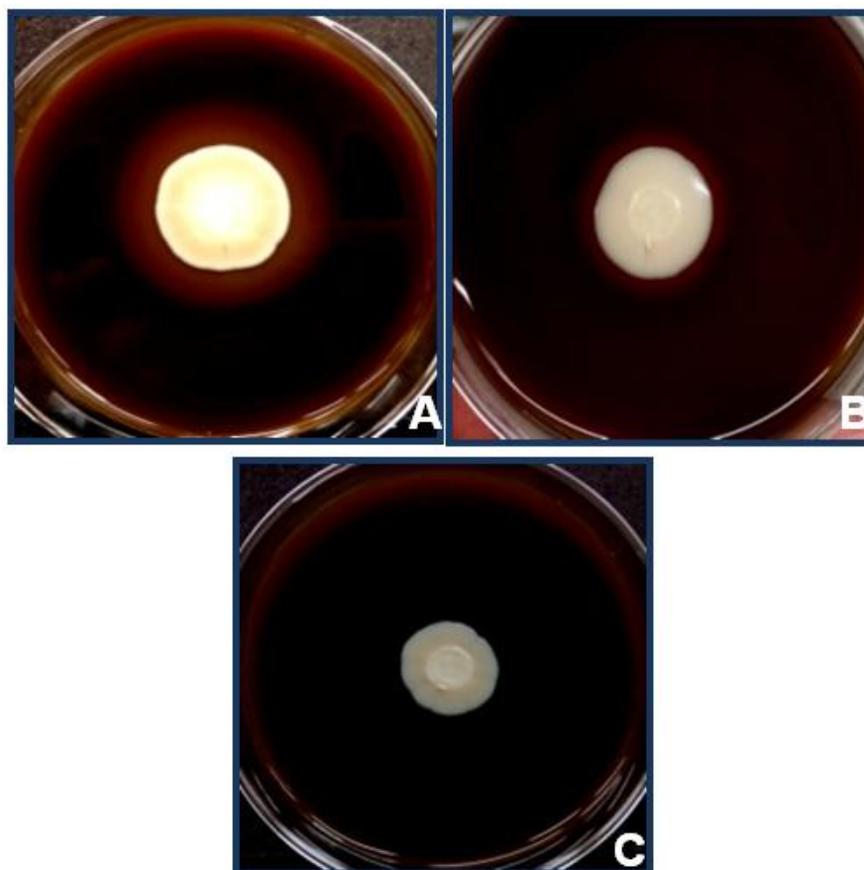


Figura 25. Actividad enzimática de hemolisinas de *C.guilliermondii*. Donde: A= media, B= baja, y C= sin actividad.

Los resultados de los índices de la zona de precipitación de las diferentes actividades enzimáticas de *C.guilliermondii* se encuentran en la Tabla 7.

Tabla 7. Actividades enzimáticas de aislados de *C.guilliermondii*. Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz).

N° de aislado	Pz		
	Proteasas	Fosfolipasas	Hemolisinas
1	0.34	1	0.62
2	0.33	1	0.68

Tabla 7. Actividades enzimáticas de aislados de <i>C.guilliermondii</i>. Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz). (Continuación a)			
3	0.58	1	1
4	0.23	1	0.57
5	0.38	1	0.79
6	0.31	1	0.7
7	0.31	1	0.72
8	0.45	1	0.66
9	1	1	0.7
10	0.35	1	0.54
11	0.39	1	0.76
12	0.36	1	1
13	0.29	1	0.76
14	0.3	1	0.78
15	0.34	1	0.7
16	0.38	1	0.7
17	0.28	1	1
18	0.34	1	0.72
19	0.33	1	0.7
20	0.33	1	0.58
21	0.33	1	0.75
22	0.35	1	1
23	0.36	1	0.55
24	0.34	1	0.7
25	0.41	1	1
26	0.27	1	1
27	0.2	1	0.51
28	0.42	1	1
29	0.37	1	1
30	0.39	1	0.66
31	1	1	0.63
32	0.23	1	0.65
33	0.32	1	0.75
34	0.25	1	0.76
35	0.38	1	1
36	0.29	1	0.57
37	1	1	0.72

Tabla 7. Actividades enzimáticas de aislados de <i>C.guilliermondii</i>. Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz). (Continuación b)			
38	0.3	1	0.74
39	0.34	1	0.7
40	0.24	1	0.75
41	0.41	1	0.67
42	0.38	1	0.66
43	0.36	1	1
44	0.29	1	0.57
45	1	1	0.63
46	1	1	0.78
47	0.34	1	0.82
48	0.38	1	0.75
49	0.38	1	0.68
50	0.35	1	0.64
51	0.24	1	0.75
52	0.34	1	1
53	0.29	1	0.73
54	0.3	1	1
55	0.37	1	1
56	0.34	1	1
57	0.36	1	1
58	0.28	1	0.85
59	0.44	1	1
60	0.26	1	0.74
61	0.34	1	1
62	0.43	1	0.65
63	0.39	1	1
64	0.31	1	1
65	0.26	1	0.78
66	0.27	1	0.79
67	0.34	1	0.59
68	0.34	1	0.66
69	0.26	1	0.7
70	0.7	1	0.78
71	0.21	1	0.71
72	0.3	1	1
73	0.32	1	1

5.2.2. *Candida famata*.

Con relación a la producción de proteasas, de los 52 aislados de *C.famata*, el 80.7% (42/52) tuvieron una actividad alta, el 17.3% (9/52) media y el 2% (1/52) no presentaron actividad (Figura 26).

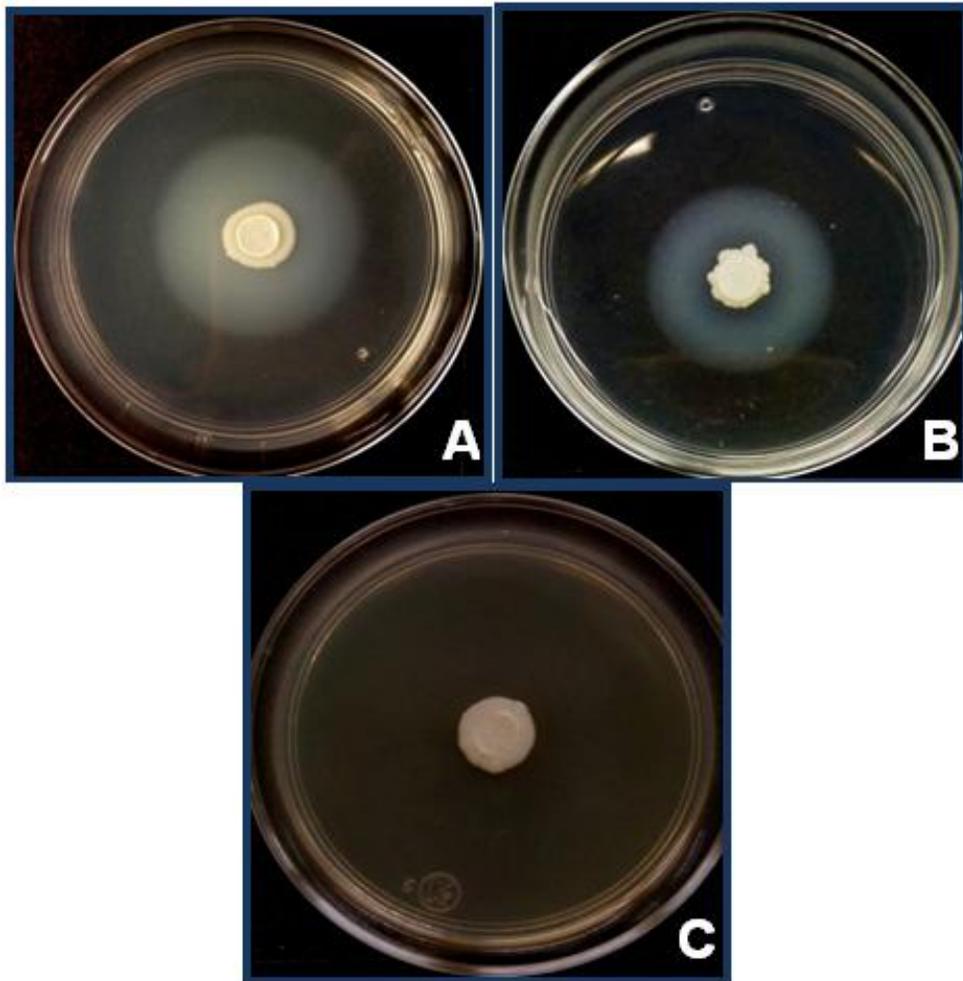


Figura 26. Actividades enzimáticas de proteasas de *C.famata*. Donde: A= alta, B= media y C= sin actividad.

Los aislados de esta especie no presentaron actividad de fosfolipasas. (Figura 27).

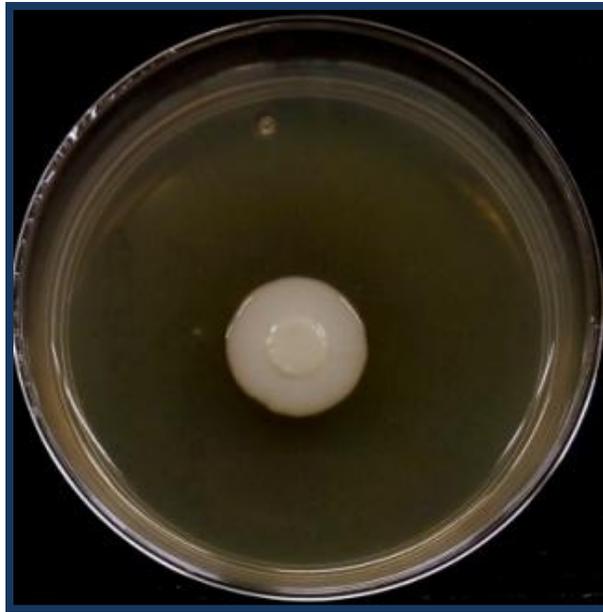


Figura 27. Aislado de *C.famata* sin actividad enzimática de fosfolipasas.

Con respecto a la producción de hemolisinas los aislados presentaron actividad media el 7.7% (4/52), baja el 59.7% (31/52) y sin actividad el 32.7% (17/52) (Figura 28).

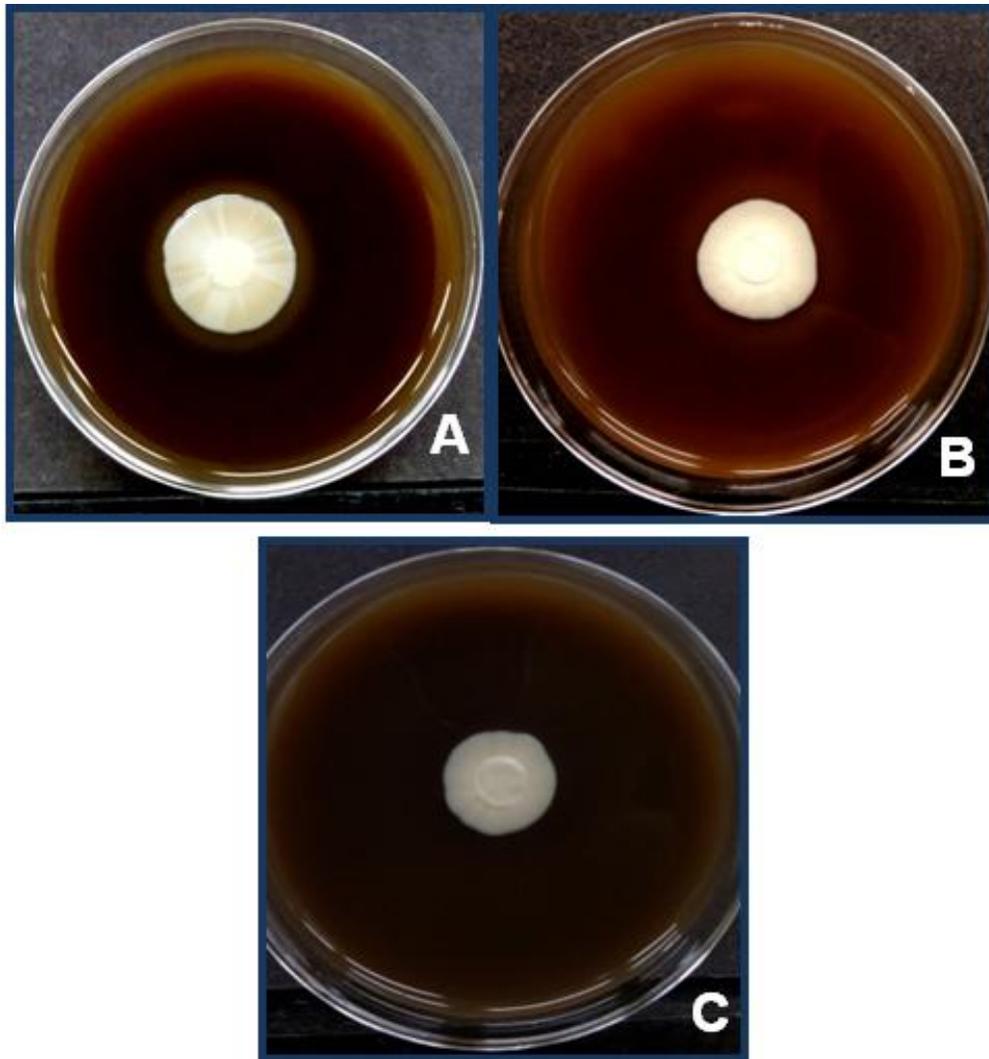


Figura 28. Actividad enzimática de hemolisinas de *C.famata*. Donde: A= media, B= baja C= sin actividad.

En la Tabla 8 se muestran los índices de la zona de precipitación de las diferentes actividades enzimáticas que presento esta especie.

**Tabla 8. Actividades enzimáticas de aislados de *C.famata*.
Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz).**

N° de aislado	Pz		
	Proteasas	Fosfolipasas	Hemolisinas
1	0.36	1	1
2	0.3	1	0.73
3	0.32	1	0.73
4	0.32	1	1

Tabla 8. Actividades enzimáticas de aislados de <i>C.famata</i>. Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz). (Continuación a)			
5	0.26	1	0.73
6	0.36	1	0.71
7	0.34	1	0.66
8	0.3	1	0.67
9	0.27	1	1
10	0.27	1	0.74
11	0.39	1	1
12	0.38	1	0.66
13	0.37	1	0.67
14	0.33	1	0.7
15	0.35	1	0.68
16	0.42	1	1
17	0.37	1	0.74
18	0.34	1	0.62
19	0.34	1	0.73
20	0.34	1	0.7
21	1	1	0.68
22	0.32	1	1
23	0.42	1	1
24	0.36	1	0.52
25	0.29	1	0.68
26	0.31	1	0.73
27	0.38	1	1
28	0.32	1	0.69
29	0.29	1	0.63
30	0.409	1	0.69
31	0.39	1	0.8
32	0.36	1	1
33	0.34	1	1
34	0.35	1	0.75
35	0.34	1	0.7
36	0.31	1	0.68
37	0.34	1	0.69
38	0.36	1	1
39	0.32	1	1
40	0.35	1	0.65
41	0.31	1	0.65
42	0.42	1	0.56

43	0.33	1	0.62
44	0.5	1	1
45	0.47	1	1
46	0.43	1	1
47	0.43	1	1
48	0.36	1	1
49	0.38	1	0.7
50	0.21	1	0.57
51	0.42	1	0.74
52	0.36	1	0.74

5.2.3. *Candida glabrata*

Con respecto a los 13 aislados de *C.glabrata* y con relación a la actividad enzimática de proteasas, fue alta para el 69.3% (9/13) y media para el 30.7% (4/14) (Figura 29).

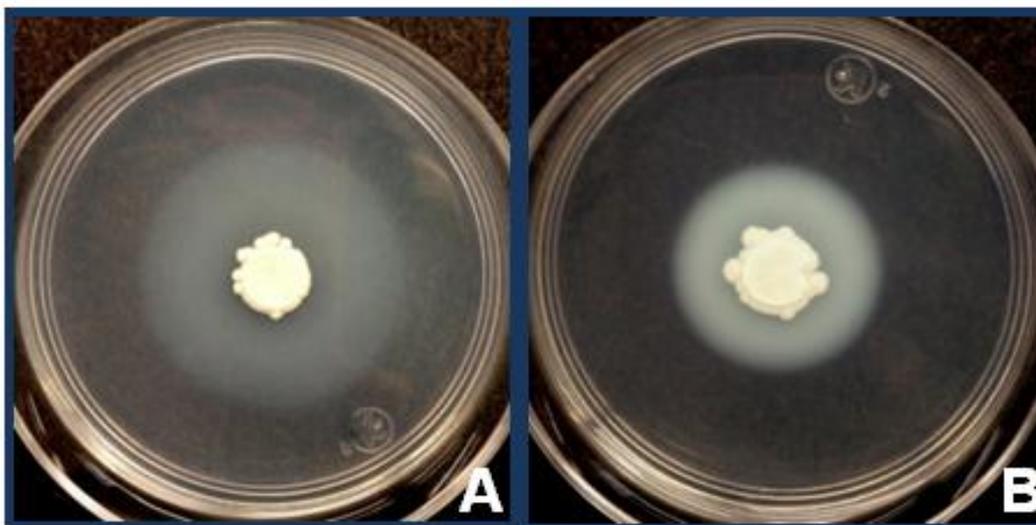


Figura 29. Actividades enzimáticas de proteasas de *C.glabrata*. Donde: A= alta. B= media

Esta especie no presenta actividad enzimática de fosfolipasas y hemolisinas. (Figura 30).

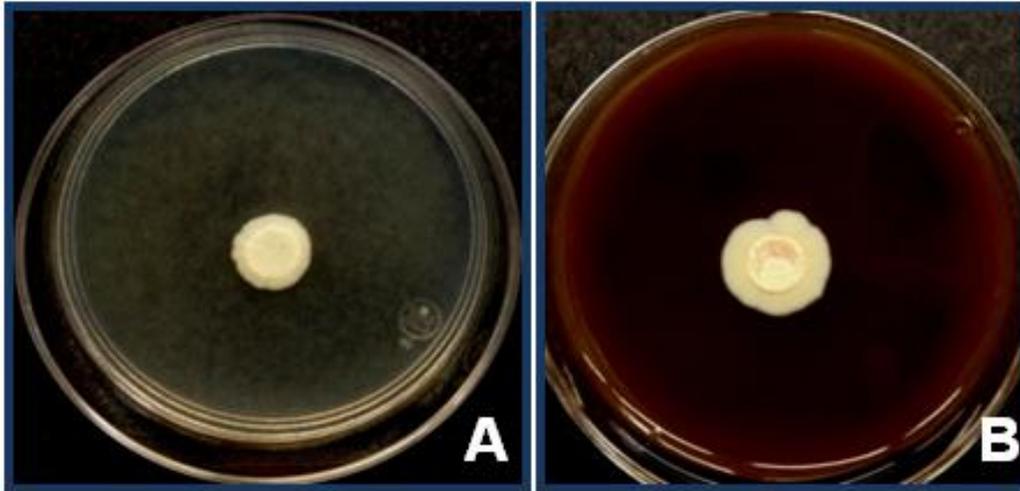


Figura 30. Aislados de *C. glabrata* sin actividad enzimática de fosfolipasas y hemolisinas.
 . Donde: A) Medio para fosfolipasas y B) Medio para hemolisinas.

Los índices de actividad enzimática se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Actividades enzimáticas de aislados de *C.glabrata*.

Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz).

N° de aislado	Pz		
	Proteasas	Fosfolipasas	Hemolisinas
1	0.44	1	1
2	0.3	1	1
3	0.39	1	1
4	0.43	1	1
5	0.44	1	1
6	0.35	1	1
7	0.37	1	1
8	0.37	1	1
9	0.45	1	1
10	0.35	1	1
11	0.36	1	1
12	0.32	1	1
13	0.35	1	1

5.4.1. *Candida albicans*.

Los tres aislados reclasificados como *C.albicans* tuvieron una alta actividad enzimática de proteasas (Figura 31).

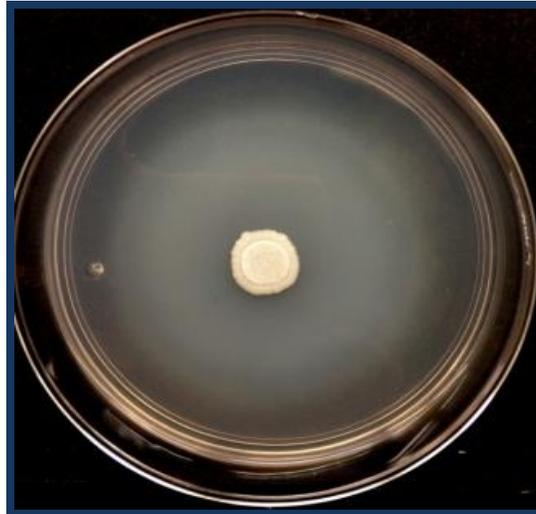


Figura 31. Actividad de proteasas de *C.albicans*.

En el caso de la actividad enzimática de fosfolipasas el 33.3% (1/3) presentaron actividad media, mientras que para el 66.7% (2/3) fue baja (Figura 32).

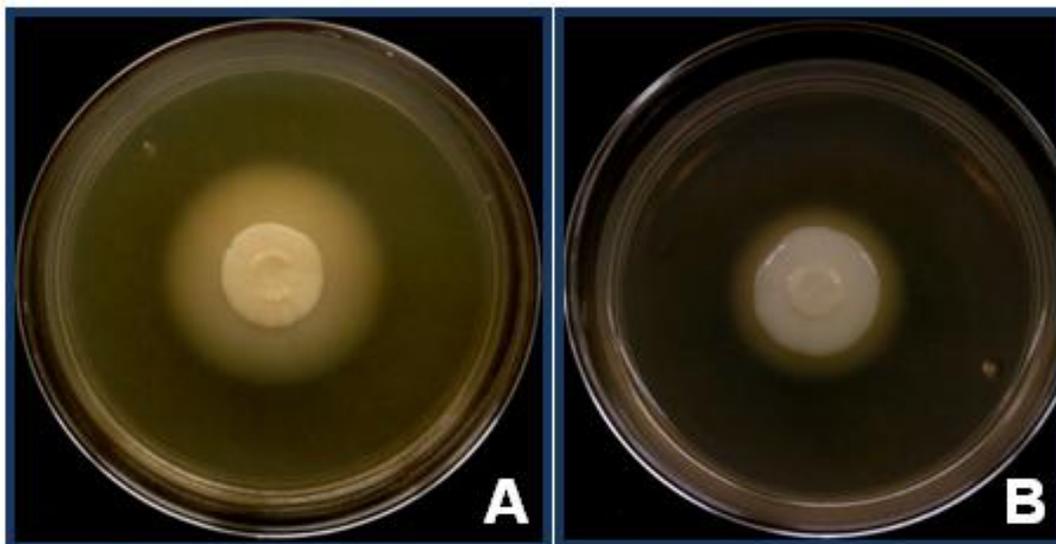


Figura 32. Actividad enzimática de fosfolipasas de *C.albicans*. Donde: A= media y B= baja.

Para la actividad de hemolisinas, el 66.7% (2/3) presento una actividad media y el 33.3% (1/3) presento actividad baja (Figura 33).

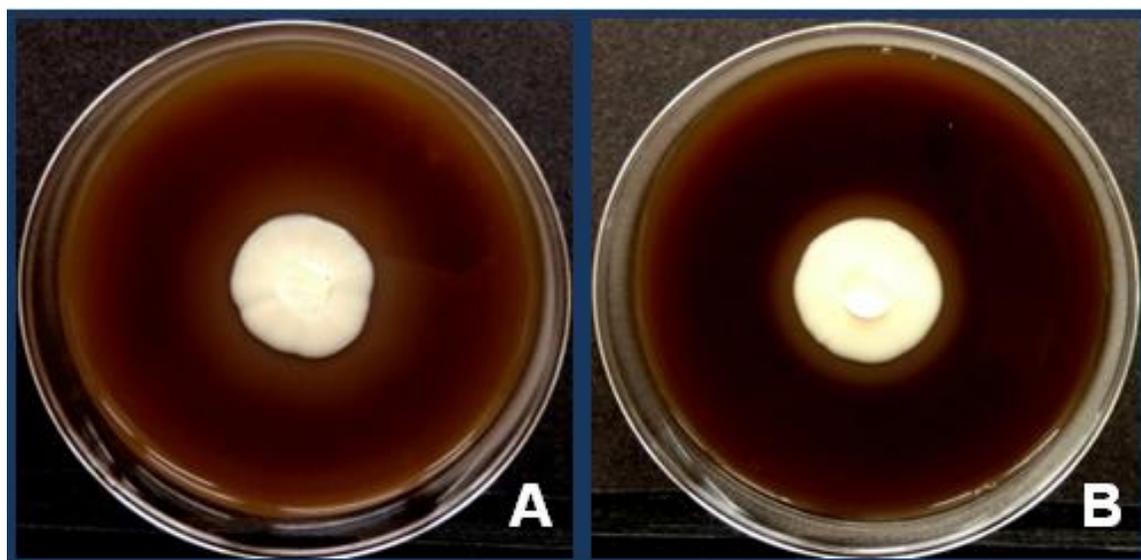


Figura 33. Actividad enzimática de hemolisinas de *C.albicans*. Donde: A) media. B) baja.

En la Tabla 10 se encuentran los índices de las actividades enzimáticas que presentó esta especie.

Tabla 10. Actividades enzimáticas de aislados de *C.albicans*.

Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz).

N° de aislado	Pz		
	Proteasas	Fosfolipasas	Hemolisinas
1	0.23	0.63	0.64
2	0.25	0.57	0.52
3	0.24	0.62	0.46

5.4.1. *Candida parapsilosis*.

Con respecto al aislado de *C.parapsilosis*, presentó actividad alta de proteasas y no presentó actividad de fosfolipasas ni hemolisinas (Figura 34 y 35)

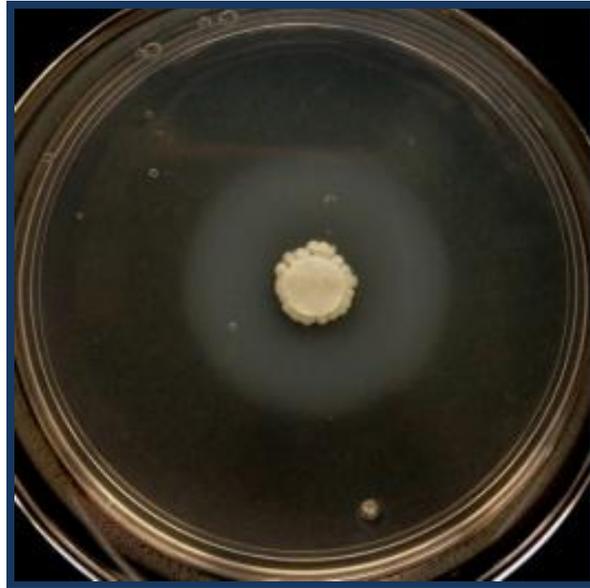


Figura 34. Actividad enzimática de proteasas de *C.parapsilosis*

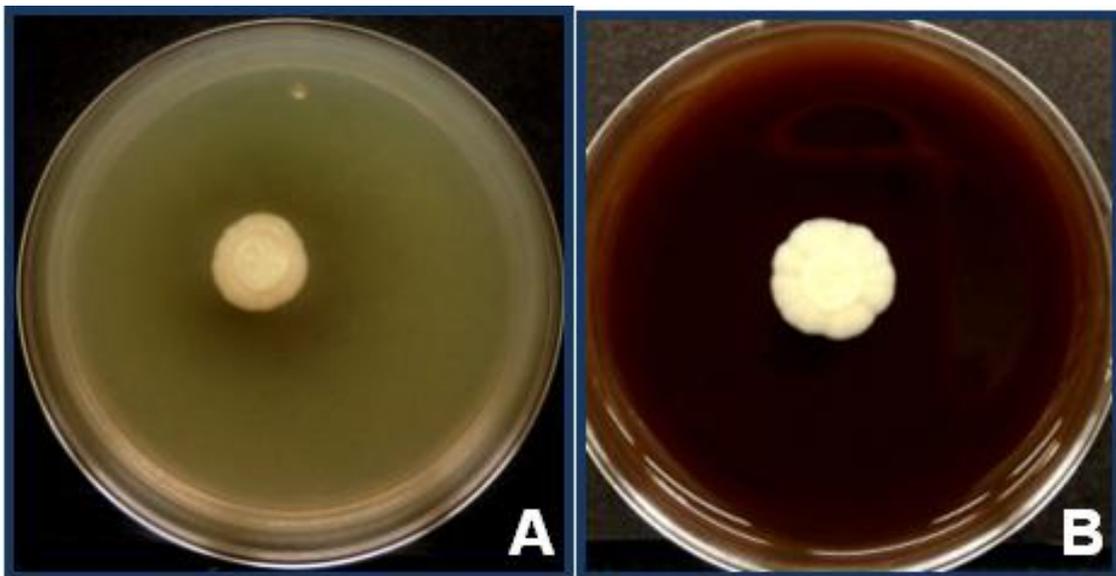


Figura 35. Aislado sin actividad enzimática de fosfolipasas (A), ni de hemolisinas (B) de *C.parapsilosis*.

En la Tabla 11 se encuentran los resultados de los índices de las diferentes actividades enzimáticas de esta especie.

**Tabla 11. Actividades enzimáticas de aislados de *C.parapsilosis*.
Medias de los índices de la zona de precipitación (Pz).**

N° de aislado	Pz		
	Proteasas	Fosfolipasas	Hemolisinas
1	0.3	1	1

Los resultados globales de las actividades enzimáticas de proteasas, fosfolipasas y hemolisinas de las especies trabajadas se pueden ver en la Tabla 12.

Tabla 12. Actividad enzimática de las diferentes especies de *Candida* aisladas en leches de cabras clínicamente sanas.

Especie de <i>Candida</i>	Zona de Precipitación											
	Proteasas				Fosfolipasas				Hemolisinas			
	1	0.61-0.99	0.41-0.60	≤0.4	1	0.61-0.99	0.41-0.60	≤0.4	1	0.61-0.99	0.41-0.60	≤0.4
<i>C.kefyr</i> (n=79)	1	9	20	49	79	-	-	-	47	23	9	-
<i>C.guilliermondii</i> (n=73)	1	5	7	60	73	-	-	-	21	46	6	-
<i>C.famata</i> (n=52)	1	-	9	42	52	-	-	-	17	31	4	-
<i>C.glabrata</i> (n=13)	-	-	4	9	13	-	-	-	13	-	-	-
<i>C.albicans</i> (n=3)	-	-	-	3	-	2	1	-	-	1	2	-
<i>C.parapsilosis</i> (n=1)	-	-	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-
Actividad enzimática: 1= nula 0.61-0.99 = baja 0.41-0.60 = media ≤0.40 = alta.												

5.3 Formación de biopelículas.

Con relación a la formación de biopelículas, la lectura se realizó en un lector de ELISA BioTek y los datos de densidad óptica (DO) se registraron para los controles negativos, positivos y para los aislados. Para definir si los aislados eran o no formadores de biopelículas, se obtuvo el punto de corte, para lo cual se utilizaron los datos de DO de los controles negativos (YNBG) de cada una de las 26 microplacas que se utilizaron en la prueba (Tabla 13).

Tabla 13. Densidades Ópticas (DO) de los controles negativos.

N° de Control (-)	Densidad Óptica
1	0.081
2	0.105
3	0.085
4	0.088
5	0.085
6	0.081
7	0.081
8	0.082
9	0.078
10	0.074
11	0.073
12	0.078
13	0.146
14	0.073
15	0.052
16	0.104
17	0.09
18	0.077
19	0.091
20	0.109
21	0.095
22	0.092
23	0.077
24	0.076
25	0.092
26	0.071
SUMA	2.236
Promedio	0.086
DS	0.017
2DS	0.034

Donde DS= Desviación estándar

De estos valores se obtuvo el promedio (0.086) y la desviación estándar

DS= 0.017.

Para tener una confiabilidad del 95%, se multiplicó por 2 la DS:

$$2 (0.017) = 0.034$$

Entonces el punto de corte se obtuvo:

Promedio de la DO de los controles negativos + 2(DS)

$$0.086 + 0.034 = 0.120$$

Con este valor, se establecieron los siguientes intervalos de formación de biopelículas:

a) $DO \leq 0.120$ = No formadoras

La DO del aislado se encuentra por debajo del punto de corte.

b) $DO = 0.121-0.240$ = Poco formadoras

La DO del aislado se encuentra entre el punto de corte y el valor de DO correspondiente al doble del mismo: $DOc < DO \leq 2DOc$.

c) $DO = 0.241-0.480$ = Medianamente formadoras

La DO del aislado se encuentra entre el doble del valor del punto de corte y el valor de DO correspondiente al cuádruple del mismo: $2DOc < DO \leq 4DOc$.

d) $DO = \geq 0.481$ = Fuertemente formadoras.

La DO del aislado se encuentra por arriba del cuádruple del valor del punto de corte: $4DOc < DO$.

[45 y 49].

Con los datos anteriores y la lectura de las densidades ópticas de cada uno de los aislados, los resultados de formación de biopelícula para cada especie del género *Candida*, quedó como sigue:

5.4.2. *Candida kefyr*.

Con respecto a la formación de biopelícula de los 79 aislados de esta especie, las densidades ópticas registradas se encuentran en la Tabla 14.

Tabla 14. Densidades ópticas de los aislados de *C.kefyr*

N° de aislado	Densidad Óptica (DO)
1	0.16
2	0.275
3	0.497
4	0.137
5	0.125
6	0.077
7	0.216
8	0.122
9	0.175
10	0.119
11	0.144
12	0.158
13	0.233
14	0.111
15	0.132
16	0.159
17	0.127
18	0.136
19	0.145
20	0.156
21	0.154
22	0.127
23	0.109
24	0.123

**Tabla 14. Densidades ópticas de los aislados de *C.kefyr*
(Continuación a).**

25	0.125
26	0.095
27	0.094
28	0.102
29	0.109
30	0.254
31	0.108
32	0.116
33	0.158
34	0.193
35	0.163
36	0.086
37	0.123
38	0.247
39	0.138
40	0.099
41	0.103
42	0.115
43	0.091
44	0.11
45	0.113
46	0.119
47	0.113
48	0.166
49	0.156
50	0.1
51	0.13
52	0.222

Tabla 14. Densidades ópticas de los aislados de <i>C.kefyr</i> (Continuación b).	
53	0.113
54	0.085
55	0.141
56	0.136
57	0.129
58	0.152
59	0.138
60	0.133
61	0.153
62	0.268
63	0.133
64	0.153
65	0.368
66	0.249
67	0.216
68	0.167
69	0.144
70	0.239
71	0.118
72	0.398
73	0.133
74	0.203
75	0.142
76	0.16
77	0.152
78	0.16
79	0.086

Con base en las DO obtenidas, el 1.3% (1/79) fueron fuertes formadoras, el 8.8% (7/79) medianamente formadoras, el 63.3% (50/79) fueron poco formadoras y el 26.6% (21/79) no formó biopelícula (Figura 36).

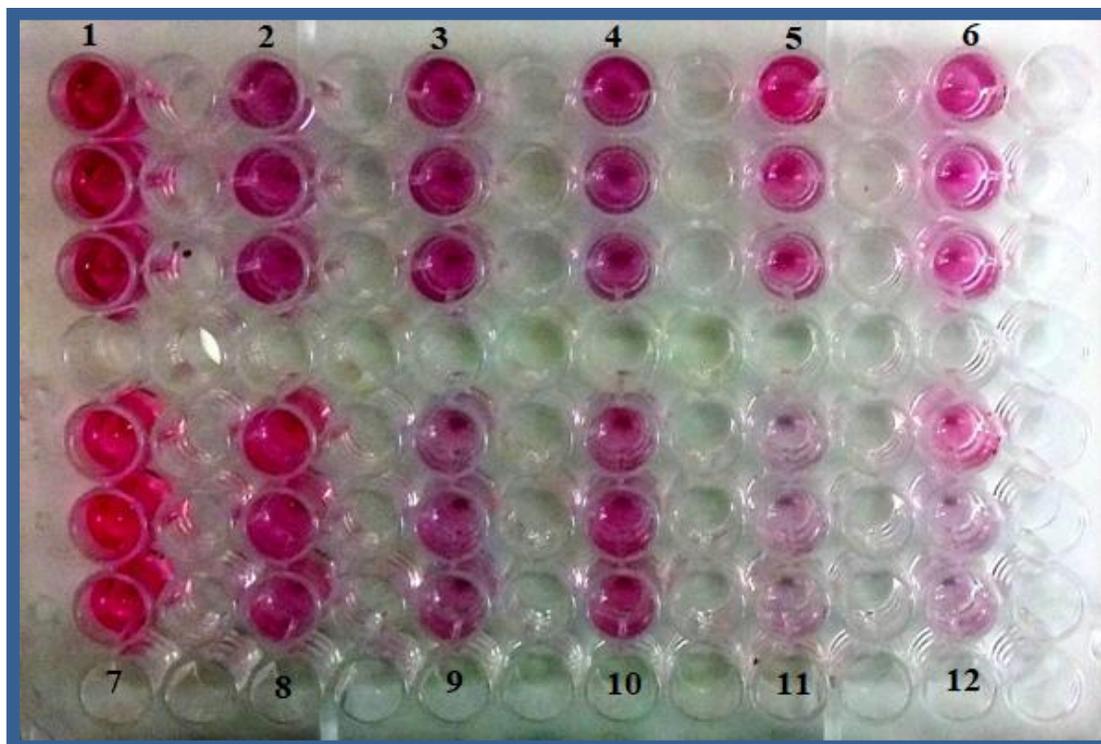


Figura 36. Formación de biopelícula de los aislados de *C.kefyr*. Donde 1= Control positivo (*C.tropicalis* 89LRC), 2-11= aislados de *C.kefyr*, y 12= Control negativo (YNBG).

5.5.2 *Candida guilliermondii*

Las densidades ópticas registradas de los 73 aislados de esta especie se encuentran en la Tabla 15.

Tabla 15. Densidades ópticas de los aislados de *C.guilliermondii*

N° de aislado	Promedio de la Densidad Óptica (DO)
1	0.146
2	0.122
3	0.162
4	0.207
5	0.103

Tabla 15. Densidades ópticas de los aislados de <i>C.guilliermondii</i>. (Continuación a)	
6	0.109
7	0.153
8	0.136
9	0.164
10	0.232
11	0.086
12	0.301
13	0.184
14	0.232
15	0.236
16	0.159
17	0.381
18	0.092
19	0.114
20	0.207
21	0.12
22	0.114
23	0.123
24	0.111
25	0.23
26	0.398
27	0.106
28	0.172
29	0.121
30	0.13
31	0.301
32	0.121
33	0.09
34	0.137
35	0.126
36	0.149
37	0.201
38	0.085
39	0.136
40	0.121

Tabla 15. Densidades ópticas de los aislados de <i>C.guilliermondii</i>. (Continuación b)	
41	0.128
42	0.144
43	0.095
44	0.218
45	0.148
46	0.101
47	0.08
48	0.119
49	0.225
50	0.12
51	0.115
52	0.265
53	0.142
54	0.157
55	0.193
56	0.078
57	0.132
58	0.153
59	0.167
60	0.151
61	0.155
62	0.144
63	0.119
64	0.41
65	0.184
66	0.245
67	0.113
68	0.138
69	0.111
70	0.091
71	0.167
72	0.185
73	0.27

De acuerdo a estos resultados, el 11% (8/73) fueron medianamente formadoras, el 60.7% (44/73) tuvo poca formación y el 28.7 % (21/73) no formo biopelícula (Figura 37).

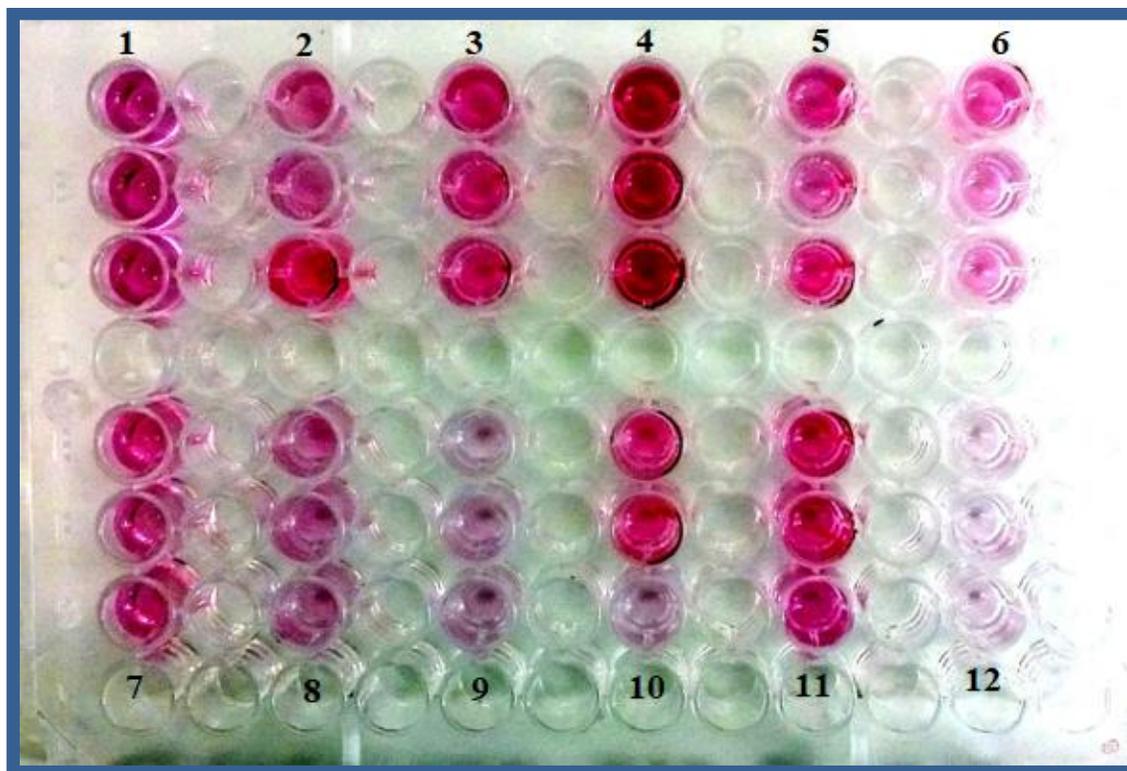


Figura 37. Formación de biopelícula de los aislados de *C.guilliermondii*. Donde 1= Control positivo (*C.tropicalis* 89LRC), 2-11= aislados de *C.guilliermondii*, y 12= Control negativo (YNBG).

5.4.3. *Candida famata*.

De los 52 aislados de esta especie, las densidades ópticas registradas se encuentran en la Tabla 16.

Tabla 16. Densidades ópticas de los aislados de *C.famata*

N° de aislado	Densidad Óptica (DO)
1	0.281
2	0.122
3	0.113

**Tabla 16. Densidades ópticas de los aislados de *C.famata*.
(Continuación a)**

4	0.115
5	0.101
6	0.169
7	0.353
8	0.127
9	0.21
10	0.143
11	0.143
12	0.098
13	0.091
14	0.115
15	0.127
16	0.102
17	0.11
18	0.086
19	0.093
20	0.155
21	0.253
22	0.257
23	0.289
24	0.627
25	0.502
26	0.111
27	0.137
28	0.172
29	0.167
30	0.234
31	0.186
32	0.096
33	0.153
34	0.095
35	0.172
36	0.159
37	0.114
38	0.134
39	0.149

Tabla 16. Densidades ópticas de los aislados de <i>C.famata</i> . (Continuación b)	
40	0.129
41	0.089
42	0.08
43	0.131
44	0.134
45	0.175
46	0.097
47	0.165
48	0.135
49	0.116
50	0.186
51	0.326
52	0.17

De acuerdo a estas lecturas, el 3.9% (2/52) presentaron una fuerte formación de biopelícula, el 11.5% (6/52) medianamente, el 50% (26/52) poca formación y el 34.6% (18/52) no la formaron (Figura 38).

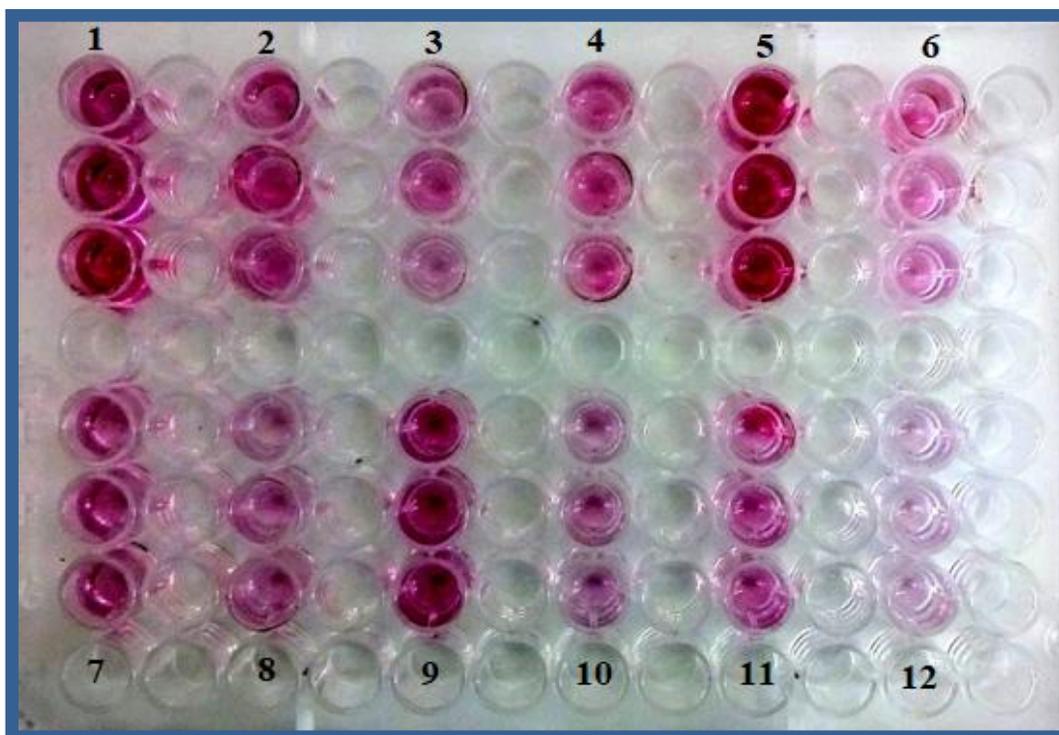


Figura 38. Formación de biopelícula de los aislados de *C.famata*. Donde 1= Control positivo (*C.tropicalis* 89LRC), 2-11= aislados de *C.famata*, y 12= Control negativo (YNBG).

5.4.4. *Candida glabrata*.

Las densidades ópticas de los 13 aislados de esta especie se encuentran en la Tabla 17.

Tabla 17. Densidades ópticas de los aislados de *C.glabrata*

N° de aislado	Densidad Óptica (DO)
1	0.105
2	0.152
3	0.177
4	0.144
5	0.127
6	0.135
7	0.329
8	0.181
9	0.159
10	0.1
11	0.166
12	0.152
13	0.209

Y de acuerdo a estos resultados, se obtuvo que el 7.7% (1/13) fueron medianamente formadoras de biopelícula, el 76.9% (10/13) tuvo poca formación y el 15.4% (2/13) no la formó (Figura 39).

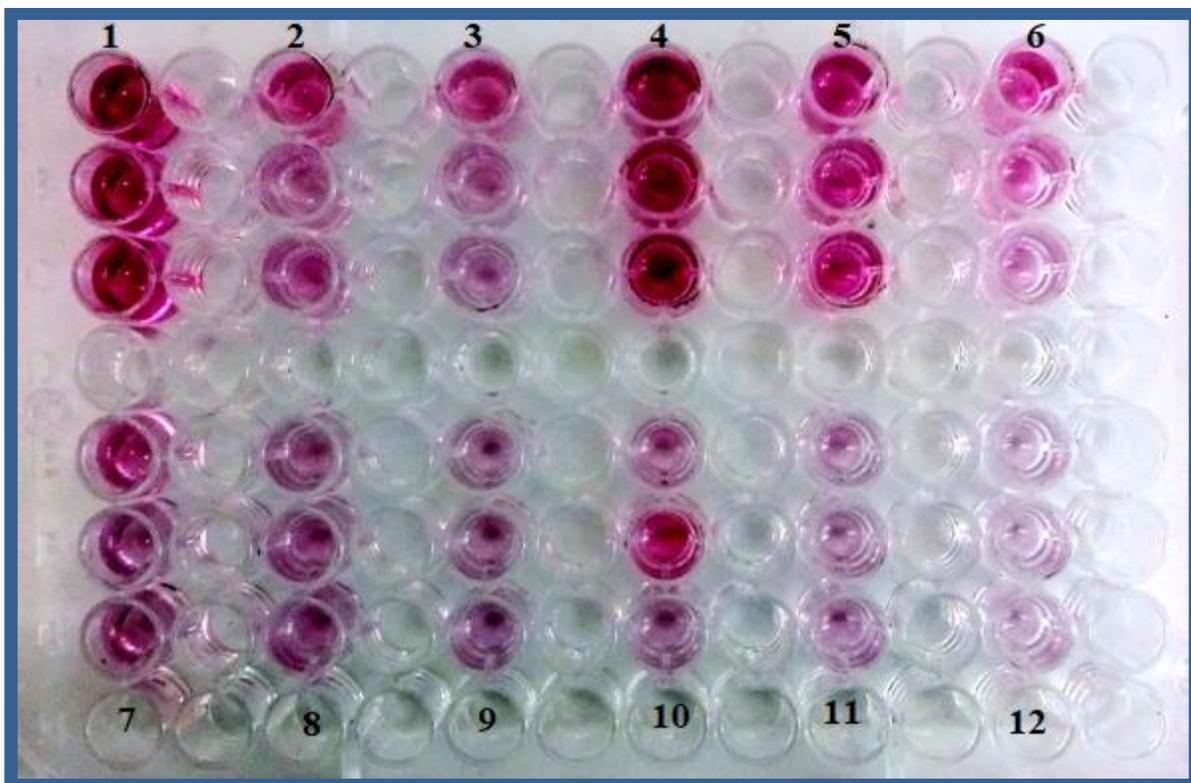


Figura 39. Formación de biopelícula de los aislados de *C.glabrata*. Donde 1= Control positivo (*C.tropicalis* 89LRC), 2-11= aislados de *C.glabrata*, y 12= Control negativo (YNBG).

5.4.5. *Candida albicans*.

Las densidades ópticas de los tres aislados de *C.albicans* se encuentran en la Tabla 18, observándose que el 100% resulto con poca producción de biopelículas (Figura 40).

Tabla 18. Densidades ópticas de los aislados de *C.albicans*

N° de aislado	Densidad Óptica (DO)
1	0.153
2	0.138
3	0.129

5.4.6. *Candida parapsilosis*.

El único aislado de *C.parapsilosis* no tuvo producción de biopelícula, registrando una DO menor a 0.120 (Figura 40).

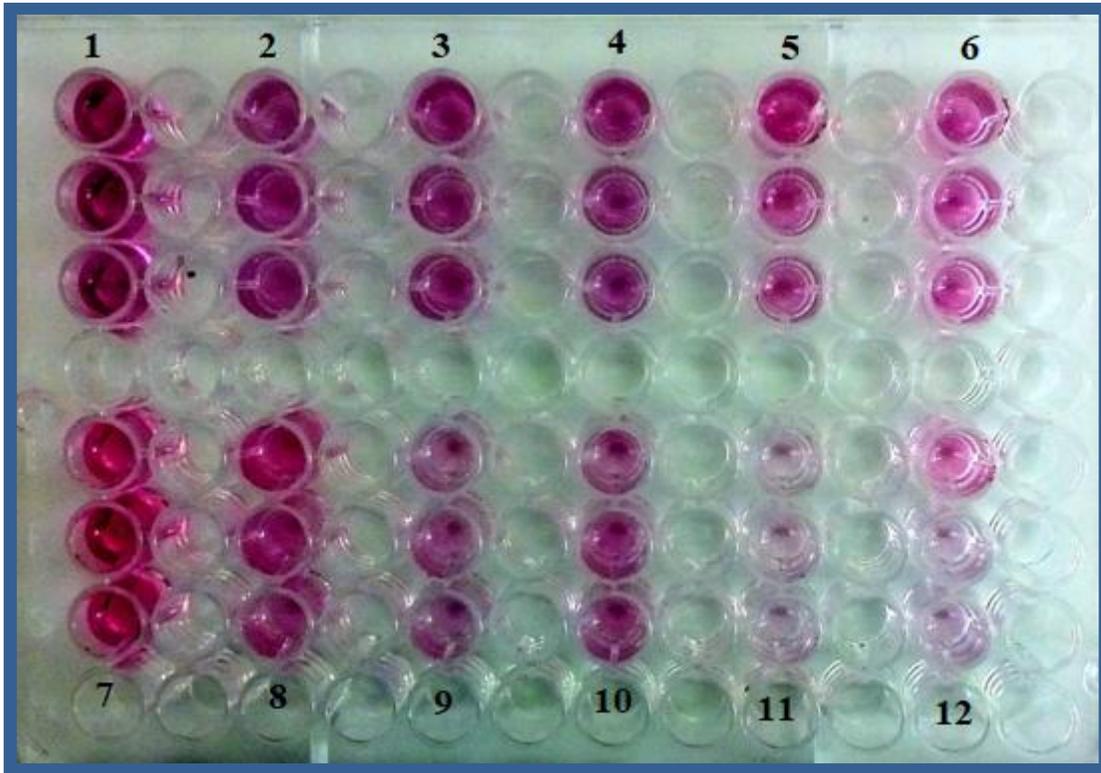


Figura 40. Formación de biopelícula de los aislados de *C.albicans* y *C.parapsilosis*. Donde 1= Control positivo (*C.tropicalis* 89LRC), 2-4= aislados de *C.albicans*, 5-6= aislado de *C.parapsilosis*, 7= aislado de *C.kefyr*, 8=aislado de *C.famata*, 9= aislado de *C.glabrata*, 10= aislado de *C.guilliermondii*, y 11-12= Controles negativos (YNBG).

Los resultados globales de las formaciones de biopelículas de las diferentes especies de *Candida* se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19. Formación de biopelícula de las diferentes especies de *Candida* aisladas de leches de cabras clínicamente sanas.

Especie de <i>Candida</i>	Formación de biopelícula.			
	No formadoras ≤0.120	Poco formadoras (0.121-0.240)	Medianamente formadora (.0241-0.480)	Fuertemente formadoras (≥0.481)
<i>C.kefyr</i> (n=79)	21	50	7	1
<i>C.guilliermondii</i> (n=73)	21	44	8	-
<i>C.famata</i> (n=52)	18	26	6	2
<i>C.glabrata</i> (n=13)	2	10	1	-
<i>C.albicans</i> (n=3)	-	3	-	-
<i>C.parapsilosis</i> (n=1)	1	-	-	-
Total	63	133	22	3

6. Discusión

La información con relación a la microbiota levaduriforme en leche de cabra es escasa. Los reportes al respecto, se basan en estudios en la leche de bovinos sanos y con mastitis.

En el presente estudio se identificaron diferentes especies del género *Candida* a partir de la leche de cabras clínicamente sanas, se identificaron en mayor proporción a *C.kefyr* con un 35.7% (79/221), seguida de *C.guilliermondii* con un 33% (73/221), *C.famata* con un 23.5% (52/221), *C.glabrata* con un 5.9% (13/221), *C.albicans* con un 1.4% (3/221) y *C.parapsilosis* con un 0.5% (1/221).

La presencia en mayor cantidad de aislados de *C. kefyr* obtenidos en el presente estudio, concuerdan con los trabajos de Ksouri y col en Algeria y Langnead y col, en Bélgica. Ksouri y col, reportaron como género levaduriforme predominante a *Candida*, en particular a *C.kefyr*, *C.guilliermondii* y *C.famata*, en la leche de bovinos sanos y con mastitis. En los aislados micológicos de su estudio, comprobaron la presencia de *C.kefyr* en mayor proporción tanto en animales sanos (25%) como en casos de mastitis (22.72%) [50].

Por su parte Langnead y col reportaron resultados similares, encontrando a *C.kefyr* en un 18.86% (20/106) en animales sanos y en un 22.5% (18/80) en animales con mastitis, [7].

En Polonia, Krukowski y col, reportan a *C.kefyr* en un 24.1 % (14/58) en casos de mastitis en ganado bovino lechero [9].

Es posible que el aislamiento en mayor proporción de *C.kefyr* en la leche de bovinos sanos y con mastitis, y a lo encontrado en el presente estudio en la leche de cabras clínicamente sanas, se deba a que esta levadura asimila la lactosa, azúcar que se encuentra en mayor proporción en la leche [3].

Otro estudio en leche de bovinos sanos y con mastitis, realizado en México, Segundo y col, también reportan al género *Candida* como predominante, sin embargo difieren con los otros autores con relación a las especies aisladas, ya

que ellos reportan en bovinos sanos en mayor proporción a *C. glabrata* y en bovinos con mastitis a *C. krusei* [11].

Por lo que se refiere a la identificación de los aislados del género *Candida* a partir de la leche de cabras, se confirmó la identificación preliminar basada en sus características morfológicas y bioquímicas, con la utilización de un medio diferencial como el agar Biggy y un medio cromogénico como el CHROMagar *Candida* [52 y 58].

De acuerdo a los resultados obtenidos, la identificación preliminar de los aislados identificados como *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. kefyri*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* fue confirmada con el CHROMagar *Candida* y el agar Biggy. En el caso de los aislados identificados como *C. tropicalis*, y posterior a su desarrollo en CHROMagar *Candida* y agar Biggy fueron reclasificados como *C. kefyri* y *C. albicans* respectivamente.

Con relación a la reclasificación de los aislados de *C. tropicalis* a *C. kefyri*, es conveniente mencionar que la morfología de ambas levaduras es muy parecida, ya que se observan de forma elíptica a cilíndrica y los cultivos en SDA adicionado con cloranfenicol forman pseudohifas, sus colonias adquieren una tonalidad de blanca a beige de consistencia cremosa durante las primeras 48 h de desarrollo. En cuanto a su metabolismo, *C. tropicalis* y *C. kefyri* presentan un patrón muy semejante en la asimilación de carbohidratos [13 y 39]. Es factible que estas similitudes hayan propiciado una identificación preliminar errónea, lo cual confirma la necesidad de utilizar diversas pruebas cuando se requiere de una identificación certera de géneros y especies levaduriformes.

Por lo anterior, la utilidad del CHROMagar *Candida* y el agar Biggy se puso de manifiesto, al permitir la diferenciación entre *C. tropicalis* y *C. kefyri* [54].

Yücesoy y col, en el 2003, realizaron un estudio de diferentes especies del género *Candida* en CHROMagar *Candida* y agar Biggy reportando que el CHROMagar *Candida* permitió la identificación al 100% de cepas de *C. albicans*, mientras que el agar Biggy solo el 75.2%. En el caso de *C. tropicalis* 98% en CHROMagar

Candida y 95.4% en Biggy, mientras que para *C. glabrata* 98% en CHROMagar *Candida*, y no adecuada en Biggy, debido a que las colonias de esta especie se observan en tonos café claros. Con relación a *C.krusei* fue de 98.2% en CHROMagar *Candida* y en Biggy [53].

En 2010 Ozan y col, evaluaron diferentes medios cromogénicos, incluido el CHROMagar *Candida*, y determinaron su utilidad para la correcta identificación de *C.albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C.tropicalis*, *C.famata*, *C.kefyr* y *C.guilliermondii* [59], lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que el CHROMagar *Candida* permitió confirmar la identificación de *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

En 2014 Daef y col, evaluaron ambos medios complementando la identificación por PCR, reportando que el CHROMagar *Candida* permitió la identificación del 100% de aislados de *C.glabrata*, 98.5% de *C.tropicalis*, 98.3% de *C.parapsilosis* y 97.4% de *C.albicans*, mientras que el agar Biggy identificó el 86.4% de *C.glabrata*, 79.7% de *C.tropicalis* y el 71.9% de *C. albicans*. Por lo que se refiere a *C.parapsilosis* no presentan datos en este medio [55].

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que algunas especies del género *Candida* pueden encontrarse como parte de la microbiota normal de la leche de rumiantes clínicamente sanos. Sin embargo, estas especies pueden actuar como patógenos oportunistas, siempre y cuando se conjunten los factores predisponentes inherentes al huésped y que las levaduras cuenten con las herramientas necesarias para colonizar e invadir los tejidos del mismo, como es el caso de la actividad enzimática que presenten y que puede funcionar como factor de virulencia, así como la capacidad de formar biopelícula.

En el estudio se realizó la evaluación de la actividad enzimática de proteasas, fosfolipasas y hemolisinas a los 221 aislados de las diferentes especies del género *Candida*.

Para el caso de las proteasas, el 74.2% (164/221) de los aislados tuvieron una alta producción, el 18.1% (40/221) una actividad media, el 2.7% (6/221) una actividad

baja y el 5% (11/221) no presentaron actividad enzimática de proteasas. Lo anterior, concuerda con lo reportado por diversos autores quienes mencionan al género *Candida* como un alto productor de proteasas [17,19, 20, 55 y 57]. Por ejemplo, Gokce y col, [45], reporta a *C.albicans* con la mayor producción de esta enzima, sin descartar a las otras especies del género. Da Costa y col, reportan en su estudio a *C.albicans* como alta productora en un 65% (41/63) y 35% (22/63) medianamente productoras [19].

En el estudio, las especies con alta actividad enzimática de proteasas fueron el 100% de los aislados de *C.albicans* y *C.parapsilosis*, el 82.19%, *C.guilliermondii*, el 80.76% de *C.famata*, el 69.23% *C.glabrata* y el 62.02% *C.kefyr*. Lo que concuerda con los estudios mencionados, teniendo a *C.albicans* con una alta actividad de esta enzima.

Para el caso de la producción de fosfolipasas, en este estudio solo los aislados de *C. albicans* presentaron actividad, lo cual coincide con lo reportado por Shirkhani S. y col, quienes encuentran a *C.albicans* como la principal especie del género *Candida* productora de fosfolipasas, seguida de *C.famata*, *C.tropicalis* y *C.krusei* [56].

Por su parte, Gokce y col, en 2007 reportaron que de 68 aislados de *C.albicans* solo 41 (60.3%) presentaron actividad de fosfolipasas, mientras que las otras especies del género no presentaron actividad de esta enzima, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio [45].

Por lo que se refiere a las hemolisinas, diversos estudios reportan la presencia de la actividad hemolítica y el tipo de hemólisis: alfa y beta [28, 30, 46 y 57].

En el 2001 Lou y col., reportaron que los aislados de *C.albicans*, *C.dublinsiensis*, *C.kefyr*, *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, y *C.lusitaniae*, presentaron hemólisis tipo alfa a las 24 h y tipo beta a las 48h, mientras que en *C.famata*, *C.guilliermondii*, *C.utilis* solo se observó hemólisis tipo alfa [28].

En 2011 Yigit Nimet y col reportaron a *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei* y *C.kefyr* con actividad hemolítica tipo beta, y *C.kefyr* presento menor actividad hemolítica que las otras especies. Para el caso de *C.parapsilosis* no existió actividad de esta enzima, los ensayos fueron leídos a las 48 h de incubación [46].

En 2015 Melo y col, reportan que de 50 aislados, el 90% (45/50) de los aislados de *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* y *C.krusei*, así como el 74% de los aislados de *C.tropicalis* presentaron una actividad hemolítica media tipo beta [30 y 57].

En 2017 Fatahinia y col., informan a *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei* y *C.parapsilosis* como productoras de hemolisinas, con hemólisis alfa y beta a las 24 y 48 h [30].

Los resultados de este estudio fueron similares a los autores antes mencionados, ya que los aislados de *C.albicans*, *C.famata*, *C.guilliermondii*, *C.kefyr* y *C.parapsilosis* presentaron actividad enzimática media y baja de hemolisinas. A diferencia de lo publicado, en este estudio los aislados de *C.glabrata* no presentaron actividad hemolítica. Con respecto al tipo de hemólisis, a las 24 h los aislados del presente estudio no presentaron ningún tipo de hemólisis, la cual fue visible a las 48 h y fue de tipo beta. En el caso de los aislados de *C. glabrata* no presentaron actividad hemolítica.

Por lo que se refiere a las biopelículas del género *Candida*, se han evaluado principalmente en aislados de casos clínicos en humanos, diversos autores mencionan a *C.albicans* como la especie que con mayor frecuencia produce biopelículas, seguida de *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* y *C.glabrata* [26, 33, 35, 36 y 45].

En el 2007, Gokce y col, reportaron la formación de biopelícula en el 11.8% de aislados *C.albicans* y en un 41.93% para *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.guilliermondii* y *C.krusei* [45].

Mientras que en 2011 Yigit y col, reportaron la formación de biopelículas en el 88.2% de aislados de *C. albicans*, en el 60% de *C. glabrata*, 57.1% de *C. kefyr*, 44.4% de *C. krusei* y en el 40% de *C. parapsilosis*. [46].

Lo anterior concuerda con los resultados del trabajo, ya que de los aislados estudiados, el 100% de *C. albicans* formaron biopelícula, seguida de un 84.61% de *C. glabrata*, 73.41% de *C. kefyr*, 71.23% de *C. guilliermondii* y 65.38%, *C. famata*.

La importación de la generación de esta información nos hace inferir que aquellas especies con presencia de actividad enzimática tanto de proteasas, fosfolipasas como hemolisinas, además de formación de biopelícula considerados factores de virulencia, y comparando con la literatura, que estas especies del género *Candida* como *C. albicans*, *C. guilliermondii* y *C. famata*, son potencialmente patógenas si se les otorga el medio o condiciones en el huésped para provocar la enfermedad.

La relevancia del estudio, es que con los resultados obtenidos, en primer lugar permite conocer parte de la microbiota normal levaduriforme en la leche de cabra, y en segundo lugar la actividad enzimática y formación de biopelículas de las diferentes especies del género *Candida* aisladas, las cuales bajo factores predisponentes en los animales pueden actuar como patógenos oportunistas y causar daño en la glándula mamaria, reflejado en casos de mastitis subclínica y/o clínica. Lo anterior, permitirá tener en consideración que las levaduras también pueden causar daño en los animales y no solo las bacterias, así como prevenir procesos infecciosos en los animales, teniendo un adecuado manejo y tratamiento en caso necesario, y de esa forma mantener la cantidad y calidad de la leche de cabra, y por consiguiente, disminuir las pérdidas económicas en las pequeñas y grandes producciones, además de salvaguardar la salud animal.

7. Conclusiones

1. En la leche de cabras clínicamente sanas la especie del género *Candida* predominante fue *C.kefyr*, seguida de *C.guilliermondii* y *C.famata*.
2. El CHROMagar *Candida* logró identificar al 100% de los aislados *C.guilliermondii*, *C.famata*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* y *C.kefyr*.
3. El agar Biggy logró identificar el 79.92% de los aislados de *C.guilliermondii*, *C.famata*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* y *C.kefyr*.
4. La especie del género *Candida* con un mayor potencial de virulencia, fue *C.albicans* presentando los tres tipos de actividad enzimática y formación de biopelícula, seguida de *C. kefyr*, *C. guilliermondii* y *C. famata*.
5. La actividad enzimática de proteasas fue alta en los aislados de *C.kefyr*, *C.guilliermondii*, *C.famata*, *C.glabrata*, *C. albicans* y *C. parapsilosis*.
6. La actividad enzimática de fosfolipasas solo se observó en los aislados de *C. albicans*.
7. La actividad de las hemolisinas fue baja y media para *C.kefyr*, *C.guilliermondii*, *C.famata*, y *C.albicans*.
8. La formación de biopelículas se observó en los aislados de *C. kefyr*, *C.guilliermondii*, *C. famata*, *C.glabrata*, *C. albicans*.

8. Anexos.

1. Medios de cultivo.

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

La utilización de este caldo es para el cultivo y aislamiento de hongos filamentosos y levaduriformes, donde la dextrosa es la fuente de energía para el crecimiento del microorganismo. La peptona y el extracto de levadura proporcionan factores de crecimiento y la fuente necesaria de nitrógeno [38].

Componentes.

Reactivo	Cantidad
Dextrosa	2.0 %
Extracto de levadura	1.0 %
Peptona	2.0 %

Modo de preparación.

En 100 ml de agua destilada se coloca 1g de extracto de levadura, 2g de peptona y 2g de dextrosa. El medio es esterilizado en autoclave por 20 minutos a 15 lb., a 121°C.

1.2. Agar Dextrosa Sabouraud (SDA).

La utilización de este medio es recomendada para el cultivo de hongos filamentosos y levaduriformes. La concentración elevada de glucosa y el pH ácido favorecen el crecimiento de los hongos. Esta capacidad selectiva puede ser reforzada adicionando antibióticos como el cloranfenicol [13].

Componentes.

Reactivo	Cantidad
Dextrosa	40.0 g
Mezcla de peptona	10.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g

pH final 5.6 +/- 0.2

Modo de preparación.

Suspender 65 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta completar la disolución del polvo y llevar a punto de ebullición por 1 minuto. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C con 15 libras de presión. Enfriar a una temperatura entre los 45-50°C y servir en placas de Petri estériles (preparación bajo indicaciones del fabricante MCD-LAB).

1.3. CHROMagar *Candida*.

El CHROMagar *Candida* es un medio selectivo cromogénico que permite la identificación presuntiva de *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei* y *C.glabrata* [57].

Composición.

Reactivo	Cantidad
Agar	15.0 g
Peptona	3.0 g
Dextrosa	10.2 g
Mezcla cromogénica	22.0 g
Cloranfenicol	0.5 g

Modo de preparación.

Se disuelven 40 g del medio en un litro de agua destilada, se calienta de 90 a 100 °C con agitación constante hasta el primer hervor, esto para que conseguir la disolución del medio. Se sirve en placas de Petri estériles y se recomienda su utilización no más de 15 días de su preparación.

1.4. Agar Biggy.

El agar de Glicina, Glucosa, Levadura y sulfito de Bismuto es útil para el aislamiento y la identificación de las diferentes especies del género *Candida* debido a una reacción de sulfuro. Se reduce la sal de bismuto a bismuto y el sulfito a sulfuro, estos se combinan, manifestándose en una precipitación negra o café que pigmenta las colonias y en ocasiones difunde al medio [40].

Componentes.

Reactivo	Cantidad
Citrato de amino y bismuto	5.0 g
Sulfito de sodio	3.0 g
Dextrosa	10.0 g
Glicina	10.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Agar bacteriológico	16.0 g

Modo de preparación.

Suspender 45 g del medio en 1 litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta la completa disolución y dejar al calor hasta el primer hervor (no más de 1 minuto). Servir en placas de Petri estériles.

1.5. Medio para Proteasas.

Este medio permite detectar la actividad de la enzima aspartil proteinasa que en presencia de la albumina sérica de bovina genera un halo de precipitación visible en el medio sólido [18].

Componentes para 200 ml de agua destilada.

Solución A

Reactivo	Cantidad
Agar bacteriológico	4.0 g
Agua destilada	180 ml

Modo de preparación.

Calentar con agitación suave hasta completar la disolución del polvo y llevar a punto de ebullición por 1 minuto. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C con 15 libras de presión.

Solución B

Reactivo	Cantidad
Albumina sérica de bovino	0.4 g
Dextrosa	4.0 g
Extracto de levadura	0.02 g
Agua destilada	20 ml

Modo de preparación.

Mezclar todos los ingredientes evitando hacer burbujas y esterilizar por filtración.

La solución A debe dejarse enfriar hasta los 45 a 40°C para incorporar la solución B, evitando la formación de burbujas. El medio se sirve en cajas Petri estériles.

1.6. Medio para fosfolipasas.

En este medio se detecta la actividad de las fosfolipasas al utilizar los fosfolipidos presentes en la yema de huevo, observándose una precipitación con un halo amarillo [22,23].

Componentes para 200ml.

Reactivo	Cantidad
Agar dextrosa Sabouraud	13.0 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	11.68 g
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	0.146 g
Agua destilada	200.0 ml

Modo de preparación.

Calentar con agitación suave hasta la completar la disolución de los polvos y llevar a punto de ebullición por 1 minuto. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C con 15 libras de presión.

Dejar enfriar el medio de 40-45°C y adicionar 4 ml de Yema de huevo por cada 100 ml de medio. Servir en cajas Petri en condiciones de esterilidad.

1.7. Medio para Hemolisinas.

Este medio permite detectar las hemolisinas de las levaduras y puede ser preparado, al 7% con sangre de conejo, humano, bovino, caprino u ovino. La acción de las hemolisinas se observa por la ruptura de los eritrocitos visualizando con una hemolisis alfa o beta, el tipo de hemolisis observada dependerá del microorganismo de prueba [27,28].

Componentes para 100ml.

Reactivo	Cantidad
Agar dextrosa Sabouraud	6.5 g
Agua destilada	100.0 ml

Modo de preparación.

Calentar con agitación suave hasta completar la disolución del polvo y llevar a punto de ebullición por 1 minuto. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C con 15 libras de presión.

Enfriar de 40-45°C y agregar 7 ml de sangre desfibrinada de borrego en condiciones de esterilidad para evitar contaminación. Se sirve el medio bajo condiciones de esterilidad y flameando el matraz entre caja y caja de Petri.

1.8. Medio Yeast Nitrogen Base (YNB) suplementado con glucosa al 8%.

La base nitrogenada de levadura es un medio que contiene una mezcla bien definida de aminoácidos, vitaminas, micronutrientes y sales, que aportan lo necesario para el crecimiento de las levaduras, exceptuando la fuente de carbono [52].

Composición para 100ml en una solución 10x.

Reactivo	Cantidad
Sulfato de amonio	5.0 g
Fosfato monopotásico	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Cloruro de Sodio	0.1 g
Cloruro de Calcio	0.1 g
Monocloruro de Histidina	20.0 mg
Metionina	20.0 mg
Triptofano	20.0 mg
Inositol	2000.0 µg
Ácido Bórico	500.0 µg
Niacina	400.0 µg
Sulfato de magnesio	400.0 µg
Hidrocloreuro de piridoxina	400.0 µg
Sulfato de Zinc	400.0 µg
Hidrocloreuro de Tiamina	400.0 µg
Pantotenato de Calcio	400.0 µg
Cloruro de Hierro	200.0 µg
Molibdato de Sodio	200.0 µg
Riboflavina	200.0 µg
Acido Paraminobenzoico	200.0 µg
Yoduro de Potasio	100.0 µg

Sulfato de Cobre	40.0 µg
Ácido Fólico	2.0 µg
Biotina	2.0 µg
Dextrosa	8.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Modo de preparación.

Se pesan 6.7 g del medio en 100 ml de agua destilada en una solución 10X, de preferencia debe ser agua destilada estéril, se agrega la dextrosa y se homogeniza la muestra. La solución se esteriliza por filtración y si se requiere se puede alicuotar bajo completa esterilidad.

1.9. Producción de tubo germinal.

Cuando son incubadas levaduras individuales de *C.albicans* en suero de humano, caballo, conejo o cordero, producen un filamento hifal corto lateral que da origen al tubo germinativo en un tiempo de 2 a 4 horas, que no producen otras especies del género *Candida*, siendo esta una de las pruebas rápidas de diferenciación de especies de este género [60].

Procedimiento:

- En un tubo con 0.5 ml a 1 ml de suero de caballo (suero de humano, bovino, cordero, conejo), adicionar una asada del cultivo de 24h e incubar dos horas a 37°C.
- En un portaobjetos limpio colocar una gota de esta suspensión y cubrir con un cubreobjetos.
- Realizar la observación al microscopio utilizando el objetivo seco fuerte (40X).

NOTA: Todos los medios requieren de esterilidad, que consiste dejarlos 24h a 37°C.

2. Tinciones.

2.1. Tinción de Gram

Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas. Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. Para el caso de levaduras y debido a la composición de su celular que contiene una alta cantidad de carbohidratos y proteínas (mananas y glucanas) tienen una reacción tintorial de Gram positivas [38].

Componentes.

Solución de Cristal violeta.

Solución A

Reactivo	Cantidad
Cristal violeta	2.0 g
Alcohol etílico	30.0 ml

Solución B

Reactivo	Cantidad
Oxalato de Amonio	0.8 g
Agua destilada	20.0 ml

Modo de preparación.

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

Solución de Lugol.

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

Decolorante.

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

Contraste Solución de Safranina.

Reactivo	Cantidad
Safranina	0.20 g
Agua destilada	200.0 ml

2.2. Safranina al 1%

Componentes para 100 ml.

Reactivo	Cantidad
Colorante de Safranina en polvo	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Modo de preparación.

Se mezclan ambos ingredientes hasta tener una solución. Si es necesario se puede filtrar para retirar los grumos y así tener una mezcla homogénea.

3. Soluciones.

3.2. Solución Salina Fisiológica (SSF).

Componentes.

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	8.5 g
Agua destilada	1000.0 ml

Modo de preparación.

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

3.3. Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

Componentes para 500 ml.

Solución A:

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	8.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Modo de preparación.

Incorporar ambos ingredientes hasta tener una mezcla homogénea.

Solución B de Sörensen.

Reactivo	Cantidad
Fosfato di-potásico K_2HPO_4	1.21 g
Fosfato monopotásico KH_2PO_4	0.34 g
Agua destilada	1000.00 ml

Modo de preparación.

Incorporar todos los ingredientes hasta tener una mezcla homogénea.

Para preparar 500 ml de PBS, se toman 460 ml de la solución A y 40 ml de la solución B, a un pH entre 7.2 a 7.4, si se requiere se puede esterilizar por autoclave durante 15 minutos a 121°C con 15 libras de presión [49].

9. Referencias.

1. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Índice de Volumen Físico del sector agropecuario SIAP. Índice de Volumen Físico Pecuario Nacional - Producto 21017. [En línea] [Fecha de Consulta 31/10/2017]: Disponibles en: <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>
2. CELIS MAURICIO, JUÁREZ DANIEL. Seminario de Procesos Fundamentales Físico-Químicos y Microbiológicos Especialización y Maestría en Medio Ambiente. Laboratorio de Química F.R. Bahía Blanca. Manual de laboratorio. 2009.
3. YOLDI BIENZOBAS, G.; MUÑOZ HORNILLOS, M. "Leche y derivados". En Alimentos: composición y propiedades. (MARTÍNEZ, J.A.; ASTIASARÁN, I. Eds.). Pamplona. Ed. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. EUROGRAF, 1999. p. 84
4. GLEE PM, CUTLER JE, BENSON EE, BARGATZE RF, HAZEN KC. Inhibition of hydrophobic protein-mediated *Candida albicans* attachment to endothelial cells during physiologic shear flow. Infect Immun.2001; 69:2815-2820.
5. OKAWA Y, MIYAUCHI M, KOBAYSHI H. Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. Biol Pharm Bull. 2008; 31: 1507-1510.
6. COSTA EO, GANDRA CR, PIRES MF, COUTINHO SD, CASTILLO W, TEIXEIRA CM. Survey of bovine mycotic in dairy herds in the State of Sao Paulo, Brazil. Mycopathology 1993; 124: 7-13.
7. LAGNEAU PE, LEBTANI K SWINNE D. Isolation of yeast from bovine milk in Belgium. Mycopathology 1996; 135 (2): 99-102.
8. TOMOHITO HAYASHI, TAKASHI SUGITA, EIJI HATA, KEN KATSUDA, ENSHI ZHANG, YOSHIO KIKU, *et al.* Molecular-Based Identification of Yeasts Isolated from Bovine Clinical Mastitis in Japan. Journal of Veterinary Medical Science 2012; 75(3): 387–390.

9. KRUKOWSKI HENRYK, TIETZE MARIA, TADEUSZ MAJEWSKI & PAWEŁ RÓŻAŃSKI. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathologia* 2000; 150: 5–7.
10. SPANAMBERG ANDRÉIA, WÜNDER JR ELSIO AUGUSTO, BRAYER PEREIRA DANIELA ISABEL, ARGENTA JULIANA, CAVALLINI SANCHES EDNA MARIA, LAERTE FERREIRO PATRÍCIA VALENTE. Diversity of yeasts from bovine mastitis in Southern Brazil. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 154-156.
11. SEGUNDO ZARAGOZA CAROLINA, CERVANTES OLIVARES ROBERTO ARNULFO, DUCOING WATTYB ANDRÉS ERNESTO, DE LA PEÑA MOCTEZUMA ALEJANDRO, VILLA TANACA LOURDES. Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Rev Iberoam Micol*. 2011; 28 (2):79–82.
12. URIBARREN BERRUETA TERESA. Generalidades de Micología. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. [En Línea] [Fecha de Consulta 04/08/2017]: Disponibles en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/generalidades.html>.
13. ARENAS GUZMÁN ROBERTO. *Micología Medica Ilustrada*. 5ta edición. Mc Graw Hill Education. 2014: pág. 241.
14. CASTAÑÓN OLIVARES LAURA ROSIO. CANDIDIASIS. Unidad de Micología. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, [En línea] [Fecha de Consulta 04/08/2017]: Disponibles en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
15. SÁNCHEZ HERNÁNDEZ EDGAR AUGUSTO. Diagnóstico y Candidemias en Neonatos. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas Carrera de Bacteriología Bogotá, Colombia, 2009 (Tesis doctoral). [En línea] [Fecha de Consulta 04/08/2017]: Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis332.pdf>

16. BIASOLI MARISA. CANDIDIASIS. Centro de Referencia de Micología. 2013. [En línea] [Fecha de consulta 09/07/2017]: Disponible en: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIALES_2013/TEORICOS_2013/CANDIDIASIS_2013-1.
17. BORST A, FLUIT AC. High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. J. Med Microbiol. 2003; 52: 971-974
18. SENEVIRATNE CJ, WONG SS, YUEN KY, MEURMAN JH, PÄRNÄNEN P, VAARA M, SAMARANAYAKE LP. Antifungal susceptibility and virulence attributes of bloodstream isolates of *Candida* from Hong Kong and Finland. Mycopathologia. 2011; 389-395.
19. DA COSTA KR, FERREIRA JC, KOMESU MC, CANDIDO RC. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. Mycopathologia. 2009; 167: 73-79.
20. KUMAMOTO CA, VINCES MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. Annu Rev. Microbiol. 2005; 59:113-133.
21. BUTLER G, RASMUSSEN MD, LIN MF, SANTOS MA, SAKTHIKUMAR S, MUNRO C, RHEINBAY E, GRABHERR M, FORCHE A, REEDY JL, AGRAFIOTI I, ARNAUD MB, BATES S, BROWN AJ, BRUNKE S, COSTANZO MC, FITZPATRICK DA, DE GROOT PW, HARRIS D, HOYER LL, HUBE B. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. Nature. 2009; 459: 657- 662.
22. TROFA, D., A. GACSER, AND J.D. NOSANCHUK. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008; 21: 606-25.
23. BIRINCI A, CIHAN CC, BILGIN K, ACUNER C, DURUPINAR B. Phospholipase activity of *Candida* species isolated from different clinical samples. Microbiol Bul. 2005; 39: 205-209.
24. SACRISTAN B, BLANCO MT, GALÁN-LADERO MA, BLANCO J, PÉREZ-GIRALDO C, GÓMEZ-GAARCÍA AC. Aspartyl proteinase, phospholipase,

- hemolytic activities and biofilm production of *Candida albicans* isolated from bronchial aspirates of ICU patients. *Med Mycol.* 2011; 49: 94-97.
25. IVANOSKA N. Phospholipases as a factor of pathogenicity in microorganisms. *J Mol Catal B Enzym.* 2003; 22: 357-361.
 26. KUHN DM CHANDRA, J, MUKHERJEE PK, GHANNOUM MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Inf Immun*, 2002, vol. 70 (pg. 878-888). [Fecha de consulta 20/09/2017] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127692/>
 27. KNIGHT SA, VILAIRE G, LESUISSE E, DANCIS A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infect Immun.* 2005; 73: 5482-5492.
 28. RODNEI DENNIS ROSSONI, JÚNIA OLIVEIRA BARBOSA, SIMONE FURGERI GODINHO, VILELA ANTONIO OLAVO. Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-albicans *Candida* species. Universidad de Estambul Paulista. Brazil. 2013
 29. GANG LUO, LAKSHMAN P. SAMARANAYAKE, JOYCE Y.Y. YAU. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. PubMed Central (PMC). [En línea]. [Fecha de consulta 21/09/2017]: Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88272/>
 30. FATAHINIA, M. HALVAEEZADEH M, REZAEI-MATEHKOLAEI A. Comparison of enzymatic activities in different *Candida* species isolated from women with vulvovaginitis. [En línea]. [Fecha de consulta 23/09/2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28236530>.
 31. DONLAN RM, COSTERTON JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15:167-193.
 32. CASTRILLON RLE, PALMA RA, PADILLA DC. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatología Rev. Mex.* 2010; 54:14-24.
 33. RAMAGE G, VADEWALLE K, WICKES LB, LÓPEZ-RIBOT J. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 2001; 18: 163-170.

34. CASTRILLÓN RIVERA LAURA ESTELA, PALMA RAMOS ALEJANDRO, PADILLA DESGARENNES CARMEN. Factores de Virulencia en *Candida spp.* Dermatología Rev, Mex 2005; 49:12-27.
35. FLEMMING HC, WINGENDER J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. 2010; 8:623-633.
36. DEL POZO JOSE LUIS, CANTON EMILIA. Candidiasis asociada a biopelículas. Rev Iberoam Micol. 2016; 33(3): 176-183.
37. KUHN, D.M., et al., Antifungal susceptibility of *Candida* biofilm: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 2002; 46:1773-1780.
38. LAZO GARCÍA ELVIA, VALDES VAZQUEZ LILIANA M., YELA MIRANDA IRASEMA J., SEGUNDO ZARAGOZA CAROLINA, MENA BAÑUELOS RODRIGO, ALFONSECA SILVA EDGAR, et al. Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinarias. México. 2014: 28-29.
39. SEGUNDO ZARAGOZA. Manual teórico-práctico de micología médica para la carrera de Q.F.B. (prácticas y alternativas). Tesis de licenciatura. FES-Cuautitlán. UNAM. 1991.
40. Ficha técnica. Agar Biggy. MCD LAB. www.mcdlab.ne/fichas%20Tecnicas/Agar%20%Biggy.pdf.
41. RUIZ ARAGON JESÚN, GARCIA MARTOS PEDRO, PUEERTO JOSÉ LUIS, MARIN PILAR, SALDARREAGA ABEL, MOYA PATRICIA. Evaluación de un nuevo medio CHROMagar *Candida* para la identificación presuntiva de levaduras. Rev Diagn Biol vol.52 N°1 2003.
42. RORIG KCO, COLACITE J. ABEGG MA. Production of virulence factors *in vitro* by pathogenic species of the genus *Candida*. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42:225-7.
43. WILLIAMSON MI, SAMARANAYAKE LP, MACFARLANE TW. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. J Med Vet Mycol. 1986; 24: 415-417
44. CANTÓN LACASA EMILIA, MARTÍN MAZUELOS ESTRELLA, ESPINEL-INGROFF ANA. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la

sensibilidad a los antifúngicos. [En línea]. [Consultado el 22 de septiembre de 2017]. Disponible en:

<http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>

45. STEPANOVIÉ S, VUKOVIÉ D, DAKIÉ I, SAVIÉ B, SVABIÉ M. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. J Microbiol Methods, 2000; 40: 175-9.
46. GOKCE GULCE, CERIKCIOGLU NILGUN, YAGCI AYSEGUL. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolates from blood cultures. Mycopathologia, Estambul, 2007; 164:265-269.
47. YIGIT, AKTAS E, DAGISTAN S, AYYILDIZ A. Investigating biofilm production, coagulase and hemolytic activity in *Candida* species isolated from denture stomatitis patients. Eurasian J Med, 2011; 43: 27-32.
48. FERNÁNDEZ RIVERO MARCELO ERNESTO. Estudio de la formación de la biopelícula de *Candida* spp. y evaluación de nuevas combinaciones farmacológicas. Pamplona 2017. [Tesis Doctoral]; 82: 79-85.
49. GOMEZ JAVIER *et al.* ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferencial en la patogenia de bacilos gramnegativos?,. Rev. Esp Quimioter 2013; 26 (2): 97-102.
50. KSOURI SAMIR, DJEBIR SOMIA, HADEF YOUCEF, BENAKHLA AHMED. Survey of Bovine Mycotic Mastitis in Different Mammary Gland Statuses in Two North-Eastern Regions of Algeria. Mycopathologia 2015; 179: 327-331.
51. DAEF ENAS, MOHARRAM AHMED, SEIF ELDIN SALWA, ELSHERBIY NAHLA, MOHAMMED MONA. Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. Brazilian Journal of Microbiology. 2014: 45(1): 255-262.
52. RUIZ A, RUIZ ARAGON A, GARCIA MARTOS J, PUERTO J, MARIN P, SALDARREAGA A, MOYA P. Evaluación de un nuevo medio CHROMagar *Candida* para la identificación presuntiva de levaduras. Rev Diagn Biol 2003; 2:26-29.

53. GALÁN LADERO MARÍA DE LOS ÁNGELES. Factores de Patogenicidad en *Candida tropicalis*. Universidad de Extremadura, España. [TESIS DOCTORAL] 2014.
54. OZCAN KADRI, ILKIT MACIT, ATEŞ AYLIN, TURAC-BICER AYGUL, DEMIRHINDI HAKAN. Performance of Chromogenic *Candida* Agar and CHROMagar *Candida* in recovery and presumptive identification of monofungal and polyfungal vaginal isolates. *Medical Mycology*. 2010; 48: 29-34.
55. DAEF ENAS, MOHARRAM AHMED, SEIF ELDIN SALWA, ELSHERBIY NAHLA, MOHAMMED MONA. Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014;45(1): 255-262.
56. SHIRKAHANI S., SEPAHVAND A., MIRZAEI M., ANBARI K. Phospholipase and proteinase activities of *Candida spp.* Isolates from vulvovaginitis in Iran. *Journal de Mycologie Médicale*. 2016; 26: 255-260.
57. BEZERRA DE MELO RICETO ÉRIKA, MENEZEZ RALCIANE DE PAULA, AMANTE PENATTI MÁRIO PAULO, DOS SANTOS PEDROSO REGINALDO. Enzymatic and hemolytic in different *Candida* species. *Rev Iberoam Micol*. 2015; 32 (2): 79-82.
58. MARTÍNEZ E, ESLAVA GARCÍA J, GAITAN CALVO M, LÓPEZ CARRASCO R, GÓMEZ PADILLA F, CABUTO LÓPEZ Z, MAYORGA J, ARENAS R. Candidiasis cutánea: utilidad de CHROMagar *Candida* en la identificación de especies. *Dermatología Rev Mex*. 2008; 52 (3): 121-6.
59. RUIZ A, RUIZ ARAGON A, GARCIA MARTOS J, PUERTO J, MARIN P, SALDARREAGA A, MOYA P. Evaluación de un nuevo medio CHROMagar *Candida* para la identificación presuntiva de levaduras. *Rev Diagn Biol*. 2003; 2:26-29.
60. SEGUNDO ZARAGOZA CAROLINA, CERVANTES OLIVARES ROBERTO A. Manual de técnica para el diagnóstico de micosis en Medicina Veterinaria. FMVZ-UNAM, Proyecto PAPIME PE2055111. 2013; pág. 22.