



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD
DE FORMACIÓN DE BIOPELICULAS DE *Candida*
glabrata AISLADAS A PARTIR DE LECHE DE
CABRAS CLINICAMENTE SANAS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:
GERARDO ALFREDO LOVERA NÚÑEZ

Asesor: Dra. Alma Núñez del Arco
Co-Asesor: Dr. Enrique Salas Téllez

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Con amor y respeto, te dedico mi tesis Mamá,

Por tu coraje, esfuerzo y dedicación que pones en nuestras vidas, ya que sin duda no tendría este trabajo... A mi hermano, por los momentos y moretones que durante la vida hemos compartido.

A mi familia:

Lucy, por ser mi mayor ejemplo y nunca dejar de creer en mí, a Jaime quien admiro, respeto y quiero como un padre, mis gordas Gerardo y Ulises, quienes con su inocencia y ocurrencia me hacen la vida más sencilla, a Cuca y el Bebelo, En memoria de: Gerardo y Mamá vieja, que a pesar de haberse adelantado, sé que están conmigo siempre.

A mis personas favoritas,

Alejandra, quien me enseñó a creer de nuevo con su amor, apoyo, paciencia y tolerancia, a Santiago por su ocurrencia me recuerda que aún es fácil sonreír.

Con respeto y admiración agradezco al:

Dr. Enrique Salas, por su tiempo y colaboración incondicional.

A mis compañeros de generación, en especial a:

Efrén y Néstor quienes me han brindaron lo más invaluable su "amistad".

A mis grandes amigos, los piratas, sin los cuales habría terminado esto hace unos 2 años:

Jesús, Rubén, quienes siempre recibo en mi casa con un par de cervezas y el corazón en la mano... y con especial cariño para Alejandro, con impresionante intelecto y a pesar de su incompetencia para utilizar la PC, me inspiraron a creer que yo podría escribir un libro.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la donación de la cepa de *C. albicans* ATCC 32354 utilizada para el presente trabajo, a la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras y al Dr. Erick Monroy Pérez de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Gracias a la Cátedra de Inmunodiagnóstico Microbiano de la UIM Laboratorio 17 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo - 4, por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

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

**"Son muchas las manos y
Los corazones que contribuyen
Al éxito de una persona"
Walt Disney**

GERARDO ALFREDO LOVERA NÚÑEZ

ÍNDICE

I.	Resumen.	2
II.	Abreviaturas.	3
III.	Índice de figuras.	4
IV.	Índice de gráficas.	5
1.	Introducción.	6
2.	Antecedentes.	8
2.1.	Generalidades de los hongos.	11
2.1.1.	Características generales de las levaduras.....	15
2.1.2.	Importancia de las levaduras en la industria alimentaria.	15
2.1.3.	La Mastitis y sus efectos en la producción lechera.	17
2.2.	Género <i>Candida</i>	19
2.2.1.	Especies de mayor importancia.	20
2.2.2.	Candidosis.	22
2.2.3.	Factores de virulencia.	24
2.2.4.	Formación de biopelículas.	28
2.2.5.	Métodos de estudio de biopelículas.	33
3.	Justificación.	37
4.	Hipótesis.	38
5.	Objetivos.	38
5.1.	Objetivo general.	38
5.2.	Objetivos particulares.	38
6.	Diagramas de trabajo.	39
7.	Material y métodos.	42
8.	Resultados.	45
9.	Discusión.	52
10.	Conclusiones.	55
11.	Perspectivas de trabajo.	56
12.	Bibliografía.	57
V.	ANEXOS.	60

I. RESUMEN

Las biopelículas son comunidades microbianas que constituyen la forma más exitosa de colonización entre los microorganismos, son consideradas un mecanismo de supervivencia, pueden estar adheridas a superficies de tipo inerte o bien adherirse a tejidos vivos. La formación de biopelículas de *Candida* tiene repercusiones en áreas productivas de leche de cabra, debido a que están relacionadas en generar diferentes presentaciones de mastitis, lo cual refleja grandes pérdidas económicas debido al decremento en la producción y calidad de la leche e incrementando los tratamientos con antibiótico.

El objetivo de este trabajo que fue empleando un ensayo colorimétrico se evaluara la actividad metabólica de *Candida glabrata*, es decir mediante su capacidad reductora se evaluara sobre una sal de tetrazólio conocida como "XTT", con la finalidad de determinar su capacidad de formación de biopelículas.

Analizando 57 muestras que fueron identificadas como *Candida glabrata*, aisladas a partir de muestras de leche de cabras clínicamente sanas, las cuales fueron proporcionadas por ordeñadores del departamento de caprinos de la FESC - C4. De las 57 muestras analizadas, se encontró que si fueron capaces de formar biopelículas aunque no con la misma capacidad, lo cual permitió generar una clasificación de acuerdo a dicha capacidad (baja, media y alta) de formación, siendo que de las 57 muestras analizadas, 5 Muestras no fueron capaces de formar biopelícula, representando el 9% de la población total, 52 muestras (91%) capaces de formación distribuida entre: 20 con baja formación o bien el 35% de la población, 20 con media formación, el equivalente al 35% y 12 con alta capacidad de formación, es decir, el 21% de la población en general estudiada, indicando así que tienen la capacidad de formar biopelículas, dicha capacidad demuestra estar asociada a su persistencia en estar presentes en glándulas mamarias y sistemas de ordeña, lo cual puede estar asociado con provocar cuadros clínicos.

II. ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius.
Abs	Absorbancia.
ATCC	Colección de Cultivos Tipo de E.U. (del inglés American Type Culture Collection).
C1	Corrida no. 1 y subsecuentes.
DO	Densidad Óptica.
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (del inglés Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).
EtOH	Etanol.
H	Horas.
L	Litro
Lb	Libras.
min.	Minutos.
mL	Mililitros.
PBS	Del inglés phosphate buffered saline.
SDA	Del inglés Agar Sabouraud Dextrose.
Seg.	Segundos.
UFC	Unidad Formadora de Colonia.
UIM	Unidad de Investigación Multidisciplinaria.
XTT	2, 3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2 H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salts.
YPD	Del inglés Yeas Peptone Dextrose.

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Título	Pág.
1	Estructura de un talo o micelio de mohos y levaduras.	12
2	Células fúngicas: Fragmento de hifa A y levadura B .	14
3	Características fisiológicas para la identificación de <i>Candida</i> .	22
4	Morfogénesis en <i>Candida</i> durante la infección.	25
5	Fases de formación de biopelículas y estrategias de dispersión, Revista Mexicana de Dermatología.	31
6	Diagrama general de experimentación para la determinación de biopelículas.	39
7	Diagrama de identificación microbiológica de muestras de leche.	40
8	Determinación en la formación de biopelículas, mediante la reducción metabólica del XTT.	41
9	Escala de formación de Biopelícula.	50

IV. INDICE DE GRAFICAS

Gráfico.	Título	Pág.
1	Densidad óptica (DO) de corrida No. 1 (C1) en la determinación de biopelículas a 24, 48 y 72 horas de incubación.	46
2	Densidad óptica (DO) de corrida No. 2 (C2) en la determinación de biopelículas a 24 y 48 horas de incubación.	47
3	Densidad óptica (DO) de corrida No. 3 (C3) en la determinación de biopelículas a 24 y 48 horas de incubación.	47
4	Densidad óptica (DO) de corrida No. 4 (C4) en la determinación de biopelículas a 24 y 48 horas de incubación.	48
5	Densidad óptica (DO) de corrida No. 5 (C5) en la determinación de biopelículas a 24 y 48 horas de incubación.	49
6	Distribución de muestras según su capacidad de formación de biopelicula a 24 horas de incubación.	51
7	Distribución de muestras según su capacidad de formación de biopelicula a 48 horas de incubación.	51

1. INTRODUCCIÓN

En general la humanidad ha considerado a los microorganismos, ya sean bacterias, hongos, levaduras, etc., como un modo sumamente complejo de entender, en cuanto al sentido estricto, por su complejidad estructural como organismos celulares, mientras que sus funciones básicas guardan una íntima relación metabólica y estructural en contacto con su entorno, es decir, su participación como la parte de ecosistema, que es organizado, estructurado y cualquier variación de cada uno de los elementos que lo componen juegan un papel en el equilibrio del mismo.

La Micología es la rama de la Microbiología que se desarrolló primero que la inmunología. Los aspectos clínicos de algunas micosis superficiales fueron descritos desde la época de Hipócrates (460 – 377 a.C.) quien fue el primero en documentar la Candidiasis con el nombre de “*afta alba*”, lo cual fue corroborado por el médico Galeno (130 – 200 d.C.). La importancia de los microorganismos en el desarrollo de enfermedades no fue inmediatamente obvia para la población, transcurrieron muchos años hasta que los científicos establecieron la conexión entre microorganismos y enfermedades. (Arenas, 2011; Prescott, 2004)

Aunque Fracastoro y otros investigadores habían sugerido que organismos invisibles ocasionaban las enfermedades, la mayoría pensaba que éstas se debían a causas como fuerzas sobrenaturales, vapores venenosos denominados miasmas, o bien al desequilibrio entre los cuatro humores que se creía formaban parte del cuerpo humano. La idea según el desequilibrio entre los cuatro humores (sangre, flema, bilis amarilla [cólera] y bilis negra [melancolía] eran la causa de enfermedades. (Prescott, 2004)

El primer registro científico de las levaduras tuvo lugar en 1680 tras la invención del microscopio por Leeuwenhoek, quien las observó y describió como cuerpos globulares; sin embargo nunca las consideró como organismos vivos. (Bonifaz, 2010)

El apoyo a la teoría de los gérmenes como causa de enfermedad comenzó a incrementarse a principios del siglo XIX. Agostino Bassi (1773-1856) quien reveló por primera vez que un microorganismo podía causar enfermedad al demostrar en 1835 que una enfermedad del gusano de seda era causada por una infección micótica. (Prescott, 2004)

Las levaduras, han sido los primeros microorganismos “domesticados” por el humano para su provecho; existen registros pictóricos de su utilidad desde hace 6,000 años en la cultura egipcia en la producción de pan y cerveza; su descubrimiento quizá fue accidental al ocurrir contaminación de la masa del pan, lo que produjo un material esponjoso más fácil de digerir y, en el caso de las bebidas alcohólicas, fue el propio proceso de fermentación el que dio origen a un sinnúmero de bebidas. (Bonifaz, 2010)

Los servicios de sanidad animal y los nuevos retos que éstos enfrentan en el marco del comercio internacional, nos obliga a pensar en, si las actividades realizadas desde los productores regionales en función a la explotación de recursos como es la ordeña de leche de cabras para la comercialización directa del recurso lácteo como materia prima o bien para la elaboración de productos derivados de este mismo, son las adecuadas para prevenir y controlar las enfermedades más comunes que afectan a estos animales, mitigando el impacto económico en los sectores productivos.

2. ANTECEDENTES

Actualmente existe una gran cantidad de estudios sobre *Candida sp.* En los cuales se analizan los diversos factores de virulencia, principalmente la formación de biopelícula, biopelículas mixtas y su resistencia a diversos antibióticos, tomando en cuenta que la mayoría de los estudios son aislados clínicos y en general el microorganismo de mayor incidencia es *C. albicans* y *Staphylococcus aureus* para los casos de biopelículas mixtas. (Ibarra, 2012)

En general la principal causa que ha orillado a los investigadores a estudiar a microorganismos comensales como *Candida albicans*, fue el aumento en la incidencia con la que se presentaban en las infecciones en humanos y los principales factores de virulencia asociados al proceso infeccioso. Las especies del genero *Candida* son microorganismos muy versátiles, por su capacidad para sobrevivir como comensales en varios sitios anatómicamente distintos, y pueden causar enfermedad cuando se le presenta la oportunidad. (Bonifaz, 2010)

En una revisión realizada por la Dra. Laura Estela Castrillón y colaboradores mencionan que la incidencia cada vez mayor de infecciones intrahospitalarias por *Candida* y su asociación en individuos susceptibles que cursan con ciertas inmunodeficiencias hacen posible que estos microorganismos, considerados comensales se vuelven patógenos. Conocer los factores de virulencia del microorganismo hace posible determinar, de manera precisa, como se modifica la relación que establece su huésped una vez que los mecanismos de resistencia se han deteriorado. Los principales factores de virulencia asociados con *Candida* se relacionan con su dimorfismo, secreción enzimática, cambio fenotípico, expresión diferencial de genes en respuesta a estos factores y como estos se relacionan con el proceso infeccioso. (Castrillón, 2005)

La resistencia a los antibióticos por los microorganismos, el incremento de infecciones recurrentes e intrahospitalarias por contaminación de dispositivos médicos, así como la dificultad para la cicatrización de heridas son algunos de los problemas cotidianos

en la práctica médica. En la actualidad se sabe que el origen de estos hechos se debe a la capacidad de formación de biopelículas que estos microorganismos desarrollan como mecanismo de supervivencia. Por esta razón resulta importante conocer las condiciones en que se originan y permiten su desarrollo y los posibles mecanismos para la prevención y control de su formación. (Castrillón, 2010)

Las diferentes manifestaciones clínicas de infecciones producidas por *Candida albicans* están asociadas con la formación de biopelículas en las superficies de biomateriales utilizados en la práctica médica. Las células que forman parte de estas biopelículas exhiben fenotipos diferentes en comparación con las células planctónicas crecidas en condiciones típicas de laboratorio (cultivos líquidos), tales como la elevada resistencia hacia los agentes antimicrobianos y modificación contra las defensas del huésped. (Ramage, 2001)

Se tiene registros fósiles de la formación de biopelículas desde hace aproximadamente 3.2 millones de años, por lo que se considera que esta organización celular representa el modo de crecimiento que permite a las células sobrevivir en ambientes hostiles, dispersarse para formar nuevos nichos y les otorga ventajas significativas de protección frente a fluctuaciones del ambiente como la humedad, temperatura y pH, así como la concentración de nutrientes y eliminación de desechos. (Castrillón, 2010)

La incidencia de mastitis debido a hongos y levaduras es usualmente muy baja en los hatos lecheros, pero pueden ocurrir en proporciones epizoóticas, atacando a un número inusual de animales al mismo tiempo, La infección fungal de la glándula mamaria es predominantemente causada por levaduras del género *Candida*. Los hongos no son un agente extraño en la mastitis bovina y son frecuentemente considerados en la mastitis medioambiental debido a la pobre higiene animal. (Guízar, 2008)

Estudios realizados en bovinos y búfalos donde se obtenían aislamientos de levaduras, proveniente de glándulas mamarias en estado clínico de mastitis, cabe mencionar que en México encontramos únicamente dos estudios ambos realizados en bovinos. En este trabajo el principal objetivo era determinar la prevalencia de mastitis bovina en

el municipio de Tarímbaro, Michoacán mediante la prueba de California. El estudio se realizó de Octubre del 2003 a Julio del 2005. (Guízar, 2008), sin embargo no determinaron los microorganismos causales del estado clínico de mastitis, mencionando que en su mayoría los microorganismos responsables de mastitis bovina pueden ser bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp.*, entre otros.

Por otro lado Zaragoza, *et al* (2011), realizaron el aislamiento de levaduras a partir de glándulas mamarias con diferentes presentaciones de mastitis en el Altiplano Mexicano, comprende estados del eje Neo volcánico con límites como la sierra madre occidental y oriental, entre los cuales están Querétaro, Tlaxcala, Hidalgo, Puebla, D.F, Estado de México; menciona que las mastitis clínica y subclínica en bovinos por hongos se han incrementado principalmente por levaduras del género *Candida* donde las especies encontradas con mayor frecuencia en los bovinos sanos y con mastitis clínica fueron *Candida glabrata* y *krusei*, sin embargo se mostró una diversidad de especies de *Candida*, incluidas *Zeylanoides*, *norvegica*, *viswanathii*, *guilliermondi* y *tropicalis*. *Candida albicans* únicamente fue aislada en 11 de las muestras de 282 obtenidas. (Zaragoza, 2011)

Seker y colaboradores reportaron sobre la actividad de biopelícula *in vitro* de especies de *Candida* aisladas de búfalos de Anatolia con mastitis en el oeste de Turquía donde la prevalencia de mastitis relacionada con hongos y levaduras es usualmente baja en comparación con otros agentes causales de mastitis, sin embargo muchos de ellos son asociados con la mastitis de ganado lácteo, las especies de *Candida* son los microorganismos más comunes entre los agentes micóticos de mastitis aislados de glándulas mamarias infectadas. Las especies de *Candida* que han sido reportados causales de mastitis clínica la cual se caracteriza por dolor, fiebre prolongada, reacción inflamatoria en las glándulas mamarias asociadas a nódulos linfáticos y reducción en rendimiento lácteo y calidad en el ganado lácteo. Basados en los bien reconocidos determinantes de virulencia como son enzimas hidrolíticas, toxinas, dimorfismo y producción de hemolisinas, uno de las mayores contribuciones de virulencia de *Candida* es su versatilidad de adaptación a diferentes hábitats y la

formación de comunidades microbianas unidas a superficies conocida como biopelículas. (Seker, 2011)

2.1. GENERALIDADES DE LOS HONGOS

Los hongos son organismos eucariontes que constituyen un complejo y fascinante grupo de organismos, tan grande que se calculan alrededor de 200, 000 especies, pero se cree que hay más de un millón y medio; viven en los medios más variados, y solo alrededor de 400 son necesariamente patógenos para mamíferos, pero también existen patógenos de vegetales, insectos (entomógenos) o de otros hongos (micro parásitos), y unos pocos cientos son hongos oportunistas. (Arenas, 2011) (Bonifaz, 2010)

Sus características fundamentales son:

- Todos son heterótrofos por lo que tienen que alimentarse de materia orgánica preformada que utilizan como fuente de energía.
- Eucariontes, es decir, presentan un núcleo diferenciado con membrana bien organizada.
- Tienen una pared celular formada por polisacáridos, polipéptidos y quitina; esta es rígida, por lo cual no pueden fagocitar partículas alimenticias sino que absorben nutrientes simples y solubles que obtienen al desintegrar polímeros mediante enzimas extracelulares llamadas despolimerasas.
- La estructura fúngica consta de un complejo llamado talo o micelio (Fig. 1) que, a su vez, está constituido por múltiples filamentos o hifas (hifomicetos o mohos) o estructuras unicelulares o levaduras (blastomicetos).
- Aerobios y no motiles, sin embargo, existen algunos hongos flagelados. (Arenas, 2011) (Bonifaz, 2010)
- En condiciones de laboratorio los mohos o filamentosos producen colonias con rasgos característicos como tasa de crecimiento, textura y pigmentación. (Brooks, 2008)

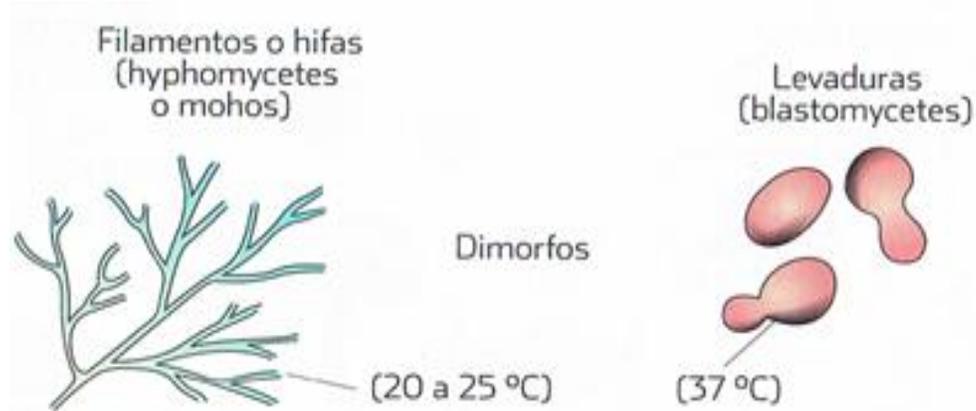


Fig.1 Estructura de un talo o micelio de mohos y levaduras. Micología medica básica, Bonifaz A. (2010).

Sus requerimientos nutricionales son los siguientes:

- Carbono.
- Nitrógeno.
- Vitaminas y factores de crecimiento.
- Iones orgánicos. (Brooks, 2008)

Los factores ambientales que influyen sobre estos microorganismos para su desarrollo y deben ser considerados para su estudio *in vitro* son:

- Temperatura optima de 20 a 37 °C.
- pH (acidófilos 5.4 a 5.6).
- Oxígeno.
- CO₂.
- Humedad. (Brooks, 2008) (Arenas, 2011)

Estructuralmente los hongos constan de una hifa, el cual es un tubo de longitud variable formado por una pared celular rígida, en el que fluye citoplasma. El diámetro varía de 1 a 30 micrómetros; termina en punta, misma que constituye la zona de extensión y representa la región de crecimiento. (Arenas, 2011)

Al igual que otros eucariontes, las células fúngicas poseen mitocondrias y sistema endomembranoso, dictiosomas o cuerpos cisternales, que para algunos autores corresponden al aparato de Golgi, los cuales derivan de microvesículas y macrovesículas; las primeras pueden corresponder al retículo endoplásmico y son ricas en quitina-sintetasa, enzima que produce la quitina, principal componente de la pared celular. La membrana celular basal contiene gran cantidad de esteroides; su principal componente es el ergosterol (precursor); esto es similar a la presencia de colesterol en la célula humana y el fitoesterol en las plantas (Fig. 2). (Bonifaz, 2010)

La pared celular es una de sus estructuras características, básicamente formada por quitina (N-acetilglucosamina), glucanas, mananos y derivados celuloideos, compuestos que en general le dan gran rigidez a la misma, así como algunos glucopéptidos y manoproteínas; estos últimos le proporcionan cierto grado de flexibilidad y son de gran importancia para su taxonomía y propiedades antigénicas; los componentes de la superficie de la pared celular median la adherencia del hongo a las células huésped. Los polisacáridos de la pared celular pueden activar la cascada del complemento y provocar una reacción inflamatoria. Cabe mencionar las diferencias de la pared celular fúngica respecto de la de otros organismos; por ejemplo, en las bacterias está formada por derivados de los ácidos *N*-acetilmurámico y *N*-acetilneuramínico, en los vegetales por celulosa y sus derivados, en los insectos y crustáceos por quitina. (Bonifaz, 2010) (Brooks, 2008)

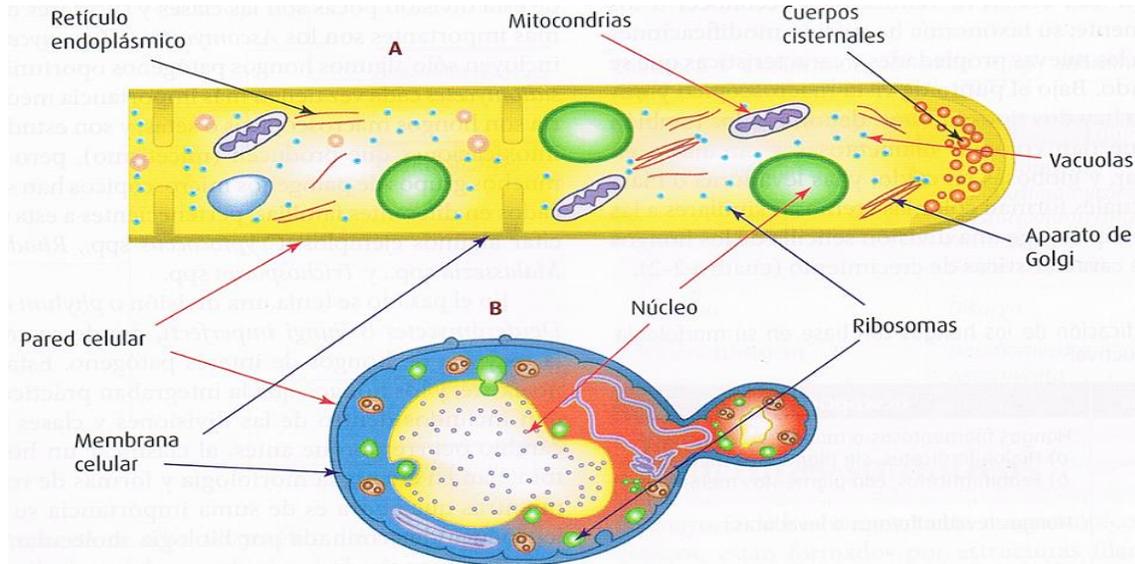


Fig. 2 Células fúngicas: Fragmento de hifa **A** y levadura **B**. Micología medica básica, Bonifaz A. (2010).

Para conservar su capacidad de adaptación, los hongos deben reproducirse fácilmente. Las hifas se desarrollan a partir de una espora por emisión de un tubo germinativo; la forma más simple que ocurre por crecimiento apical de las hifas; no hay crecimiento intercalar, pero las células no terminales pueden emitir ramificaciones. La reproducción se realiza por medio de esporas y puede ser sexuada (teleomorfa) o asexuada (anamorfa), los hongos que presentan los dos tipos se conocen como holomorfos. La reproducción sexuada o perfecta se produce por la unión de dos núcleos, mientras que la asexuada e imperfecta se da a partir de un micelio aéreo o reproductor, sin fusión de núcleos. (Areas, 2011)

Se reproducen por esporas sexuales y asexuales. Tienen dos tipos de células fúngicas: las somáticas, que incluyen núcleos muy pequeños cuyo proceso de división es por mitosis ordinaria, y las reproductoras, que contienen núcleos mucho más grandes, cuya división celular es por meiosis, observándose incluso husos cromáticos y placas metafásicas no muy diferentes a las que se presentan en las células más evolucionadas desde el punto de vista filogenético. (Bonifaz, 2010)

2.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS LEVADURAS

El nombre de “levadura” (en inglés *yeast*), proviene de un vocablo muy antiguo de esta lengua que originalmente fue *gist o gyst* y significa “espuma” o “burbuja”, quizá como producto final de la fermentación (Bonifaz, 2010). Las células de levaduras son mucho más grandes que las bacterias y pueden distinguirse de ellas no solamente por su tamaño sino también por poseer sistemas membranosos intracitoplasmáticos. (Madigan, 2006)

Las levaduras son hongos unicelulares, pueden ser esféricos, ovoides, elípticos, cilíndricos o muy alargados. Sus dimensiones varían entre 3 y 10 μ de ancho por 5 a 30 μ de largo (Fig. 2 B). La mayoría de las veces se encuentran aisladas. En algunos casos permanecen unidas formando pseudohifas (característico de *Candida albicans*), cuyo encruzamiento constituye el pseudomicelio, este fenómeno es conocido como dimorfismo. Crecen bajo condiciones de oxígeno, en general se considera que pueden crecer mejor a pH ácido (3.8 – 5.6), sin embargo estas pueden tolerar un rango que va desde 2 hasta 8, crecen a diversas temperaturas que van desde 0 a 50 °C sin embargo, tienen temperaturas óptimas de crecimiento que de 22 a 37 °C. (García, 2005)

2.1.2. IMPORTANCIA DE LAS LEVADURAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Las levaduras son muy importantes en los alimentos debido a su capacidad para producir descomposición, *Candida* por ejemplo, descompone alimentos con alto contenido de ácido, sal y azúcar, forman películas en la superficies de los líquidos y superficies de los recipientes que los contienen y algunas vuelven rancia a la mantequilla y otros productos derivados del procesamientos de la leche bronca. (Ray, 2010)

El control de la producción lechera es importante por dos razones fundamentales: una es que permite tomar al propio ganadero una serie de decisiones como pueden ser la alimentación de los animales de acuerdo con su producción o eliminar hembras poco productoras, y otra que permite a la administración establecer líneas de mejora. Este control tiene varios objetivos económicos, que son conocer el rendimiento productivo de los animales explotados con repercusión para el propio ganadero, comerciales ofreciendo al consumidor o a la industria un producto de calidad (tanto en su composición como a nivel higiénico-sanitario) y pagarlo según esa calidad y zootécnico en la selección de los animales de mayor rendimiento con la vista puesta en la valoración de sementales, alimentarlos según su productividad y eliminar a los malos productores. Con lo anterior se conseguirá la mejora paulatina del ganado de la explotación.

La cabra es una de las especies que formó parte de las primeras comunidades en la vida de los humanos, desde los inicios de nuestra civilización. Para el año 2007 la población de cabras a nivel mundial se estimó en 850 millones de cabezas, de las cuales el 5 % se encuentra en América Latina, y de éstas aproximadamente 9.5 millones están en México este produce el 42.8 % del total de la leche de cabra en el continente Americano con 155 millones de litros registrados durante el año 2005, que con respecto a la producción de leche de vaca, representan el 1.6 %. (Ruiz, 2013)

El crecimiento de mohos y levaduras es una causa común de alteración de los productos lácteos fermentados ya que estos microorganismos crecen bien a pH bajo. La alteración por levaduras se manifiesta por olor afrutado o a levadura y/o con la producción de gas. Los quesos duros (o curados) si están bien elaborados, tienen pequeñas cantidades de lactosa y por lo tanto el desarrollo potencial de levaduras en ellos es muy limitado, las leches fermentadas, como el yogurt, la mazada fermentada y los quesos frescos, como el Cottage, generalmente contienen concentraciones fermentables de lactosa y por lo tanto son sensibles a la alteración por levaduras. El aroma fermentado a levadura observado en el queso Cheddar alterado por el crecimiento de diversas especies de *Candida*, se asoció al contenido elevado de etanol,

acetato de etilo y butirato de etilo, además contiene gran cantidad de humedad y bajo contenido salino lo que contribuye el crecimiento de levaduras. Los productos lácteos así como la leche fresca proporcionan un nicho ecológico muy especializado ya que selecciona las especies que utilizan lactosa o el ácido láctico y toleran grandes cantidades de sal, estas también producen enzimas proteolíticas o lipolíticas que también proporciona una gran ventaja para desarrollarse en una gran cantidad de productos lácteos, ya que también se han aislado de queso Cheddar envasado ha vacío diversas especies de levadura del genero *Candida*. (Doyle, 2001)

2.1.3. LA MASTITIS Y SUS EFECTOS EN LA PRODUCCIÓN LECHERA

La mastitis es una enfermedad compleja que puede definirse como una inflamación de la glándula mamaria causada más comúnmente por infección intramamaria con un patógeno, pero también puede ser causada por una lesión, menos frecuente por alergia y neoplasias. (Guízar, 2008) (Ruiz, 2013)

La mastitis es una enfermedad altamente prevalente en el ganado lechero y es una de las enfermedades más importantes que afecta mundialmente la industria lechera; pues ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo debido a la disminución en el rendimiento de leche y un aumento en el número de tratamientos químicos y desecho temprano de vacas, por lo que se ha reconocido como la enfermedad más costosa en los hatos lecheros. Probablemente ha sido reconocida desde que el hombre domestico a la vaca. En los muchos miles de años siguientes y a pesar de todo el avance científico, constituye un serio problema para la salud pública en la industria de laticinios, ya que el uso incorrecto e indiscriminado de los antibióticos es evidente, estos contaminan la leche con niveles cada día más elevados e inhiben la fermentación de los cultivos bacterianos que se utilizan en la fabricación de los productos lácteos. (Guízar, 2008)

Existe una cantidad importante de elementos que modifican la producción de leche de cabra, los cuales pueden estar interrelacionados, siendo difícil determinar la influencia individual que pueden ejercer cada uno de ellos por separado, pero pueden dividirse en genéticos, ambientales, nutricionales y sanitarios. Dentro de los factores ambientales, la mastitis ocasiona una disminución de la producción de leche, y ésta se caracteriza por cambios físicos, químicos y bacteriológicos en la leche y cambios patológicos en la ubre. Existen varios factores de riesgo que influyen en el tipo y frecuencia de aislamiento de los microorganismos causantes de mastitis, como son: higiene en la ordeña, fase de lactación, ubicación geográfica, manejo, etapa de lactación y condiciones climatológicas (Ruiz, 2013). Los patógenos contagiosos son transmitidos de vaca a vaca a través de los paños utilizados para limpiar ubres, la leche residual en las pezoneras y un equipo de ordeño inadecuado donde el reservorio primario alberga los patógenos, los microorganismos oportunistas son agentes patógenos en el entorno que invaden cuando los mecanismos de defensa están disminuidos o cuando se introducen inadvertidamente en la glándula mamaria al realizar un tratamiento intramamario. (Guízar, 2008)

La mastitis puede ser clasificada según la gravedad de las lesiones o intensidad de la reacción inflamatoria en clínica y subclínica. La mastitis clínica muestra signos y se caracteriza por cambios en la glándula, que puede aumentar de tamaño y se caracteriza por la tumefacción o dolor en la ubre y enrojecimiento, así como alteraciones en la leche que puede contener grumos, coágulos y cambios de color. La mastitis subclínica puede no mostrar signos visibles de enfermedad y la leche es aparentemente normal. Este tipo de mastitis sólo puede ser detectada midiendo el contenido celular de la leche, o bien es caracterizada por la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas en la leche como indicativo, no presenta cambios visibles en la leche y la ubre. La presentación subclínica es importante, debido a que usualmente precede a la forma clínica, es de larga duración, es difícil de detectar, reduce la producción láctea, afecta la calidad de la leche, constituye un reservorio de microorganismos que pueden llevar

a la infección de otros animales del rebaño. Existe una gran cantidad de agentes causales y factores predisponentes implicados en la mastitis caprina. Entre los agentes etiológicos se incluyen bacterias, micoplasmas, levaduras y hongos filamentosos. (Ruiz, 2013) (Guízar, 2008)

A pesar de las pérdidas económicas que produce la mastitis en cabras lecheras en México, existe escasa información relativa al estado epidemiológico de la misma en nuestro país.

2.2. GÉNERO CANDIDA

El nombre del género *Candida* significa “Blanco Brillante”; las células no contienen ni carotenoides ni pigmentos. Este género se fundó en 1923 por Berkhout y ha sufrido muchos cambios y definiciones desde entonces (Jay, 2005). Incluye un variado número de especies, son cerca de 200, pero solo 58 son oportunistas en animales y hombre, de 6 a 8 especies son las que comúnmente presentan infecciones humanas, sobresaliendo *Candida albicans*, por lo regular el género *Candida* tiene características definidas, son levaduras con ausencia de pigmentos; forma celular variable, es decir las células pueden ser elípticas, globosas, cilíndricas y triangulares; tienen pared celular, membrana plasmática, mitocondria vacuola y núcleo, su reproducción es por gemación y pueden formar pseudohifas e hifas (con excepción de *C. glabrata*) (Bonifaz, 2010).

Candida son levaduras alargadas o ligeramente redondas de 2-6 x 3-9 μm que se reproducen por gemación (blastoconidios). A excepción de *C. glabrata* el resto de las especies asociadas a candidosis pueden formar pseudomicelios; *C. albicans* y *C. dubliniensis* además son formadoras de hifas. Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. tropicalis* (Castañón, 2012)

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

2.2.1. ESPECIES DE MAYOR IMPORTANCIA

Muchas especies de *Candida* infectan un gran rango de tejidos, este género es el más común que causa infecciones micóticas en humanos, entre las enfermedades más predominantes se incluye la vaginitis oral. Las especies de *Candida* son la causa más común en infecciones de individuos con inmunosupresión, incluidos pacientes con desordenes hematógenos y trasplantados recientemente, muchas especies (*C. albicans*, *krusei* y *glabrata*) son miembros de la microbiota normal de la cavidad oral, vaginal tracto gastrointestinal. Las especies de *Candida* constituyen la cuarta causa principal de la infección nosocomial en torrente sanguíneo, recientes reportes indican que durante largos tratamientos con fluconazol se han aislado levaduras patogénicamente resistentes a este mismo, tales como: *C. glabrata*, *krusei*, *inconspicua* y *dublinskiensis*. (Dexter, 2003)

En bovinos la mastitis es una enfermedad causada por una gran cantidad de microorganismos que causan grandes pérdidas así como daños y prejuicios diariamente a la industria lechera los aislamientos de levaduras de glándulas mamarias con diferentes presentaciones de mastitis en el Altiplano Mexicano donde el objetivo era conocer las levaduras presentes en 282 muestras de leche de glándulas mamarias donde se identificaron 20 especies diferentes del género *Candida*, las especies con mayor frecuencia fueron *C. glabrata* y *krusei*, y con menor cantidad *C. Zeylanoides*, *norvegica*, *viswanathii*, *guilliermondi*, *tropicalis* y *albicans* fue aislada solo en 11 de las muestras totales. (Zaragoza, 2011)

Seker, 2011 reporta que la actividad de biopelícula *in vitro* de especies de *Candida* aisladas de búfalos de Anatolia con mastitis, determinaron que la infección fungal de la glándula mamaria es predominantemente causada por levaduras del género *Candida*, las especies más frecuentes aisladas de búfalos de Anatolia con mastitis son *C. krusei* seguido de *C. rugosa*, *C. kefyr* y *C. tropicalis*. (Seker, 2011)

Es sumamente importante la base que se tome para la identificación de las diversas especies del género *Candida*. La utilización de cultivos, la formación de filamentos en suero, la producción de pseudomicelio y clamidoconidios o utilización de pruebas bioquímicas como agares cromogénicos son algunos ejemplos para la identificación, o bien la utilización de estas en conjunto para obtener dicha identificación.

Las pruebas fisiológicas y bioquímicas permiten la identificación de las especies por el uso de carbohidratos y sustancias nitrogenadas específicas. La identificación bioquímica se basa en la fermentación o anaerobiosis (Zimograma) y utilización (oxidación) o asimilación (Auxonograma) de carbohidratos (Fig. 3). Existe un perfil bioquímico que identifica a cada una de las especies del género *Candida*. (Arenas, 2011) (Bonifaz, 2010).

	Morfología			Auxonograma									Zimograma					Otras características					
				Indispensable					Electivo														
	Micelio o pseudomicelio	Clamidiosporas	Filamentación en suero a 37 °C, 4 h	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Inositol	Celobiosa	Xilosa	Trehalosa	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Ureasa	Reducción tetrazoilo	Resistente a cicloheximida (Actidione) (crecimiento)	Utilización de KNO ₃
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	±	+	-	-	-	B	+	-
<i>C. stellatoidea</i>	+	±	±	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	R	+	-
<i>C. tropicalis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Vi	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	R	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	B	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	V	-	+	-	+	+	+	+	+	R	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	R	+	-
<i>C. zeylanoides</i>	+	-	-	+	+	+	V	-	-	-	-	-	+	V	-	-	-	-	-	-	R	-	-

+, positivo; -, negativo; ±, casi siempre es positivo; B, blanco; R, rosado; V, variable; Vi, violeta.

Fig. 3 Características fisiológicas para la identificación de *Candida*. Micología médica ilustrada. Arenas R. (2011)

2.2.2. CANDIDOSIS

Se encuentran como la especie más frecuentemente aisladas *Candida albicans*; sin embargo, otras especies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* han emergido como agentes causales de Candidosis, definida como una micosis causada por diversas especies de levaduras oportunistas del genero *Candida*, en especial *Candida albicans*; presenta una variedad de cuadros clínicos; afecta en particular mucosas (boca, vagina, etc.), piel, uñas y de manera excepcional otro órganos como pulmones e intestino, es una enfermedad cosmopolita y es la micosis que más se presenta en todo el mundo, requiere de factores predisponentes, la mayoría de las veces se origina de manera endógena, casi siempre atribuible a procesos como: a) desequilibrio de la flora microbiana, que favorece el incremento de levaduras del

género *Candida*, lo cual se puede deber a cambios en el pH, o cúmulos de nutrientes como el glucógeno, b) disminución de la flora bacteriana por antibióticos, c) por enfermedades, d) procesos que influyen en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular. Los casos exógenos siempre se inician por el ingreso al organismo de grandes cantidades de levaduras, por ejemplo por cateterismo en casos de drogadicción ya que se inocula el microorganismo de manera directa al torrente circulatorio (Bonifaz, 2010). La mayor parte de las infecciones son endógenas, y el episodio clave parece ser un cambio en la relación entre la levadura y el huésped. El proceso de infección comienza con la adherencia del microorganismo comensal a las células de la mucosa o queratinocitos, que interactúan en la relación de la pared fúngica de polisacáridos (mananos) con un receptor en la célula epitelial. Se han reconocido como adhesinas putativas los mananos, las manoproteínas y la quitina. (Arenas, 2011)

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

La colonización por *Candida albicans* puede llevar a la infección sistémica cuando el huésped tiene varios factores de riesgo, como el uso de antibióticos de amplio espectro, esteroides u otros agentes inmunosupresores, diabetes mellitus, SIDA, depresión de las funciones fagocíticas o alteraciones locales del sistema gastrointestinal. Estas situaciones pueden ocasionar candidiasis gastrointestinal o diseminación hematológica. *Candida* es un microorganismo muy versátil, por su capacidad para sobrevivir como comensal en varios sitios anatómicamente distintos y puede causar enfermedad cuando se le presenta la oportunidad, La limitación por nutrientes y la competencia entre bacterias y hongos (microbiota) en la superficie de las mucosas proporcionan una presión selectiva que ocasiona la eliminación de los microorganismos menos adaptados. (Castrillón, 2005)

Los casos de candidiasis sistémica están relacionados a pacientes con severas deficiencias en su sistema inmune. *C. krusei* y *C. glabrata* son habitualmente resistentes a los compuestos azólicos y su hallazgo como agentes infecciosos involucrados en enfermedades sistémicas intrahospitalarias ha aumentado en los últimos años (Castrillón, 2001) (Castrillón, 2005)

2.2.3. FACTORES DE VIRULENCIA

Los factores de virulencia son una serie de propiedades intrínsecas de los agentes infecciosos que aseguran su efectividad en la génesis del proceso infeccioso. Entre ellas están su capacidad para sobrevivir a condiciones adversas del ambiente, los mecanismos de locomoción que le permiten llegar al sitio elegido para atacar, las formas que puede expresar para adherirse a ese blanco, su capacidad para penetrar la célula o la producción de toxinas que induzcan daño, su capacidad para cambiar la estructura antigénica de su cubierta externa y así evadir la respuesta inmune del hospedero, su habilidad para desarrollar resistencia a las drogas utilizadas en el tratamiento; en fin, esos atributos y una serie muy grande de otros, son denominados “factores de virulencia” y le confieren características especiales al agente infeccioso que los presenta (Chavarría, 2002)

Las especies de *Candida sp.* poseen diversos atributos de virulencia para colonizar al huésped y ocasionar daño de forma directa, al activar, resistir o desviar los mecanismos de defensa del mismo. Los factores de virulencia expresados o requeridos por el microorganismo para causar infección pueden variar según el tipo, sitio y la naturaleza de las defensas del huésped. (Castrillón, 2005)

A continuación se describirán brevemente cada uno estos factores:

1. **Morfogénesis**, se refiere a la transición morfológica entre las levaduras (unicelulares) y la forma de crecimiento filamentosa del microorganismo, que

puede convertirse de forma reversible a células de levadura, con crecimiento de hifas o pseudohifas (Fig. 4). Este cambio es estimulado por las condiciones ambientales y se considera uno de los factores de patogenicidad o de virulencia más significativos. Hay que enfatizar que esta propiedad hace que dichas levaduras se comporten como hongos dimórficos siendo que las formas de pseudofilamentos y filamentos las que marcan la infección. Este proceso tiene excepción con *C. glabrata* que no sufre cambios morfológicos por lo que se le considera levadura monomórfica. (Bonifaz, 2010) (Castrillón, 2005)

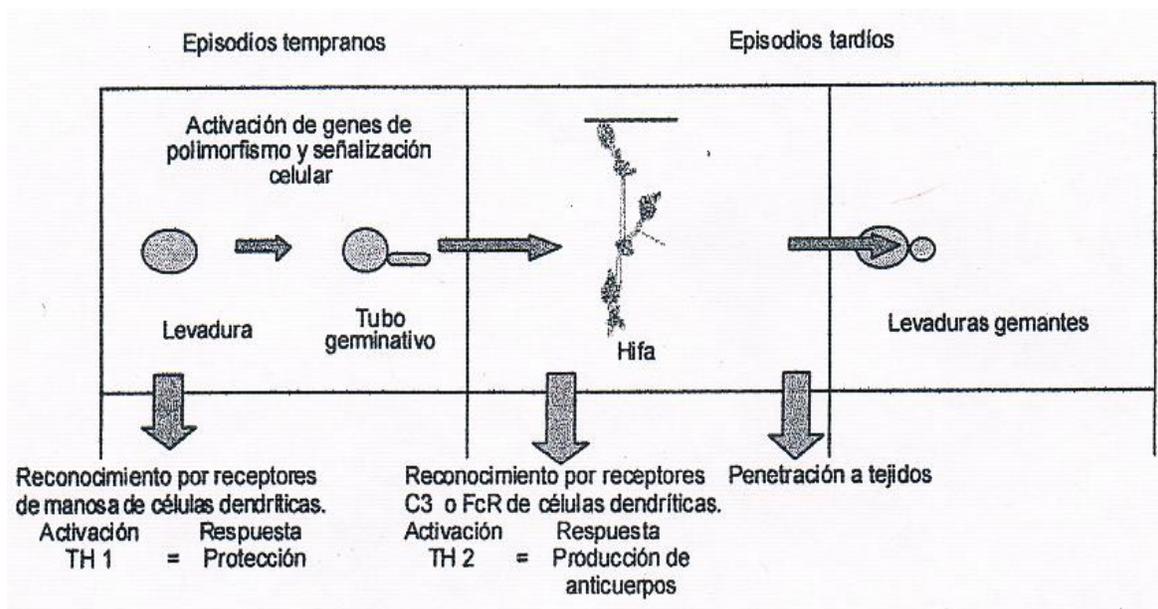


Fig. 4 Morfogénesis en *Candida* durante la infección, Castrillón (2005)

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

3. Enzimas, son determinantes en la virulencia de *Candida*, ya que tienen la capacidad de romper polímeros que proporcionan nutrientes accesibles para el crecimiento, así como de inactivar las moléculas útiles en la defensa del organismo, las principales enzimas extracelulares relacionadas con la patogenicidad son:

3.1. PROTEASAS. En el género *Candida* se han descrito varios miembros de enzimas de secreción aspártico proteasas (SAP), codificadas por los genes de la familia SAP, las cuales proporcionan un sistema eficiente y flexible que garantiza su éxito eficiente y oportunista, ya que son capaces de hidrolizar proteínas estructurales de la célula hospedera y proteínas del sistema inmune que favorecen la colonización. La presencia de los genes de la familia SAP es única en las especies patogenicias de *Candida* y esta ausentes en la levadura no patogenia *S. cerevisiae*, lo cual apoya que estas proteasas están implicadas en la virulencia (Calderone, 2002) (Castrillón, 2005)

3.2. FOSFOLIPASAS. En *Candida albicans* se han identificado cuatro fosfolipasas (PLA, PLB, PLC Y PLD), La enzima PLB1A es detectado en ambas formas celulares (Blastospora e hifa) pero se secreta y detecta principalmente en hifas durante la invasión a los tejidos, esto se ve reforzado con una cepa mutante de *C. albicans* con la eliminación de este gen, observando una reducción de su nivel de virulencia hasta en un 60% comparada con las células silvestres. (Calderone, 2002) (Castrillón, 2005)

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

4. Adhesinas, es un atributo del genero *Candida* ya que correlaciona de forma positiva su patogenicidad con la capacidad adherente a las células del huésped. Las cepas adherentes de *Candida albicans* son más patogénicas que las que tienen fenotipo menos adherente. Una adhesina se define como una biomolécula que promueve la adherencia de *C. albicans* que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, lamina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV. Existen diferentes tipos de adhesinas en *Candida*, como Als, Hwp1p, Int1p, Mnt1p. (Calderone, 2002) (Castrillón, 2005)

4.1. Aglutin - like sequence (Als). Los genes de la familia Als de *Candida albicans* codifican glucoproteínas grandes de la superficie celular que están relacionadas con el proceso de adhesión a las células del huésped, esta familia de genes están regulados por cambios fisiológicos relevantes como cambios en el medio de cultivos (Als1), morfología (Als3 y Als8) y fase de crecimiento. Estos genes también se encuentran en otras especies de *Candida* que han sido aisladas de muestras clínicas. (Calderone, 2002) (Castrillón, 2005)

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

4.3. Integrin Like protein (Int1p). la proteína Int1p es una proteína transmembranal. *Candida* se une a varios ligandos de las proteínas de la matriz extracelular, que incluye fibronectina, laminina y colágenas tipo I y IV. Las cepas que tienen delección en los genes Int1 son menos virulentas o se adhieren con más lentitud a las líneas celulares epiteliales. También tienen deficiencias en la filamentación en su crecimiento en leche-tween y agar spider, por lo tanto el gen Intp1 juega un papel importante en la adherencia y filamentación de *Candida*. (Calderone, 2002) (Castrillón, 2005)

4.4. α -1,2 manosil transferasa (Mntp1). Las cepas de *Candida* que tienen delección e el gen Mnt1 son menos capaces de adherirse in vitro y son avirulentas. la proteína que codifica a este gen o Mnt1 es una proteína de membrana tipo II que se requiere para la manolisación tanto O- y N- en el hongo. La manana es el principal constituyente de la pared celular. (Calderone, 2002) (Castrillón, 2005)

El mayor atributo de virulencia de *Candida* es la habilidad de adherencia y unirse a las superficies en comunidades microbianas conocidas como biopelículas. Las biopelículas de *Candida* se han observado en la mayoría de los dispositivos médicos tales como implantes derivados de tubos endotraqueales, marcapasos y diversos tipos de sondas, pacientes portadores de prótesis también se pueden nombrar como sustratos de superficie. (Wander, 2008)

2.2.4. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

La percepción de los microorganismos como formas unicelulares de vida se basa en el modo de crecimiento como cultivo puro; sin embargo, la mayor parte de los microbios persisten unidos a las superficies dentro de un ecosistema estructurado, como biopelículas y no como organismos libres en flotación (Douglas, 2002) (Castrillón,

2005). En el caso de las bacterias anteriormente ya se mencionaba que los microorganismos crecen incluidos en biofilmes (biopelículas). Consideradas microcolinas revestidas de células bacterianas adosadas a una superficie mediante polisacáridos adhesivos excretados por las propias células. Estos atrapan nutrientes para el crecimiento de las poblaciones microbianas y ayudan a impedir el desprendimiento de las células que crecen sobre las superficies expuestas de líquido. (Madigan, 2004)

Ahora sabemos que una biopelícula es un ecosistema complejo de microorganismos y sus productos extracelulares adheridos sobre una superficie biótica o abiótica, o bien, comunidades microbianas que constituyen la forma más exitosa de colonización entre los microorganismos ubicuas en la naturaleza y responsable de muchas enfermedades, la arquitectura de estas muestra una estratificación intrínseca en poblaciones polimicrobianas, organizadas especialmente con importantes interacciones de comunicación interespecifica. (Ibarra, 2012) (Castrillón, 2010)

Las especies de *Candida* se reconocen como los principales agentes de infecciones adquiridas en el hospital son el tercer o cuarto patógenos aislado de sangre que sobrepasa la frecuencia de bacilos gramnegativos, su aparición como patógeno nosocomial es importante ya que es un factor de riesgo asociado con los procedimientos médicos modernos sobre todo con el uso de fármacos inmunosupresores o citotóxicos, de antibióticos potentes que suprimen la flora bacteriana normal y de los dispositivos implantados de varias clases. Las biopelículas formadas tanto en dispositivos médicos como en ambientes naturales con frecuencia son polimicrobianas, las de *Candida* y *Staphylococcus* se desarrollan con facilidad incrementándose la patogenicidad de las mismas, las células fúngicas pueden moderar la acción de los antimicrobianos y las bacterias afectar la actividad de los agentes antifúngicos. (Castrillón, 2005) (Castrillón, 2010)

En las biopelículas las células desarrollan características fenotípicas que son diferentes de sus contrapartes planctónicas crecidas en condiciones típicas de

laboratorio (cultivos líquidos), tales como la elevada resistencia hacia los agentes antimicrobianos y protección contra las defensas del huésped (Ramage, 2001) (Ibarra, 2012).

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

Diferentes estudios han demostrado que la arquitectura de las biopelículas de *Candida* se ve afectada por la superficie en la que se desarrolla, por ejemplo las biopelículas formadas sobre las superficies planas hidrófobas de elastómero de silicona o cloruro de polivinilo (PVC), tienen una estructura diferente bifásica compuesta por una capa adherente de células cubiertas por blastosporas e hifas incrustadas dentro de la capa de matriz extracelular (ECM) (Franca, 2011).

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

La formación de las biopelículas ocurre como un proceso continuo de acuerdo con varias fases de desarrollo que son: A) acondicionamiento, B) adhesión, C) síntesis de matriz extracelular, D) maduración y E) dispersión, lo que lleva a la formación de una estructura uniforme en forma de depósitos homogéneos y acumulaciones viscosas celulares rodeados de una matriz de polímeros con canales abiertos para el movimiento de agua (fig. 5). (Ramage, 2001) (Ramage, 2005)

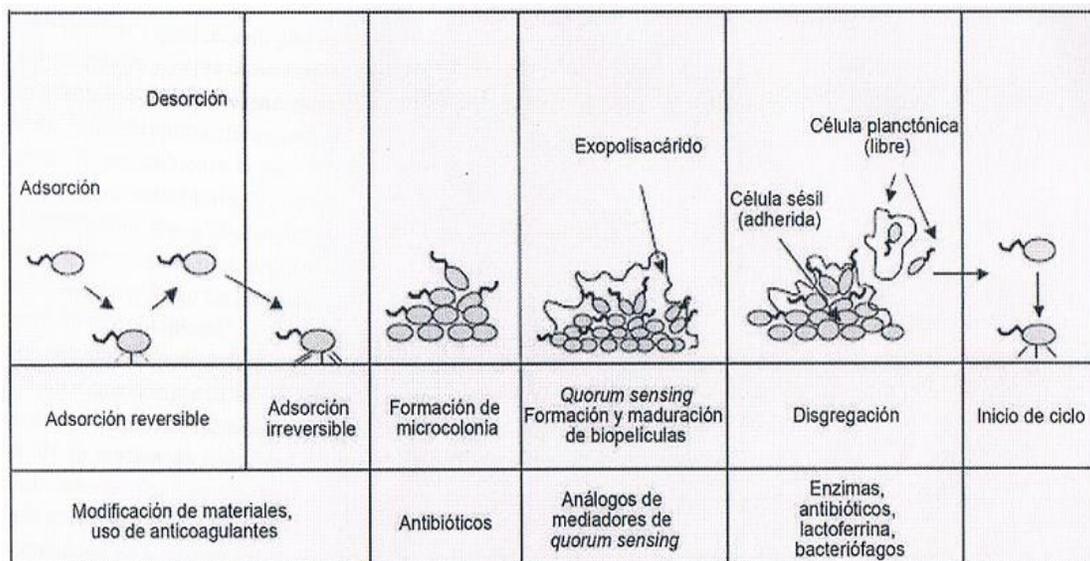


Fig. 5 Fases de formación de biopelículas y estrategias de dispersión, Castrillón (2010).

A continuación se describirán brevemente cada una de las fases de formación:

- A) Fase de acondicionamiento.** Los componentes orgánicos del medio ambiente o de los tejidos forman una cubierta que neutraliza la carga excesiva de la superficie (que previene la aproximación entre células bacterianas o de hongos). (Castrillón, 2005)
- B) Fase de adhesión.** Los microorganismos libres (planctónicos) forman una capa que se adsorbe a la superficie por periodos cortos mediante fuerzas de atracción electrostáticas y se libera de esta por adsorción reversible. Los microorganismos en suspensión se agregan y ocurre la adhesión de células iguales o diferentes (co-agregación) a la superficie acondicionada, este proceso es favorecido por varios componentes bacterianos como los pilis, flagelos y polímeros superficiales como lipopolisacarido en bacterias Gram negativas y el ácido micólico en las Gram positivas, que participan en este proceso venciendo las fuerzas de repulsión (Douglas, 2002) Las propiedades físico-químicas de la superficie puede ejercer gran influencia en el grado y extensión de la adhesión, los gérmenes se adhieren más rápidamente a superficies hidrófobas, no polarizadas como el teflón y plásticos, en comparación con materiales hidrófilos como el vidrio o el metal. Una vez que se logra la adhesión irreversible, las células se dividen y colonizan la superficie cuando la concentración local de señales químicas producidas por el metabolismo microbiano alcanza un nivel umbral, sugiere que la población microbiana ha alcanzado una densidad mínima, esto condiciona el inicio de cambios fenotípicos en la comunidad. (Ramage, 2001) (Ramage, 2005)
- C) Síntesis de matriz.** Al proceso en el que una célula microbiana percibe la proximidad de otras células y genera señales químicas que corresponden con metabolitos secundarios, se le conoce como *Quórum sensing*; este echo trae

como consecuencia la autoinducción en la síntesis de matriz extracelular o exopolisacarido y se logra así la maduración. (Castrillón, 2010)

D) Fase de maduración. La consecuente formación tridimensional de la biopelícula, genera canales de agua que le sirven como microcirculación a la colonia. Cuando crece lo suficiente, el microorganismo responde en masa y se comporta como grupo. (Castrillón, 2010) (Ramage, 2001) (Ramage, 2005)

E) Fase de dispersión. Finalmente, después de la maduración de la biopelícula, ocurre la dispersión por células aisladas o en conglomerados que colonizan nuevas superficies y se inicia un nuevo ciclo de formación de biopelículas. Existe diferencias en las características de las células que se desprenden, ya que las células sésiles (Adheridas) pueden conservar la funcionalidad de la biopelícula como lo es la resistencia a antibióticos, en cambio, las células aisladas pueden tener el fenotipo plantónico (libre) y ser susceptible a los mecanismos de defensa del hospedero (Douglas, 2002) (Castrillón, 2010)

2.2.5. MÉTODOS DE ESTUDIO DE BIOPELÍCULAS

En las últimas décadas se ha utilizado un amplio rango de modelos *in vitro* para estudiar la formación y el desarrollo de biopelículas; la evolución de los métodos analíticos de los estudios de imagen ha permitido diseñar diferentes estrategias para el estudio de las biopelículas, entre las cuales se encuentran varios modelos específicos como: los catéteres en disco, tira de acrílico, microplaca de titulación y biopelícula profundida, entre otros. Con estos modelos se analiza la cuantificación y crecimiento de los microorganismos mediante la evaluación de ; peso seco, incorporación de isotopos radioactivos, reducción de sal de tetrazólio XTT, bioluminiscencia ATP, ensayos de lectinas ligadas a enzimas y el sistema LIVE/DEAD. (Douglas, 2002) (Castañón, 2012)

Estos ensayos se acompañan de estudios de ultraestructura microscópica, como la electrónica de barrido, laser con focal que permite ver en tercera dimensión la formación de biopelículas, lo que ha permitido la descripción de diferentes modelos de organización entre ellos (Ramage, 2001). Recientemente se desarrollaron estudios *in vivo* para la detección temprana de infección en tejidos e implantes biomédicos (Castañón, 2012). La mayoría de estos sistemas modelo se enfocan en la cuantificación de la biomasa de biopelícula, la cual se realiza mediante recubrimiento convencional, que es un trabajo intensivo y lento. En los últimos años, varios ensayos de sustitución para la cuantificación de biopelículas en placas de microtitulación se han descrito los cuales se pueden clasificar dependiendo el tipo de biomasa de la biopelícula (basado en la cuantificación de la matriz y células vivas y muertas), ensayo de viabilidad (sobre la base de cuantificación de células viables) y ensayos de cuantificación de la matriz (en base a la tinción específica de componentes de la matriz). (Elke, 2008)

A continuación se describen brevemente algunos métodos de estudios de biopelículas:

A) Cristal violeta. Es una tinción que fue descrita por primera vez por Christensen en 1985 y desde entonces ha sido modificado para aumentar su precisión y para permitir la cuantificación de biomasa de biopelícula en todo el pozo. Cristal Violeta es un colorante básico, que se une a moléculas de la superficie de carga negativa y los polisacáridos en la matriz extracelular, dado que hay células y muertas, la matriz se tiñen por el Cristal Violeta, que es poco adecuado para evaluar la viabilidad de las células de la biopelícula. (Elke, 2008)

B) Azul de Alamar. El uso del indicador azul de Alamar, en comparación con otros métodos de sensibilidad, puede leerse tanto visualmente, como espectrofotométricamente, su reducción es dependiente del metabolismo activo. Es un método sensible y de alto rendimiento, su uso es rentable y el azul de Alamar carece de toxicidad para humanos y microorganismos.

- C) Colorante fluorogénico Syto 9.** Es un ácido nucleico, que se difunde pasivamente a través de las membranas celulares y se une al ADN de las células, tanto viables como muertas. Como el ADN conforma una parte sustancial de la matriz extracelular, esta tinción proporcionara información sobre la biomasa de biopelícula total. Syto 9 útil para estudios de la composición y morfología de la biopelícula. Este colorante se ha utilizado también para la cuantificación rutinaria de la biomasa de biopelícula bacteriana y de levadura. (Elke, 2008)
- D) 2,3-Bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamino carbonil)-2H-tetrazolio hidróxido (XTT).** Para diferenciar entre células vivas y muertas, las técnicas de cuantificación se han basado en la actividad metabólica de las células viables. Diversas metodologías de viabilidad implican el uso de sales de tetrazólio, incluyendo 5-ciano-2,3-tetrazolio cloruro de ditolilo (CTC), el ensayo XTT se basa en la reducción del colorante XTT a una forma soluble en agua. La absorbancia del sobrenadante de las células es proporcional al número de células metabólicamente activas. El ensayo XTT se ha utilizado ampliamente para la cuantificación de células viables en los cultivos planctónicos y para la cuantificación de bacterias y levaduras. (Elke, 2008)
- E) Resazurina.** Otro ensayo de viabilidad se basa en la reducción de la resazurina por las células metabólicamente activas, este es un compuesto azul que se puede reducir a rosa resorufina, que es fluorescente. Aunque este medio de contraste, también conocido como Alamar Blue, se utiliza principalmente en los ensayos de viabilidad de células de mamífero, también se ha publicado extensamente en las pruebas de susceptibilidad de hongos y bacterias. (Elke, 2008)
- F) Diacetato de fluoresceína (FDA).** Células microbianas viables también son capaces de convertir el colorante FDA en fluoresceína (amarillo) altamente fluorescente por esterasas no específicas intra y extracelular. La FDA ha sido

utilizado para medir la actividad microbiana total en el suelo, así como para la cuantificación de la biomasa de biopelículas. (Elke, 2008)

G) 1,9-dimetil azul de metileno (DMMB). La cuantificación de la matriz, un componente esencial de la biopelícula, también es de interés. El colorante DMMB, originalmente aplicada para la cuantificación de los glicosaminoglicanos sulfatados en cultivos chondrocyt, también se ha utilizado para cuantificar la matriz de la biopelícula de *staphylococcus aureus*. DMMB forma un producto de complejos insolubles con polisacáridos sulfatados en la matriz de la biopelícula. La cantidad de colorante liberado por la adición de una solución de desacomplejación se mide espectrofotométricamente y refleja la cantidad de polisacáridos sulfatados presentes en la matriz de la biopelícula. (Elke, 2008)

3. JUSTIFICACIÓN.

La Candidosis es una micosis producida por el género *Candida*, es considerado una enfermedad por hongos oportunistas, de las causas más comunes de infecciones nosocomiales presentando una gran variedad de cuadros clínicos, afectando en particular mucosas. Muchas de las candidiasis se encuentran asociadas a la formación de biopelículas sobre catéteres, prótesis dentales, válvulas cardíacas protésicas y otros dispositivos biomédicos, tiene además repercusiones en áreas productivas, principalmente en los sistemas de ordeña de leche de cabra, debido a que están relacionadas en generar diferentes presentaciones de mastitis.

Una vez que se determina la formación de biopelícula por las diferentes especies de *Candida*, que sean identificadas a partir de muestras de leche de cabra clínicamente sanas, de tal forma esto será un criterio para confirmar que dichas especies cuentan

con la capacidad de formación de biopelícula como un factor de virulencia para la supervivencia y adaptabilidad al medio ambiente y/o tejidos que sirvan como nichos para generar su diseminación entre el ganado y que posteriormente se desarrollen infecciones como la mastitis.

Lo anterior permitirá desarrollar y optimizar, nuevas y mejores medidas de prevención de infecciones, minimizando la frecuencia con la que se utilizan tratamientos con antibióticos, utilizando dosis más bajas, de tal forma que sean más adecuadas, además de evitar el desarrollo de resistencia a los mismos, se podrán generar métodos más adecuados y eficaces que logren prevenir y eliminar la formación de biopelículas por las diversas especies de *Candida* en los sistemas de ordeña y/o la colonización en tejidos del ganado lechero, lo cual se reflejara en minorizar las grandes pérdidas económicas en los hatos lecheros y áreas lactológicas producto de la disminución en la producción y calidad de la leche obtenida, por la presencia de estos microorganismos capaces de resistir a los métodos de lavado, sanitización y desinfección, además de los antibióticos presentes en la leche.

4. HIPÓTESIS.

La determinación de la capacidad de formación de biopelícula por *Candida glabrata*, aislada de muestras de leche de cabras clínicamente sanas, permitirá relacionar si cuentan con este factor de virulencia.

5. OBJETIVOS.

5.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la actividad metabólica de *Candida glabrata* mediante un ensayo colorimétrico que será cuantificado con lector de microplaca evaluando la capacidad

reductora sobre el 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida, también conocido como XTT, para determinar la formación de biopelículas a partir de aislamientos de muestras de leche de cabras clínicamente sanas.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Aislar e identificar las levaduras presentes en las muestras de leche de cabra.
- Estandarizar la técnica de formación de biopelículas por reducción de XTT.
- Clasificación de los aislamientos de acuerdo a su capacidad de formación de biopelículas en alta, media y baja.

6. DIAGRAMAS DE TRABAJO

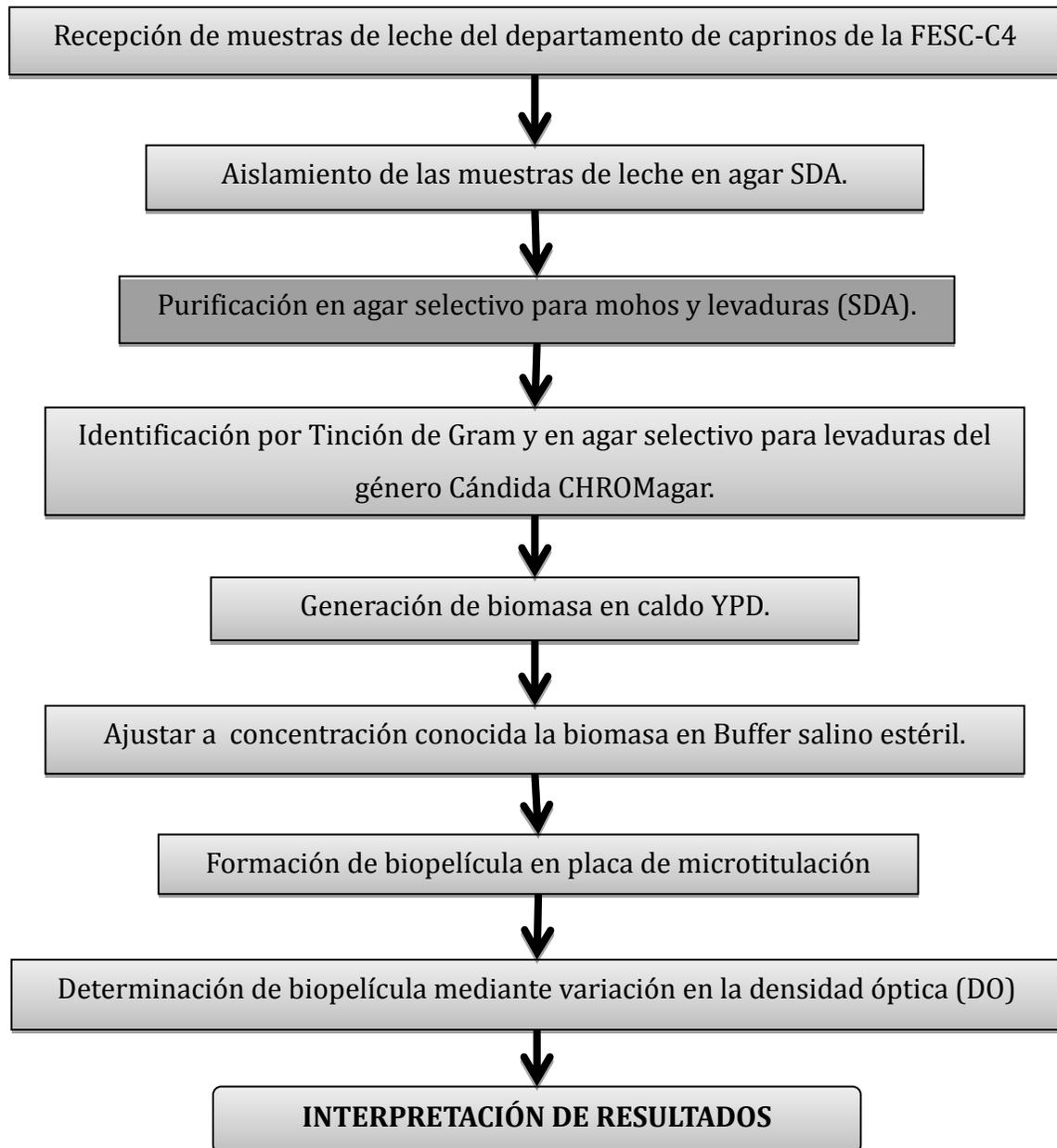


Fig. 6 Diagrama general de experimentación para la determinación de biopelícula.

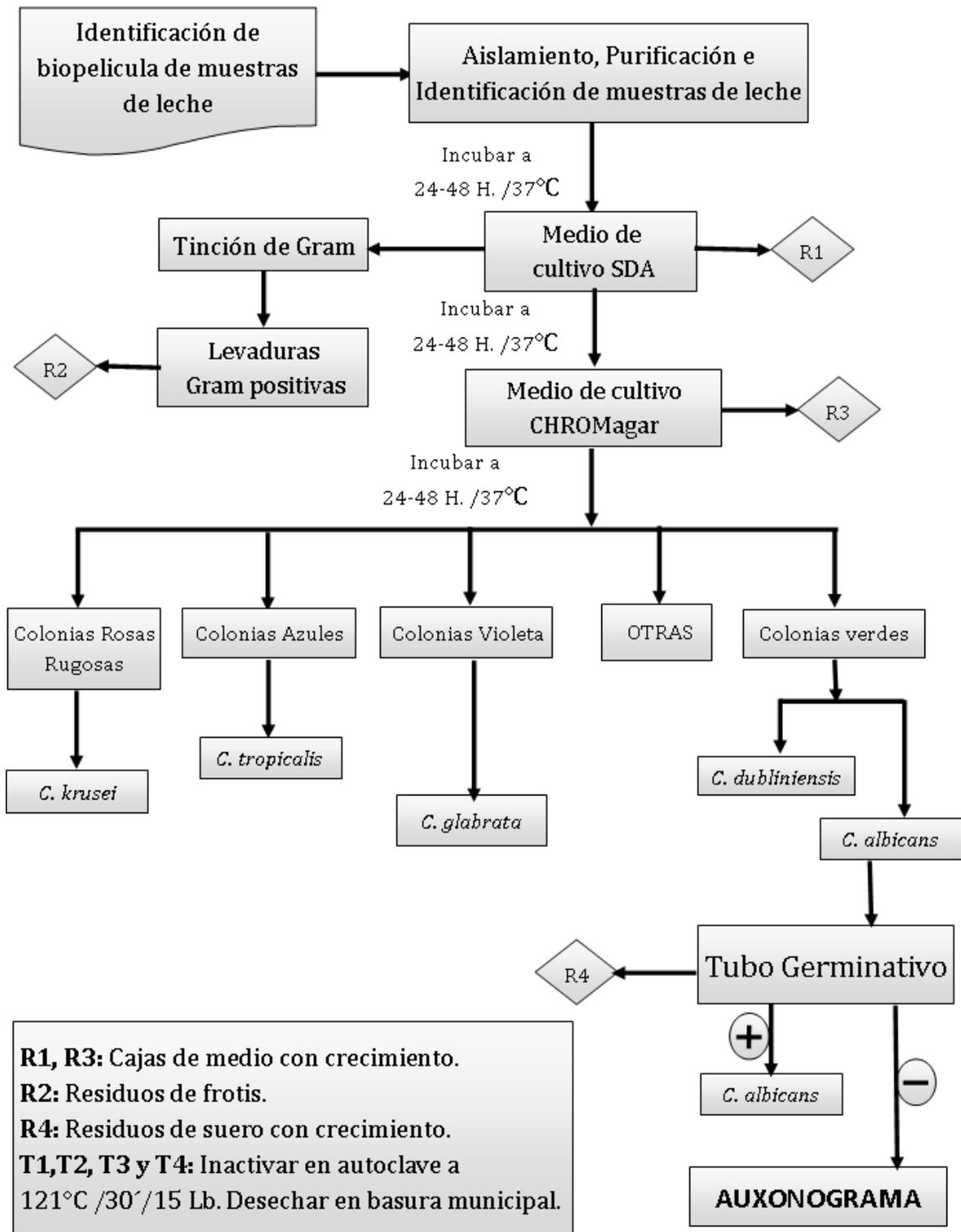


Fig. 7 Diagrama de identificación microbiológica de muestras de leche.

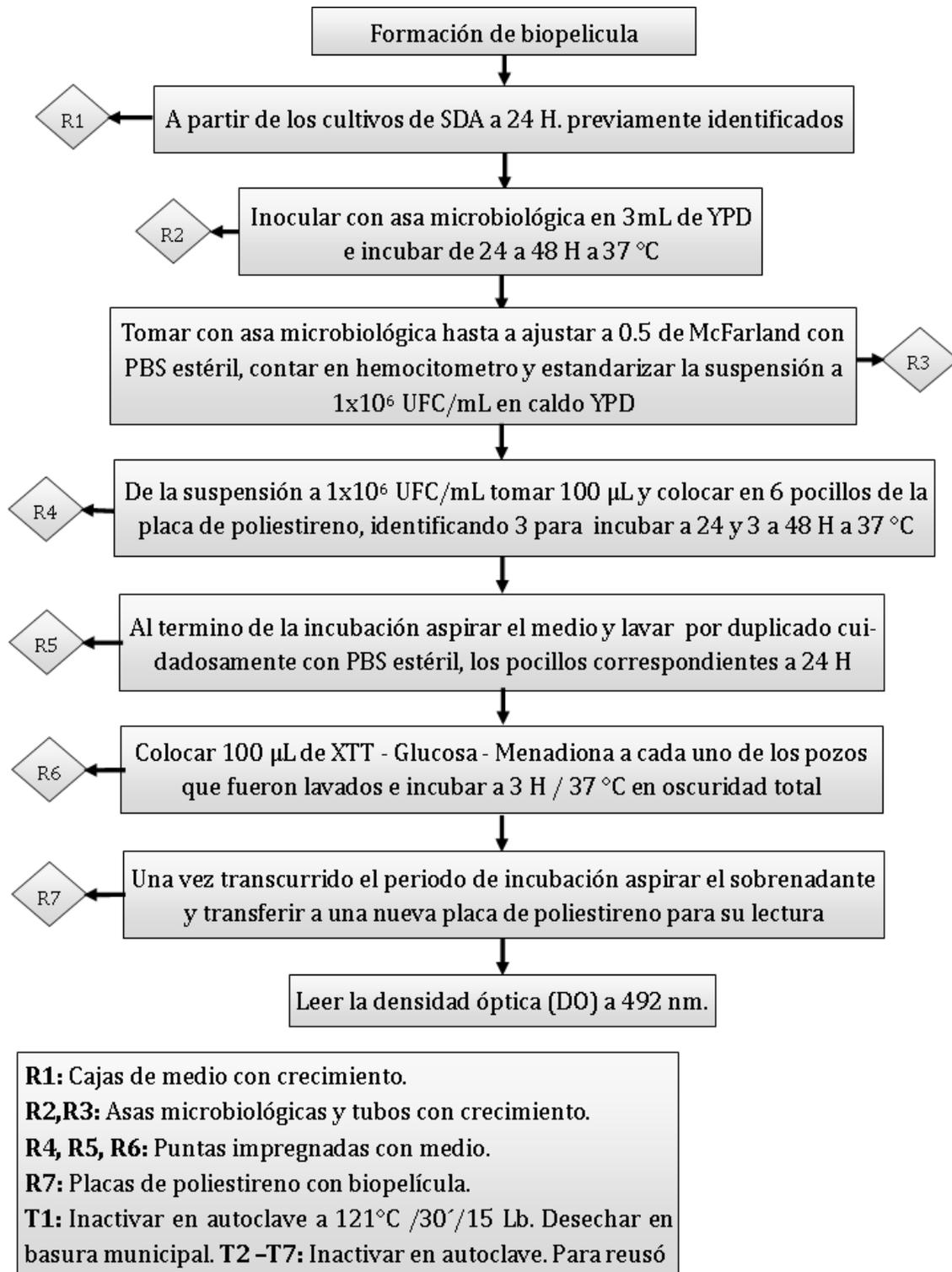


Fig. 8 Determinación en la formación de biopelículas, mediante la reducción metabólica del XTT.

7. MATERIAL Y MÉTODOS.

A) MUESTRAS.

MUESTRAS PROBLEMA: Se analizaron 57 muestras, obtenidas de leche de cabras clínicamente sanas, proporcionadas por el departamento de caprinos de la FESC – C4. Considerando para su control de proceso (fecha y número de recepción, código interno e Identificación), las cuales fueron obtenidas al momento de la ordeña.

CEPA DE REFERENCIA: *Candida albicans* (ATCC® 32354™), control positivo para formación de biopelículas.

B) AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS.

Una vez recibidas las muestras lácteas fueron analizadas microbiológicamente, tomando un inóculo con asa calibrada y sembradas por dilución en agar SDA®BD Bioxon, [para aislar las levaduras presentes] ; Posteriormente considerando sus características macroscópicas coloniales se tomaron inóculos característicos de levaduras, resembrando nuevamente en agar SDA®BD Bioxon para su purificación. Las levaduras fueron identificadas mediante criterios microscópicos como la tinción de Gram, morfología celular. Para la identificación confirmatoria de especies *Candida* se utilizó el medio cromogénico de CHROMagar en el cual fueron inoculadas cada una de las muestras por dilución para que en función a los sustratos cromogénicos se realizara su caracterización de especies, se utilizó el tubo germinativo para corroborar la autenticidad de *Candida albicans* (ATCC® 32354™), para su utilización como control positivo (+), (ANEXO 1). Las condiciones de incubación para cada proceso de sembrado fueron de 24 – 48 H. 37 °C. (Koneman, 2007) (Peman, 2007)

C) PREPARACION DE LA SUSPENSIÓN CELULAR PARA LA DETERMINACIÓN.

Las cepas se mantuvieron en agar SDA [®]BD Bioxon y una vez purificadas e identificadas, cada una de ellas se inoculo por medio de una asa microbiológica en un tubo de ensaye, conteniendo este ultimo, 3 mL de extracto de levadura y dextrosa (YPD), incubándolo durante 24 H a 37 °C.

A partir del crecimiento desarrollado se preparó una suspensión ajustando a una concentración de 1×10^6 UFC/ml en un tubo con Buffer de fosfato salino estéril a pH 7.4 (PBS, [®]Sigma-Aldrich), empleando como referencia el estándar de Mcfarland, corroborando manualmente mediante conteo celular en hemocitometro (ANEXO 3) con la suspensión de levaduras en medio YPD previamente incubadas; se tomó una alícuota del estándar de Mcfarland preparado con las levaduras y se llevó a volumen final de 3 mL, en caldo YPD. Debido a que las células tienden a adherirse o bien sedimentarse se utilizó el vórtex antes de inocular las placas de microtitulación para la determinación. (Silva 2008) (Ibarra, 2012) (Bastidas, 2014)

D) DETERMINACIÓN DE BIOPELÍCULAS.

A partir de la suspensión de cada una de las muestras ya ajustadas a la concentración de 1×10^6 , se tomaron 100 μ L de esta y se añadió a 6 pocillos de la placa para ELISA de poliestireno estéril de fondo plano, identificando 3 pocillos para 24H y 3 para 48H, las placas se incubaron durante 24, 48 H a 37 °C, al término del primer periodo de incubación se lavaron los pocillos correspondientes a 24 H con PBS estéril a pH 7.4, para retirar las células que no logaron adherirse a la superficie, realizando de igual forma al termino del siguiente periodo de incubación correspondiente a 48 H. (Silva 2008) (Ibarra, 2012)

El control positivo (+) (*Candida albicans* (ATCC[®] 32354[™])), de igual forma que las muestras problema, se añadió por duplicado en la placa para ELISA, realizando 3

repeticiones, a las mismas condiciones de incubación y análisis para su determinación, lavando los pocillos correspondientes a los periodos de incubación con PBS estéril a pH 7.4, como control negativo (-), para descartar cualquier error producido debido a la oxidación del XTT durante su manipulación, donde las levaduras no sean responsables de su metabolización, se agregó el medio de YPD estéril, bajo las mismas características de distribución en la placa y condiciones de incubación así como análisis, lavando los pocillos correspondientes a los periodos como en las muestras problema y control positivo (+), de esta forma el control (-) se utilizó para el tratamiento matemático, restando dichas lecturas a las lecturas obtenidas por las muestras problema y control positivo (+), eliminando errores medio ambientales durante la experimentación, por exposición a la luz del XTT.

Para la determinación de biopelícula se realiza mediante el ensayo de reducción de sales de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5- [(fenilamina) carbonilo]-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT, ®Sigma-Aldrich), se preparó una solución de XTT en PBS-Dextrosa (0.5 g/L), que posteriormente se filtró a través de un filtro de 0.22 µm y almacenó en alícuotas a las condiciones de congelación de -70 °C. Antes de cada ensayo, se descongeló una alícuota de XTT y se le agregó Menadiona 10mM en acetona ®Sigma-Aldrich (Silva, 2008). A cada uno de los pocillos de la placa con las biopelículas acondicionadas, se adicionaron con 100 µL de la solución de XTT-Menadiona (ANEXO 2) medir la densidad óptica (DO) de cada preparación realizando la lectura a 492 nm. (Silva 2008) (Ibarra, 2012)

Con la finalidad de cubrir totalmente las placas para asegurar oscuridad total durante las 3 horas de incubación, utilizando papel aluminio para cubrir las placas, al término se retiró el sobrenadante colocándolo en una nueva placa de poliestireno de fondo plano para su lectura en espectrofotómetro (Stat Fax 3200), posteriormente se registraron los resultados (ANEXO 4). (Ramage, 2001) (Silva 2008) (Ibarra, 2012)

8. RESULTADOS.

Se analizaron 57 muestras obtenidas de leche de cabras clínicamente sanas, que fueron identificadas como *Candida glabrata*, se compararon con una cepa de *Candida albicans* (ATCC® 32354™) la cual fue utilizada como control positivo (+) para la formación de biopelículas, las muestras fueron recibidas en diferentes fechas (ANEXO 1), en su totalidad se logró el aislamiento e identificación de *Candida*.

La determinación en la capacidad de formación de biopelícula de cada una de las muestras se realizó mediante el ensayo de reducción con XTT, en primera instancia se realizó a 8 muestras problema y utilizando únicamente el control negativo (-) para eliminar interferencias medio ambientales, tomando en cuenta periodos de 24, 48 y 72 horas, para determinar que fueron capaces de formar biopelícula, no se utilizó referencia experimental para comparar si existe dicha capacidad, únicamente nos basamos en los parámetros considerados por Castrillón, 2005 (Gráfico 1).

Cada una de las muestras se agrupo para realizar la determinación en corridas y se identificaron mediante la leyenda C1 y subsecuentes, debajo de las barras en cada grafico se encuentran numeradas las muestras por consecutivo, el cual se identifica como el número de control para cada una de las muestras, en cada corrida determinada (ANEXO 4).

Como se aprecia en el Gráfico1, la tendencia en las lecturas mostradas, las lecturas a 48 y 72 horas son muy semejantes y no representan una variación significativa para determinar si no son capaces de formar biopelículas, de esta forma estamos considerando las 48 horas de lectura como el tiempo máximo para estimar si existe formación de dicha biopelícula.

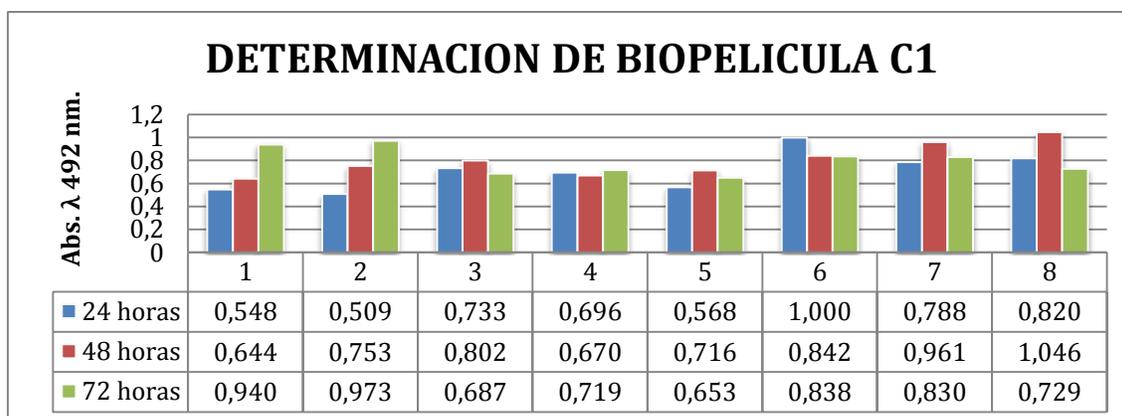


Gráfico 1. Densidad óptica (DO) de corrida No. 1 (C1) en la determinación de biopelículas a 24, 48 y 72 horas de incubación.

Basados en los resultados de la Corrida 1, únicamente se tomaron en cuenta las lecturas a 24 y 48 horas, recordando que la formación de biopelículas se manifiesta en tres fases: temprana (0 a 11 horas), intermedia (12 a 30 horas), y madura (38 a 72 horas) (Castrillón, 2005), por esto podemos considerar las primeras 24 horas para establecer si una lectura pudiera determinar si existe dicha formación y hasta las 48 horas lograr establecer finalmente si existe dicha capacidad y entonces poder clasificarla dentro de los parámetros que establecimos en la escala de formación consideradas por Castrillón, 2005 (Fig. 9).

Si observamos el Gráfico 2; encontramos que la tendencia entre las dos lecturas (24 y 48 horas) obtenidas de las muestras analizadas revela que existe una marcada diferencia en la tendencia de formación en cada una de ellas, es decir, es ascendente aunque no constante, cabe mencionar que esta tendencia también se presenta en el control positivo (+).

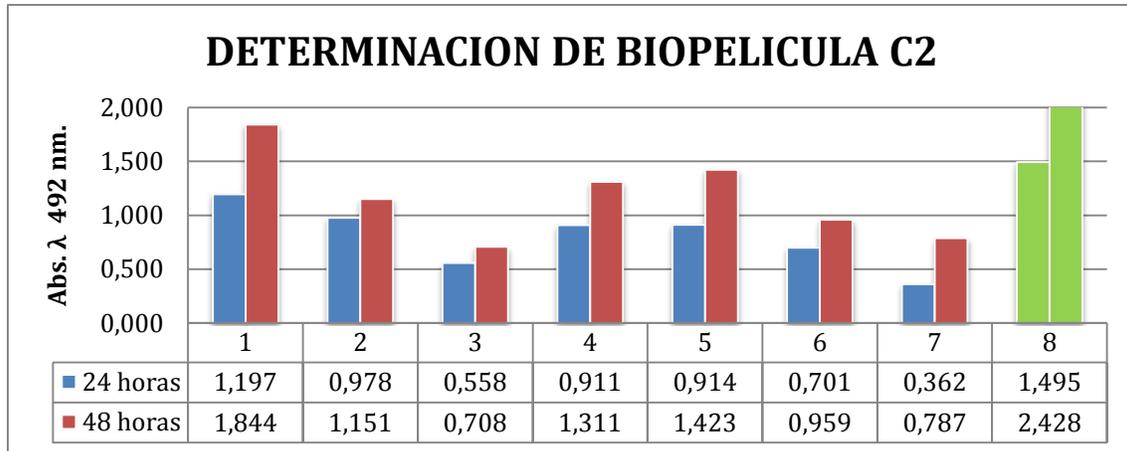


Gráfico 2. Densidad óptica (DO) de corrida No. 2 (C2) en la determinación de biopelículas a 24 y 48 horas de incubación.

Durante la Corrida 3, logramos observar el mismo patrón en las lecturas, ascendente, aunque se reproceso la muestra numero 3 debido a que la lectura que mostro fue aún menor al control negativo (-), cabe mencionar que las lecturas del control positivo (+) quedaron por debajo de algunas muestras.

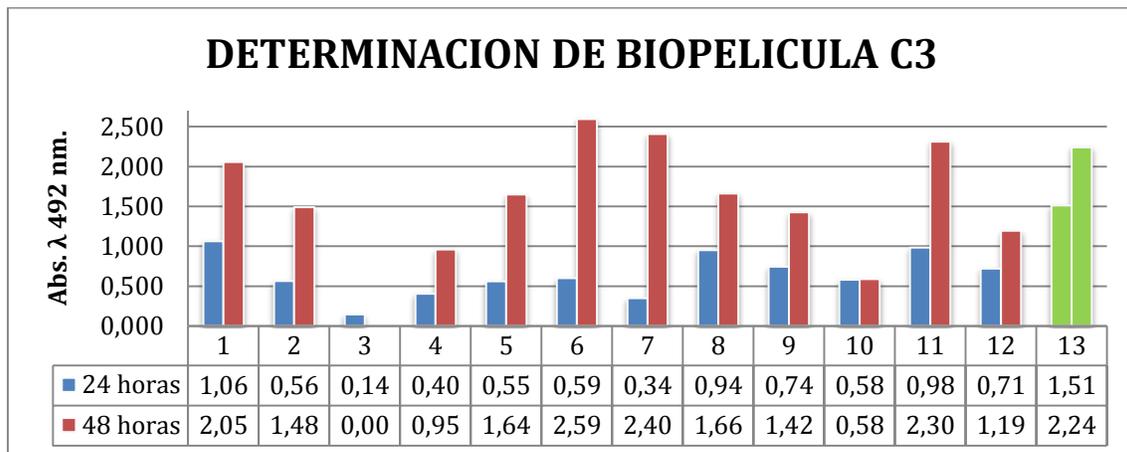


Gráfico 3. Densidad óptica (DO) de corrida No. 3 (C3) en la determinación de biopelículas a 24 y 48 horas de incubación.

Posteriormente en la Corrida 4 cerca de la mitad de las muestras mostraron la misma ascendencia, aunque solo las muestras No. 6, 7, 11 mostraron lecturas mayores al control positivo (+), encontramos que estas muestras presentaron una ascendencia mucho mayor que las corridas anteriores, además, la muestra No. 15 determino formar biopelícula de forma atípica, es decir no muestra ascendencia en las lecturas o bien la lectura a 48 horas fue menor a la de 24 lo cual indica un comportamiento distinto al resto de las determinaciones, no obstante las muestras No. 4, 5, 7, 14 no fueron capaces de formar biopelícula.

En el Grafico 5 se observa se repite una mayor ascendencia de lectura en 8 de las muestras, y encontramos que la muestra 15 se comportó como un formador atípico, ya que desarrollo biopelícula, pero se mantiene en la escala de formación como baja capacidad de formación de biopelículas, aunque a diferencia al encontrado en la Corrida 4, este no presento ningún cambio a lo largo de las dos lecturas a 24 y 48 horas, nuevamente una de las muestras identificada como la No 14, no fue capaz de generar biopelícula siendo que a las 24 horas ya presentaba crecimiento.

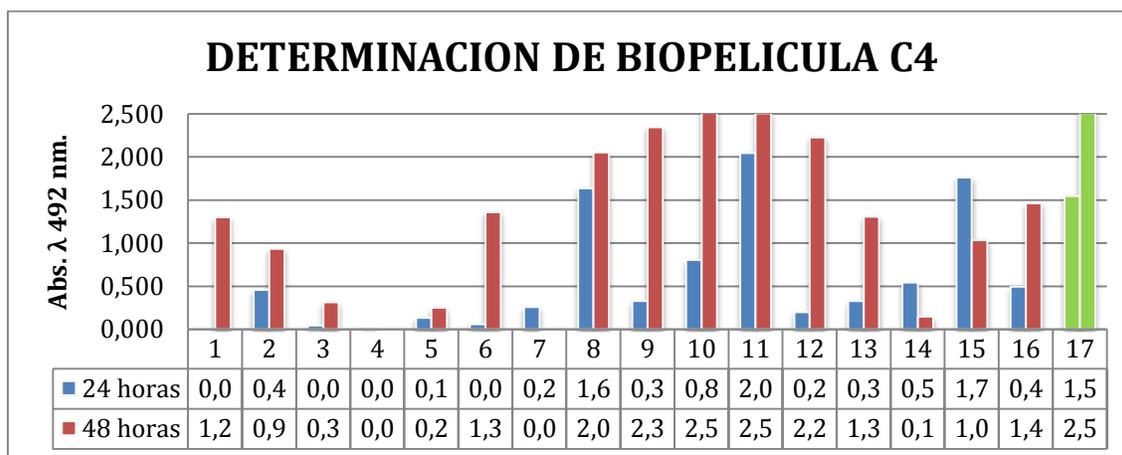


Gráfico 4. Densidad óptica (DO) de corrida no. 4 (C4) en la determinación de biopelículas a 24 y 48 horas de incubación.

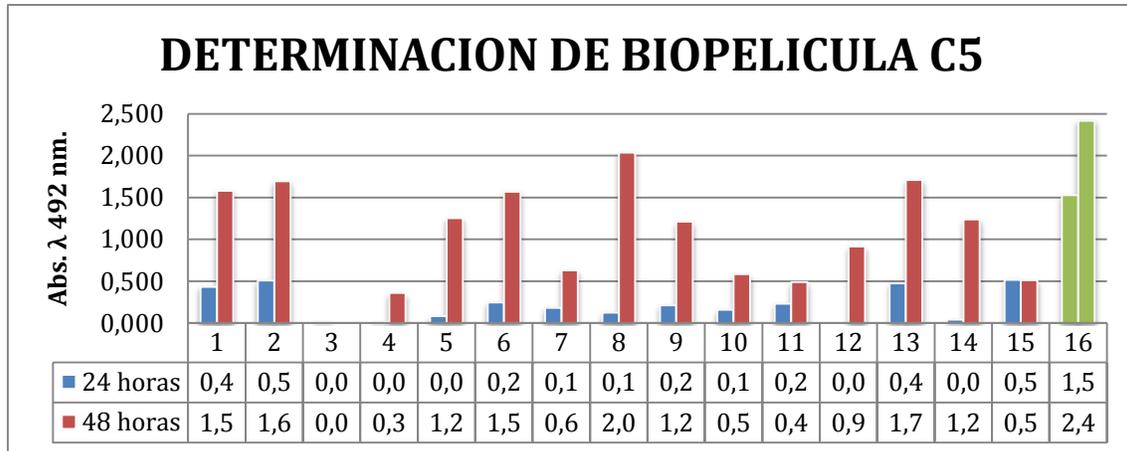


Gráfico 5. Densidad óptica (DO) de corrida no. 5 (C5) en la determinación de biopelículas a 24 y 48 horas de incubación.

En la investigación propuesta por Valentín & Cantón, 2007, en su investigación trabajaron con *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, quienes asignan los valores a todas aquellas muestras que tuvieran valores ≥ 0.200 (DO), son consideradas positivas a la producción de biopelículas; es necesario considerar que, entre especies pueden existir diferencias en la capacidad para el desarrollo de biopelícula, además es importante considerar que todos los aislamientos se identifica *Candida glabrata*, a las que Valentín & Cantón, 2007 utilizaron en su estudio, hasta este momento no existe algún registro sobre parámetros asignados para establecer un grado o rango que represente dicha formación, es por esto que decidimos generar una escala de formación para nuestro estudio basados en las lecturas obtenidas durante los ensayos, lo cual permitió generar la siguiente (Fig. 9).

- NO FORMADORAS 0.0 a 0.2 (DO)
- BAJAS FORMADORAS 0.21 a 1.0 (DO)
- MEDIA FORMACIÓN 1.1 a 1.7 (DO)
- ALTA FORMACIÓN > 1.7 (DO)

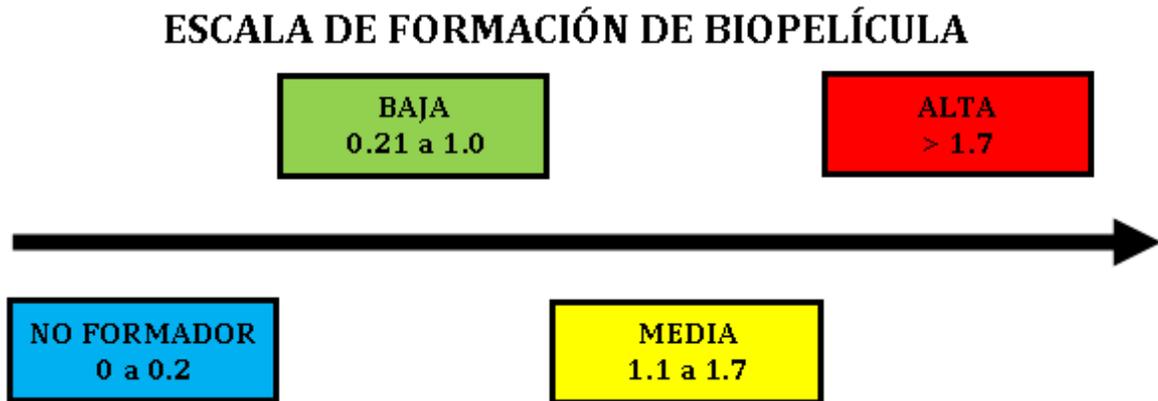


Fig. 9 Escala de formación de Biopelícula.

Se generaron una par de gráficas para representar la distribución de las muestras según la capacidad de formación a 24 horas posteriores de su incubación y uno más a 48 horas (Gráfico 6 y 7), con el fin de comparar la capacidad de formación de biopelícula respecto al tiempo de incubación, de esta manera se logró observar como el tiempo de incubación es un factor importante para el desarrollo de la misma biopelícula, aunque no determinante para llegar a su desarrollo y madurez.

Como se observa en el Gráfico 6, a las 24 horas 18 Muestras no fueron capaces de formar biopelícula, representando un 32% de la población total, 39 muestras capaces de formación distribuidas entre: 33 con baja formación (58%) de la población, 4 con media formación (7%) y 2 con alta capacidad de formación, (3%) de la población general estudiada, hasta las 24 horas de lectura.

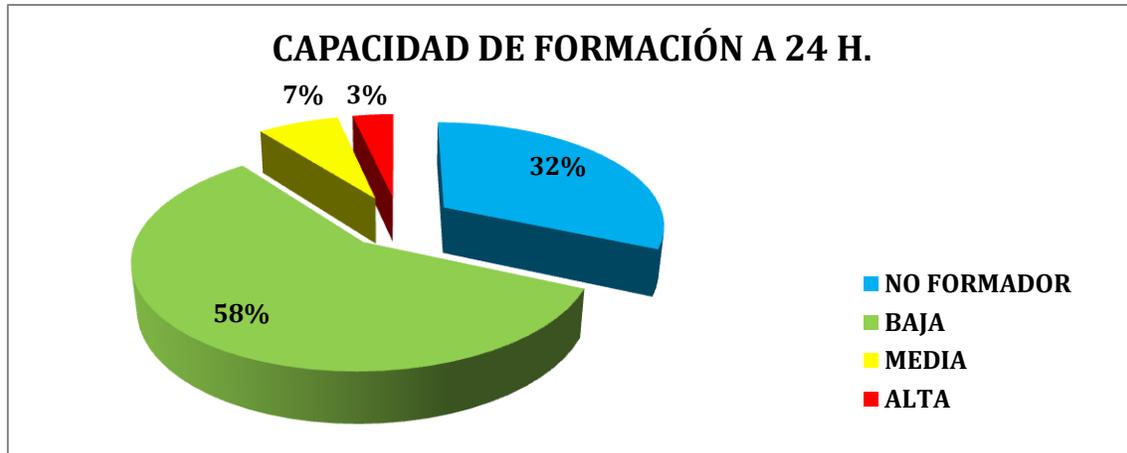


Gráfico 6. Distribución de muestras según su capacidad de formación de biopelícula a 24 horas de incubación.

En el Gráfico 7, 5 Muestras no fueron capaces de formar biopelícula, representando el 9% de la población total, 52 muestras (91%) capaces de formación distribuidas entre: 20 con baja formación (35%) de la población, 20 con media formación, (35%) y 12 con alta capacidad de formación (21%) de la población en general estudiada, hasta las 48 horas de lectura.

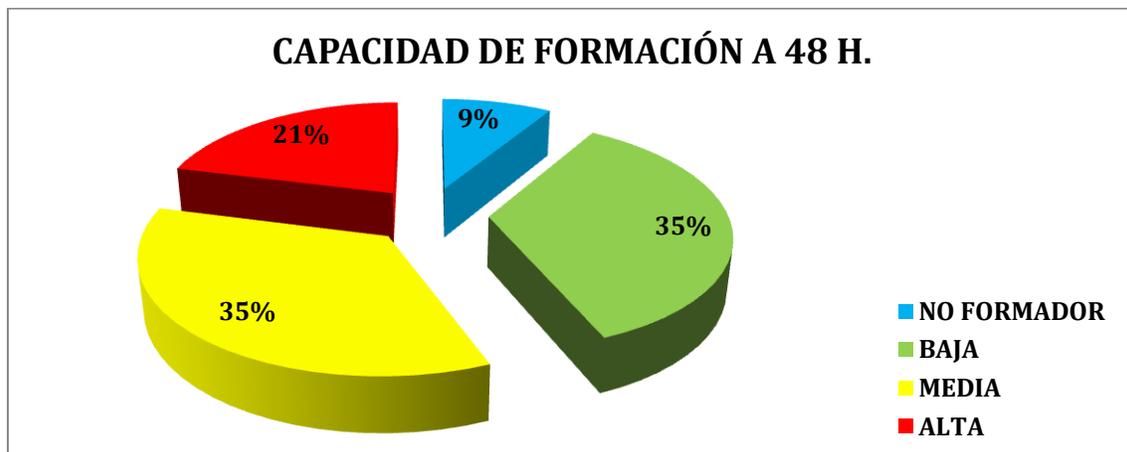


Gráfico 7. Distribución de muestras según su capacidad de formación de biopelícula a 48 horas de incubación.

9. DISCUSIÓN.

Las especies de *Candida* se reconocen como los principales agentes de infecciones adquiridas en el hospital. Son el tercer o cuarto patógeno aislado de sangre que sobrepasa la frecuencia de los bacilos Gram negativos. Su aparición como patógeno nosocomial es importante, ya que es un factor de riesgo asociado con los procedimientos médicos modernos, casi siempre, los dispositivos, como catéteres intravasculares o urinarios y tubos endotraqueales, se asocian con infecciones y se detecta la formación de biopelículas en su superficie. Otros dispositivos como válvulas cardiacas, marcapaso y remplazos de articulaciones, son susceptibles de infecciones por *Candida*, generalmente durante el periodo de colocación. (Castrillón, 2005)

Las especies del genero *Candida* tienen mayor capacidad para formar biopelículas en una gama de diversos sitios anatómicos, de ahí la razón más importante para su estudio y nuestra incapacidad para diagnosticar la presencia de biopelículas, lo que provoca altas tasas de morbilidad y mortalidad (Castrillón, 2010) (Ramage, 2005).

Existe una gran cantidad de técnicas que evalúan la actividad *in vitro* para la capacidad de formación de biopelículas, para el estudio realizado sobre los aislamientos de las muestras de leche de cabra, hemos sustituido reactivos y equipo respecto al ensayo propuesto por Ramage, (2001), es un método utilizado para discriminar entre células vivas y muertas, muy eficaz y reproducible, el cual utiliza microplacas de poliestireno estériles para generar la formación de biopelículas, la técnica se basa en la actividad metabólica de las células viables, mediante la reducción del colorante XTT a una forma soluble en agua, el XTT que se convierte, por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas, en un producto de color naranja soluble en agua que puede ser medido espectrofotométricamente (Valentine. 2007), la absorbancia del sobrenadante de las células es proporcional al número de células metabólicamente activas.

Podemos decir que el 91% de las muestras identificadas como *C. glabrata*, demostró tener la capacidad de formación de biopelículas sobre las placas de microtitulación, donde además de evaluar la viabilidad a las 24 y 48 horas de lectura, logramos determinar que a las 48 horas es el tiempo óptimo de lectura para evaluar la viabilidad de la biopelícula madura, ya que no existe variación significativa a las 72 horas, lo cual permitió disminuir el tiempo en la determinación de formación de biopelículas. Al comparar las diferentes lecturas de todas las muestras se puede apreciar que la mayoría corresponden a baja y media capacidad de formación, solo 5 muestras no fueron capaces de formar biopelícula, mientras que 12 muestras mostraron ser de alta capacidad de formación.

La capacidad de formación puede estar asociada a su grado de patogenicidad es decir a la capacidad para causar daño, debido a que la formación de biopelículas que han sido reportados causales de mastitis clínica debido a la gran adaptación conferida a diferentes hábitats por la formación de comunidades microbianas unidas a superficies conocida como biopelículas.

Los servicios de sanidad animal y los nuevos retos que éstos enfrentan en el marco del comercio internacional, nos obliga a pensar en, si las actividades realizadas desde los productores regionales en función a la explotación de recursos como es la ordeña de leche de cabras para la comercialización directa del recurso lácteo como materia prima o bien para la elaboración de productos derivados de este mismo, son las adecuadas para prevenir y controlar las enfermedades, mitigando el impacto económico en los sectores productivos.

Las plantas lactológicas modernas disponen de equipos sanitarios muy funcionales que extraen leche para la fabricación de subproductos mediante operaciones integradas, Básicamente la leche cruda es bombeada para ser almacenada en tanques para posteriormente ser procesada, por lo tanto la calidad del producto únicamente puede mantenerse cumpliendo las muy exigentes condiciones de higiene, desafortunadamente el mantener un alto estándar de calidad puede incrementar los

costos de producción, aunque si bien es sabido la implementación de programas operativos de saneamiento (POE'S) como parte de las buenas prácticas de higiene para otorgar un alto nivel de calidad no requiere de grandes maquinas operarias, estas pueden cuidarse con lo mínimo indispensable en cuanto a sanidad e higiene se refiere, el controlar aspectos básicos en las instalaciones como: ventilación para eliminar la humedad liberada durante el proceso; filtraciones de aire innecesaria durante el proceso que arrastra *Bacillus* spp. Hongos, levaduras y micrococos, por mencionar algunos, las paredes y techos deben cubrirse con materiales fáciles de limpiar, drenaje suficiente y fácil de limpiar así como el cuidar aspectos como líneas de producción asépticas; existen diversas medidas para disminuir la posibilidad de contaminaciones cruzadas desde la ordeña hasta el último punto del proceso. (Robinson, 1987)

10. CONCLUSIONES.

Se logró determinar la formación de biopelículas a partir de aislamientos de muestras de leche de cabras clínicamente sanas, mediante la estandarización del ensayo colorimétrico modificado, descrito por Ramage, (2001) con XTT, para evaluar la actividad metabólica, es decir, la capacidad reductora sobre este compuesto.

Las levaduras utilizadas fueron aislados de muestras de leche de cabra y fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas, donde el total de las muestras que se identificaron dieron como resultado ser *Candida glabrata*. Dichos aislamientos que presentaron la capacidad de formación de biopelículas fueron 52 de 57 muestras, con variaciones en su capacidad de formación, lo cual permitió establecer una escala de formación para clasificarlas según dicha característica, las muestras capaces de producir biopelículas se encontraron distribuidas de la siguiente manera: 20 con baja capacidad de formación (35%), 20 con media capacidad de formación (35%) y 12 con alta capacidad de formación (21%) de la población en general estudiada, lo que representa el 91% del total de las muestras analizadas que presentaron esta capacidad.

Podemos decir que los resultados permitieron establecer diferencias en la capacidad de formación de biopelículas, lo que nos abre las puertas para que a partir de estas se determina la expresión de genes involucrados en todo el proceso, de esta manera se podrá explicar el por qué, si las muestras analizadas corresponden a un mismo género y especie, procedente del mismo tipo de muestra (leche de cabra) y analizadas bajo las mismas condiciones de trabajo, no todas mostraron ser capaces de formar biopelícula, incluso con la misma capacidad de reducción generando las lecturas sobre la actividad metabólica.

11. PERSPECTIVAS DE TRABAJO.

Una de las mayores aportaciones del presente trabajo radica en reiterar que no se tienen registros científicos sobre los estudios en cuanto al grado de daño a nivel veterinario sobre las repercusiones a nivel económico en sectores productivo a causa de este factor de virulencia provocado por microorganismos comunes presentes en la leche como lo son las levaduras como *C. glabrata*, y en el futuro se espera esclarecer la importancia de ciertos genes de importancia en la génesis de las biopelículas que puedan explicar el comportamiento tan diverso en las lecturas obtenidas.

12. BIBLIOGRAFÍA.

1. Arenas R, (2011) Micología médica ilustrada 4ª Ed; México: Mc Graw Hill p. 417.
2. Bastidas, O. Google. Recuperado el 23 de Enero de 2014, de <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
3. Bonifaz A. (2010) Micología Médica, México: Mc Graw Hill. P. 583.
4. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S. (2008) Microbiología médica de Jawets, Melnick & Adalberg. 19ª Ed; Manual Moderno p. 828
5. Calderone R (2002) *Candida* and Candidiasis. ESM Press. Washington, D.C
6. Castañón L. (2012) *Candidiasis o Candidosis*, laboratorio de Micología Medica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, recuperado el día 10 de abril del 2013.
7. Castrillón L, Palma A, Padilla C. (2005) Factores de virulencia en *Candida sp.* Revista Mexicana de Dermatología. 49: 12-27.
8. Castrillón L, Palma A, Padilla C. (2010) Factores de virulencia en *Candida sp.* Revista Mexicana de Dermatología. 54(1): 14-24.
9. Chavarría F (2002) Fundamentos de epidemiología el arte detectivesco de la investigación epidemiológica; Costa Rica; Editorial Universidad Estatal a Distancia. p.p. 72,73.
10. Dexter H. (2003) Pathogenic Fungi in Humans and Animals. 2ª Ed; United States of America; DEKKER. p.p. 515-516.
11. Diccionario de la lengua española (*DRAE*) (2001) (22.ª Edición), Real Academia Española.
12. Douglas J. (2002) Medical importance of biofilms in *Candida* infections. Revista Iberoamericana de Micología. 19:139-143.
13. Doyle M, Beuchat L, Montville T. (2001) Microbiología de los Alimentos Fundamentos y Fronteras. España; Editorial ACRIBIA, S. A. p.p 116.

14. Elke Peters, Hans J Neils, (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*. 72, 157-165.
15. Fraizer W, Westhoff D. (1993) Microbiología de los alimentos. 4ª Ed; España; Editorial ACRIBIA, S. A. p.p. 681
16. Franca E, Andrade C, Furantelo L, & Serpa R, (2011) Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies produced by phenotypic swithing of clinical strain of *Candida tropicalis* and biofilm formation by variant phentypes. *Micron*, 42,726-732.
17. García V. (2005) Introducción a la Microbiología. España; Editorial EUDET. p.p 108-113.
18. Guízar P, Bedolla I. (2008) Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, mediante la prueba de California. 10: 1-34.
19. Ibarra C, Villar M, Gaitán M. (2012) Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. Revista Iberoamericana de Micología. 29(4): 214 - 222.
20. ICMSF (International Comission on Microbiological Specifications for Foods). (1998) Microorganismos de los Alimentos Ecología microbiana de los productos alimenticios. 6ª Ed; España; Editorial ACRIBIA, S. A. p.p. 499-509
21. Jay J, Loessner M, Golden D. Microbiologia Moderna de los Alimentos. 5ª Ed; España; Editorial ACRIBIA, S. A. p.p 30.
22. Koneman E, Allen S, Janda W. (2003) Diagnostico microbiológico texto y atlas a color. 5ª Ed; Argentina; Editorial Médica Panamericana. p. 1432
23. Madigan M, Martinko J, Parker J. (2004) Biología de los Microorganismos. 10ª Ed; España: Pearson Prentice Hall. p. 1011.
24. Pemán, J., Cantón, E., & Valentín, A. , (2008). Actividad de la anidulafungina sobre Biopelículas de Candida. REVISTA IBEROAMERICANA DE MICOLOGÍA. 25, pp.124-128.
25. Prescott L, Harley J, Klein D, (2004) Microbiología .5ª Ed; Madrid: Mc Graw Hill p. 1240

26. Ramage G. & Craig Williams. (2013) The Clinical Importance of Fungal Biofilms. *Advance in Applied Microbiology*. 84:27-83.
27. Ramage G. & Saville S. (2005) *Candida* Biofilms: an Update. *American Society for Microbiology*. 4(4):633-638.
28. Ramage G. & Vande Walle K. (2001) Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 18:163-170.
29. Ray B, Bhunia A. (2010) *Fundamentos de Microbiología de los Alimentos*. 4ª Ed; México; Mc Graw Hill. p. 352
30. Regueiro J, López C. (2011) *Inmunología Biología y Patología del sistema inmune*. 4ª Ed; Argentina; Editorial Médica Panamericana. p. 260.
31. Robinson R. (1987) *Microbiología lactológica*. España; Editorial ACRIBIA, S. A. p.p. 255-259.
32. Ruiz R, Cervantes A, Ducoing A. (2013) Principales géneros bacterianos aislados de leche de cabra en dos granjas del municipio de Tequisquiapan, Querétaro, México. *Revista Mexicana de ciencias pecuarias*. 4(1).
33. Schaechter, M Medoff G, Eisenstein B, Guerra H. (1994) *Microbiología Mecanismos de las enfermedades infecciosas Enfoque mediante resolución de problemas*. 2ª Ed; Argentina; Editorial Médica Panamericana. p.p. 595-618.
34. Seker E, Ozenç E. (2011) *In vitro* biofilm activity of *Candida* species isolated from Anatolian buffaloes with mastitis Western Turkey. *Veterinarski Arhiv*. 81(6):723-730.
35. Silva J, Seneviratne J, Prarahitiyawa N (2008) Improvement of XTT Assay Performance for Studies Involving *Candida albicans* Biofilms. *Brazil Denistry J*. 19,(4) 364-369.
36. Valentín A, & Cotón, E, (2007) Actividad in vitro de la anfotericina B y la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24,272-277.
37. Zaragoza C, Cervantes R, Ducoing A, De la Peña A, Villa L. (2011) Yests isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Revista Iberoamericana de Micología*. 28(2):79-82

V. ANEXOS

ANEXO 1. IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE PROCESO DE MUESTRAS.

FECHA Y NUMERO DE RECEPCIÓN		CÓDIGO INTERNO	IDENTIFICACIÓN
02/03/12	1	110	<i>C. glabrata</i>
	2	120	<i>C. glabrata</i>
	3	130	<i>C. glabrata</i>
	4	140	<i>C. glabrata</i>
	5	150	<i>C. glabrata</i>
	7	170	<i>C. glabrata</i>
	8	180	<i>C. glabrata</i>
	9	190	<i>C. glabrata</i>
	10	111	<i>C. glabrata</i>
	18/03/12	3	230
5		250	<i>C. glabrata</i>
8		280	<i>C. glabrata</i>
11		211	<i>C. glabrata</i>
19		219	<i>C. glabrata</i>
19/03/12	4	340	<i>C. glabrata</i>
	8	380	<i>C. glabrata</i>
	16	316	<i>C. glabrata</i>
	17	317	<i>C. glabrata</i>
	18	318	<i>C. glabrata</i>
	20	320	<i>C. glabrata</i>
21/03/12	4	440	<i>C. glabrata</i>
	9	490	<i>C. glabrata</i>
	15	415	<i>C. glabrata</i>
23/03/12	4	540	<i>C. glabrata</i>
	13	513	<i>C. glabrata</i>
	14	514	<i>C. glabrata</i>

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELICULAS DE *Candida glabrata*
AISLADAS A PARTIR DE LECHE DE CABRAS CLINICAMENTE SANAS

18/04/12	2	620	<i>C. glabrata</i>
	3	630	<i>C. glabrata</i>
	6	660	<i>C. glabrata</i>
	7	670	<i>C. glabrata</i>
	10	610	<i>C. glabrata</i>
	12	612	<i>C. glabrata</i>
	14	614	<i>C. glabrata</i>
	15	615	<i>C. glabrata</i>
	16	616	<i>C. glabrata</i>
	18	618	<i>C. glabrata</i>
	24	624	<i>C. glabrata</i>
19/04/12	1	710	<i>C. glabrata</i>
	4	740	<i>C. glabrata</i>
	6	760	<i>C. glabrata</i>
	7	770	<i>C. glabrata</i>
	8	780	<i>C. glabrata</i>
	11	711	<i>C. glabrata</i>
	12	712	<i>C. glabrata</i>
	13	713	<i>C. glabrata</i>
	14	714	<i>C. glabrata</i>
	15	715	<i>C. glabrata</i>
	16	716	<i>C. glabrata</i>
	17	717	<i>C. glabrata</i>
	18	718	<i>C. glabrata</i>
	19	719	<i>C. glabrata</i>
	21	721	<i>C. glabrata</i>
28	728	<i>C. glabrata</i>	
23/04/12	1	810	<i>C. glabrata</i>
	2	820	<i>C. glabrata</i>
	4	840	<i>C. glabrata</i>
	5	850	<i>C. glabrata</i>
TOTAL DE MUESTRAS PROCESADAS:			57

ANEXO 2. CALCULO DE REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS PARA LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS.

I. Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) ®BDBioxon.

II. Caldo Dextrosa Sabouraud (SDA) ®BDBioxon.

FORMULA PARA 1 L DE AGUA DESTILADA.	
Dextrosa ®BDBioxon.	40.0 g
Peptona de carne ®BDBioxon	5.0 g
Peptona de caseína ®BDBioxon.	5.0 g
pH	5.6 ± 0.2

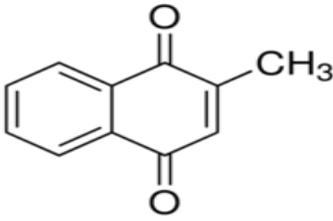
III. Caldo Extracto de levadura y Dextrosa (YPD) ®BDBioxon.

FORMULA PARA 1 L DE AGUA DESTILADA.	
Yeast Extract ®DIFCO.	10.0 g
Pepton Bacteriological Tecnical ®DIFCO.	20 g
Dextrosa ®BDBioxon.	20 g
pH	7.4 ± 0.2

IV. BD Sabouraud GC Agar / CHROMagar Candida Medium (Biplate).

FORMULA PARA 1 L DE AGUA DESTILADA.	
Cromopeptona	10 g
Mezcla Cromogenica	2.0 g
Cloranfenicol	0.5 g
pH	6.0 ± 0.3

V. Menadiona ®Sigma-Aldrich.

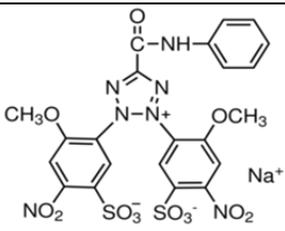
Sinónimo.	2 - Methyl - 1,4 - naphthoquinone, Vitamin K3
Formula.	 $C_{11}H_8O_2$

VI. Phosphate Buffered Saline ®Sigma-Aldrich.

VII. PBS-Glucosa.

Calculo.	Vol. Total : 10ml / [200 mM]/ PM: [200mM de glucosa]
----------	--

VIII. XTT Sal de sodio ®Sigma-Aldrich.

Sinónimo.	2, 3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2 H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salts.
Formula.	 $C_{22}H_{16}N_7NaO_{13}S_2$

ANEXO 3. CUANTIFICACION MANUAL DE LEVADURAS EN HEMOCITOMETRO.

- A partir de los cultivos de purificación de SDA tomar con asa microbiológica las colonias necesarias para igualar la turbidez al 0.5 de McFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/ml).
- Utilizar el vórtex para homogeneizar la suspensión ya que tienden a sedimentarse.
- Mediante la pipeta de toma para leucocitos, colocar la boquilla conectada a la manguera de látex y aspirar la suspensión hasta la marca de 1.0.
- Posteriormente llenar por aspiración con SSF o PBS hasta la marca de 11 localizada arriba del bulbo de la pipeta.
- Cubrir con papel parafilm el extremo inferior y retirar cuidadosamente la manguera con la pipeta para la aspiración.
- Agitar manualmente durante 3 min. o colocarla en un agitador por 30 Seg. en posición horizontal.
- Durante la agitación preparar el sistema de conteo del hemocitometro, colocar el cubreobjetos en la cámara de Neubauer, desechar las primeras 5 gotas de la pipeta de toma sobre un papel adsorbente y llenar el interior de la cámara cuidadosamente por un costado.
- Durante 2 o 3 min. Dejar reposar para permitir la sedimentación de las células en una cámara de desecación (caja de Petri con algodón).
- Al termino del reposo colocar la cámara de recuento en la platina del microscopio, ubicar la cuadrícula y realizar el conteo en los 4 cuadros primarios periféricos (CPP).
- El número obtenido en el conteo se debe de multiplicar por un factor de corrección (FC) el cual de acuerdo a estas condiciones es de 25. (Bastidas, 2014)

ANEXO 4 TABLAS DE RESULTADOS CON TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LAS LECTURAS DE MUESTRAS A DIFERENTES PERIODOS DE INCUBACIÓN.

CORRIDA 1 LECTURA A: λ 492 nm.							
TIEMPO DE LECTURA							LECTURA REAL
No.	MUESTRAS	24h	24h	24h	x	S²	X-Control (-)
1	810	0.713	0.828	0.615	0.719	0.107	0.548
2	728	0.594	0.68	0.765	0.680	0.086	0.509
3	150	0.927	0.826	0.959	0.904	0.069	0.733
4	850	0.803	0.962	0.836	0.867	0.084	0.696
5	320	0.775	0.68	0.761	0.739	0.051	0.568
6	615	1.06	1.131	1.32	1.170	0.134	1.000
7	614	1.141	0.883	0.851	0.958	0.159	0.788
8	620	1.022	0.953	0.996	0.990	0.035	0.820
9	CONTROL (-)	0.129	0.159	0.224	0.171	0.05	0.171
No.	MUESTRAS	48h	48h	48h	x	S²	X-Control (-)
1	810	0.867	1.096	0.99	0.984	0.115	0.644
2	728	1.048	1.143	1.087	1.093	0.048	0.753
3	150	0.989	1.331	1.107	1.142	0.174	0.802
4	850	1.207	0.856	0.967	1.010	0.179	0.670
5	320	0.958	1.098	1.112	1.056	0.085	0.716
6	615	1.134	1.23	0.000	1.182	0.068	0.842
7	614	1.333	1.131	1.44	1.301	0.157	0.961
8	620	1.202	1.245	1.712	1.386	0.283	1.046
9	CONTROL (-)	0.339	0.344	0.337	0.340	0.004	0.34
No.	MUESTRAS	72h	72h	72h	x	S²	X-Control (-)
1	810	1.885	1.005	1.19	1.360	0.464	0.940
2	728	1.559	1.39	1.23	1.393	0.165	0.973
3	150	1.144	1.131	1.045	1.107	0.054	0.687
4	850	1.242	1.192	0.981	1.138	0.139	0.719
5	320	1.116	1.124	0.977	1.072	0.083	0.653
6	615	1.353	1.186	1.235	1.258	0.086	0.838
7	614	1.056	1.29	1.404	1.250	0.177	0.830
8	620	1.352	0.869	1.225	1.149	0.250	0.729
9	CONTROL (-)	0.363	0.317	0.579	0.4197	0.1399	

CORRIDA 2 LECTURA A: λ 492 nm.

		TIEMPO DE LECTURA					LECTURA REAL	
No.	MUESTRAS	24h	24h	24h	x	S ²	X-Control (-)	
1	820	1.373	1.522	1.574	1.490	0.104	1.197	
2	840	1.376	1.221	1.215	1.271	0.091	0.978	
3	415	0.775	0.926	0.000	0.851	0.107	0.558	
4	514	1.407	1.237	0.965	1.203	0.223	0.911	
5	513	1.115	1.126	1.379	1.207	0.149	0.914	
6	540	1.13	0.968	0.883	0.994	0.125	0.701	
7	490	0.693	0.783	0.486	0.654	0.152	0.362	
8	CONTROL (+)	1.466	1.551	1.468	1.495	0.05	1.495	
9	CONTROL (-)	0.286	0.29	0.301	0.292	0.01		
No.	MUESTRAS	48h	48h	48h	x	S ²	X-Control (-)	
1	820	2.059	2.085	2.417	2.187	0.200	1.844	
2	840	1.654	1.368	1.459	1.494	0.146	1.151	
3	415	1.199	0.956	0.996	1.050	0.130	0.708	
4	514	1.683	1.579	1.7	1.654	0.066	1.311	
5	513	1.794	1.755	1.748	1.766	0.025	1.423	
6	540	1.39	1.372	1.144	1.302	0.137	0.959	
7	490	1.29	0.927	1.173	1.130	0.185	0.787	
8	CONTROL (+)	2.411	2.445	0.000	2.428	0.02	2.428	
9	CONTROL (-)	0.342	0.354	0.332	0.343	0.011		

CORRIDA 3 LECTURA A : λ 492 nm

		TIEMPO DE LECTURA				LECTURA REAL	
No.	MUESTRAS	24h	24h	24h	x	S ²	X-Control (-)
1	110	1.205	1.04	1.346	1.197	0.153	1.061
2	120	0.772	0.765	0.554	0.697	0.124	0.561
3	130	0.278	0.285	0.28	0.281	0.004	0.145
4	140	0.542	0.538	0.542	0.541	0.002	0.405
5	170	0.717	0.724	0.638	0.693	0.048	0.557
6	180	0.747	0.693	0.757	0.732	0.034	0.596
7	190	0.447	0.505	0.498	0.483	0.032	0.347
8	111	1.081	1.182	0.991	1.085	0.096	0.949
9	230	0.831	0.903	0.895	0.876	0.039	0.740
10	250	0.785	0.79	0.572	0.716	0.124	0.580
11	280	1.111	1.122	0.000	1.117	0.008	0.981
12	211	0.885	0.843	0.835	0.854	0.027	0.718
13	CONTROL (+)	1.551	1.468	1.510.	1.510	0.06	1.510
14	CONTROL (-)	0.13	0.14	0.138	0.136	0.01	
No.	MUESTRAS	48h	48h	48h	x	S ²	X-Control (-)
1	110	2.538	2.550	1.800	2.296	0.430	2.054
2	120	2.347	1.443	1.400	1.730	0.535	1.488
3	130	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	140	1.035	1.324	1.240	1.200	0.149	0.958
5	170	1.893	1.948	1.830	1.890	0.059	1.648
6	180	2.793	2.795	2.919	2.836	0.072	2.594
7	190	2.849	2.519	2.575	2.648	0.177	2.406
8	111	1.899	2.089	1.720	1.903	0.185	1.661
9	230	1.663	1.666	0.000	1.665	0.002	1.423
10	250	0.822	0.795	0.868	0.828	0.037	0.586
11	280	1.871	2.799	2.984	2.551	0.596	2.309
12	211	1.556	1.450	1.300	1.435	0.129	1.193
13	CONTROL (+)	2.223	2.252	0.000	2.238	0.02	2.238
14	CONTROL (-)	0.225	0.241	0.26	0.242	0.02	

CORRIDA 4 LECTURA A: λ 492 nm.							
TIEMPO DE LECTURA							LECTURA REAL
No.	MUESTRAS	24h	24h	24h	x	S²	X-Control (-)
1	219	0.081	0.053	0.069	0.068	0.014	0.000
2	340	0.267	0.763	0.671	0.567	0.264	0.457
3	380	0.168	0.15	0.15	0.156	0.010	0.046
4	316	0.121	0.13	0.128	0.126	0.005	0.016
5	317	0.241	0.347	0.139	0.242	0.104	0.132
6	318	0.156	0.184	0.166	0.169	0.014	0.058
7	440	0.575	0.237	0.295	0.369	0.181	0.259
8	630	1.551	0.883	2.805	1.746	0.976	1.636
9	660	0.432	0.326	0.564	0.441	0.119	0.330
10	670	0.94	0.718	1.091	0.916	0.188	0.806
11	610	2.061	1.537	2.866	2.155	0.669	2.044
12	612	0.302	0.311	0.317	0.310	0.008	0.200
13	616	0.000	0.45	0.428	0.439	0.016	0.329
14	618	0.449	0.721	0.792	0.654	0.181	0.544
15	624	1.835	1.915	1.863	1.871	0.041	1.761
16	130	0.365	0.731	0.716	0.604	0.207	0.494
13	CONTROL (+)	1.55	1.521	1.57	1.547	0.02	1.547
14	CONTROL (-)	0.09	0.119	0.122	0.110	0.02	
No.	MUESTRAS	48h	48h	48h	x	S²	X-Control (-)
1	219	0.000	1.794	1.205	1.500	0.416	1.299
2	340	0.000	1.16	1.108	1.134	0.037	0.933
3	380	0.41	0.457	0.674	0.514	0.141	0.313
4	316	0.112	0.13	0.13	0.124	0.010	0.000
5	317	0.287	0.398	0.666	0.450	0.195	0.249
6	318	0.000	1.137	1.986	1.562	0.600	1.361
7	440	0.8	0.687	0.911	0.000	0.112	0.000
8	630	2.475	1.917	2.366	2.253	0.296	2.052
9	660	2.565	2.822	2.246	2.544	0.289	2.343
10	670	2.73	2.827	2.84	2.799	0.060	2.598
11	610	2.629	2.786	2.713	2.709	0.079	2.508
12	612	2.443	2.768	2.074	2.428	0.347	2.227
13	616	1.579	1.195	1.748	1.507	0.283	1.306
14	618	0.326	0.394	0.322	0.347	0.040	0.146
15	624	1.225	1.075	1.405	1.235	0.165	1.034
16	130	1.652	1.662	1.672	1.662	0.010	1.461
17	CONTROL (+)	2.501	2.59	2.55	2.547	0.04	2.547
18	CONTROL (-)	0.18	0.209	0.214	0.201	0.02	

CORRIDA 5 LECTURA A: λ 492 nm.

No.	MUESTRAS	TIEMPO DE LECTURA			x	S ²	LECTURA REAL
		24h	24h	24h			X-Control (-)
1	710	0.352	0.421	0.998	0.590	0.355	0.435
2	740	0.705	0.435	0.855	0.665	0.213	0.509
3	760	0.181	0.174	0.165	0.173	0.008	0.018
4	770	0.153	0.148	0.208	0.170	0.033	0.014
5	780	0.23	0.254	0.236	0.240	0.012	0.084
6	711	0.445	0.465	0.3	0.403	0.090	0.248
7	712	0.322	0.326	0.369	0.339	0.026	0.183
8	713	0.257	0.31	0.282	0.283	0.027	0.127
9	714	0.341	0.405	0.364	0.370	0.032	0.214
10	715	0.26	0.33	0.362	0.317	0.052	0.162
11	716	0.31	0.371	0.487	0.389	0.090	0.234
12	717	0.137	0.111	0.143	0.130	0.017	0.000
13	718	0.000	0.699	0.566	0.633	0.094	0.477
14	719	0.202	0.19	0.197	0.196	0.006	0.041
15	721	0.655	0.618	0.74	0.671	0.063	0.515
16	CONTROL (+)	1.468	1.57	1.551	1.530	0.05	1.530
17	CONTROL (-)	0.155	0.165	0.147	0.156	0.01	
No.	MUESTRAS	48h	48h	48h	x	S ²	X-Control (-)
1	710	1.885	1.635	1.941	1.820	0.163	1.580
2	740	1.648	1.529	2.627	1.935	0.603	1.695
3	760	0.247	0.209	0.225	0.227	0.019	0.000
4	770	0.952	0.379	0.468	0.600	0.308	0.360
5	780	1.772	1.22	1.491	1.494	0.276	1.254
6	711	1.866	1.675	1.895	1.812	0.120	1.572
7	712	0.996	0.726	0.896	0.873	0.137	0.633
8	713	2.38	2.142	2.316	2.279	0.123	2.039
9	714	1.017	1.753	1.585	1.452	0.386	1.212
10	715	0.583	0.985	0.905	0.824	0.213	0.584
11	716	0.597	0.826	0.773	0.732	0.120	0.492
12	717	0.983	0.903	1.582	1.156	0.371	0.916
13	718	2.255	1.904	1.7	1.953	0.281	1.713
14	719	1.285	1.287	1.868	1.480	0.336	1.240
15	721	0.736	0.697	0.825	0.753	0.066	0.513
16	CONTROL (+)	2.59	2.411	2.252	2.418	0.17	2.418
17	CONTROL (-)	0.24	0.255	0.225	0.240	0.02	