



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**BIOPELÍCULAS FORMADAS POR ESPECIES DE *Candida* EN CUATRO TIPOS DE
CATÉTERES Y SU SENSIBILIDAD A TRES ANTIFÚNGICOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ZABICKY LÓPEZ JAMIE

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: M. EN C. MARÍA DE LOS ANGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM,

COMITÉ TUTOR: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ERIC MONROY PÉREZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., OCTUBRE, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

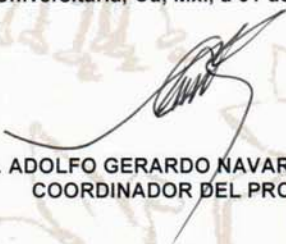
Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 12 de junio de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ZABICKY LÓPEZ JAMIE** con número de cuenta **96353754**, con la tesis titulada "**BIOPELÍCULAS FORMADAS POR ESPECIES DE *Candida* EN CUATRO TIPOS DE CATÉTERES Y SU SENSIBILIDAD A TRES ANTIFÚNGICOS**", realizada bajo la dirección de la **M. EN C. MARÍA DE LOS ÁNGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO**:

Presidente: DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
Vocal: DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS
Secretario: DR. ERIC MONROY PÉREZ
Suplente: DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ
Suplente: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 31 de agosto de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM**, por haberme permitido continuar con mis estudios.

Se extiende un agradecimiento a los siguientes programas por los apoyos económicos recibidos:

Al programa de becas de CONACYT 629057

Al Proyectos de Investigación PAPIIT IN215615

A la **M. en C. Patricia Manzano Gayosso**, por la confianza depositada en mí y en este proyecto, así como al Comité Tutor, **Dr. Ignacio Camacho Arroyo** y **Dr. Eric Monroy Pérez** por todas las observaciones y recomendaciones otorgadas para llevar a buen puerto este trabajo.

A las siguientes instituciones por la donación de los aislados de *Candida* spp. incluidos en este trabajo:

∴ **HOSPITAL DR. DARÍO FERNÁNDEZ**, INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIO SOCIAL PARA LOS TRABAJADORES DEL ESTADO

∴ **HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI**, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

A la **Dra. Francisca Hernández Hernández** por el apoyo técnico en la identificación molecular de los aislados incluidos en este trabajo.

Al **Biol. Armando Zepeda Rodríguez** y **Biol. Francisco Pasos Nájera** por el apoyo otorgado para la obtención y manejo de las imágenes incluidas en este trabajo, su participación fue invaluable.

A **Fis. Lázaro Huerta Arcos** y **M. en C. Salvador López Morales**, por la elaboración de las pruebas de ángulo de contacto requeridas para la elaboración de este trabajo.

A la **Dra. Ana G. Rodríguez Hernández** por brindarme el apoyo técnico necesario en la caracterización física de las superficies utilizadas en este trabajo y poder entender la interacción con las levaduras y el desarrollo de las biopelículas.

A la **QFB Erika Córdova Martínez** y a la **Biol. Elva Bazán Mora** por el apoyo técnico y académico proporcionado para la realización de este trabajo.

A los sinodales por la revisión, observaciones y sugerencias para mejorar la calidad de este trabajo:

Dra. Francisca Hernández Hernández

Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras

Dr. Eric Monroy Pérez

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández



Dedicada con todo el suficiente amor a mi familia:
Chul,
Bodoque, Ethan,
Matute, Lorenzo, Zanahorio
y Zapote

Continúan los agradecimientos....

A Chul, gracias por ser parte de este proyecto, por estar en las buenas y en las malas, tú apoyo fue indispensable para poder lograr esta meta.

A la Dra. Patricia Manzano Gayosso por permitirme ser parte de su grupo, por su confianza, apoyo y paciencia durante este camino.

Al grupo de MICOLOGÍA MÉDICA, Dr. Rubén López, Dra. Francisca Hernández Hernández, Dra. Rosio Castañon, por todos estos años de apoyo.

A todo las personas que conforman la UNIDAD de MICOLOGÍA de la Facultad de Medicina, UNAM, gracias por lograr que uno se sintiera como en casa.

A mis tíos Rosa y Oscar que siempre han estado al pendiente de mí, que nunca imaginaron que al abrirme las puertas de su casa me cambiarían la vida y nunca me dejaron ir.

A todos aquellos que ya nos están, pero siempre estarán.

A mi Mamá y Alejandro por su apoyo, aunque la vida y nuestras decisiones nos lleva por distintos caminos, se que siempre cuento con ustedes.

A mis hermanos Danny, Cintli, Arieli, Alejandra y Santiago aun a la distancia son parte muy importante de mi vida.

A Blanca por siempre estar presente.

A las Qkitas, por hacer la vida tan divertida ...

A Erika y Elva por ser mis guías y compañeras en este hermoso mundo del laboratorio y los hongos.

Y a todas aquellas personas que hayan sido parte de esta hermoso viaje, gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE CUADROS	III
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 HISTORIA DEL ESTUDIO DE LAS BIOPELÍCULAS	4
1.2 DEFINICIONES DE BIOPELÍCULAS	6
1.3 LAS BIOPELÍCULAS COMO UN SISTEMA COMPLEJO	9
1.4 ESTRUCTURA DE LAS BIOPELÍCULAS	10
1.5 FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA	14
1.6 LAS BIOPELÍCULAS Y SU IMPORTANCIA	17
1.7 LAS BIOPELÍCULAS, INTERACCIONES Y FUENTE DE INFECCIÓN	19
1.8 <i>Candida</i> spp. Y SU PAPEL EN LAS INFECCIONES	20
1.9 BIOPELÍCULAS DE <i>Candida</i> spp.	29
1.10 PATOGENIA DE <i>Candida</i> spp.	30
1.11 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES POR <i>Candida</i>	33
1.12 DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	38
1.13 ANTIFÚNGICOS	39
1.14 MECANISMOS DE RESISTENCIA	40
2. ANTECEDENTES	44
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46
4. HIPÓTESIS	47
5. OBJETIVOS	48
5.1 OBJETIVO GENERAL	48
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	48
6. METODOLOGÍA	49
6.1 AISLADOS	49
6.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	50
6.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPERFICIES	55

6.4 FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA	57
6.5 MICROSCOPIA	59
6.6 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A TRES ANTIFÚNGICOS	60
6.7 ANÁLISIS DE LOS DATOS	61
7. RESULTADOS	62
7.1 PACIENTES Y AISLADOS	62
7.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LAS SUPERFICIES ESTUDIADAS	75
7.3 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA	78
7.4 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA EN LAS BIOPELÍCULAS FORMADAS POR <i>Candida</i> spp.	92
8. DISCUSIÓN	96
9. CONCLUSIONES	101
10. LITERATURA CITADA	102
11. ANEXOS	114
11.1 DATOS GENERALES DE PACIENTES	114
11.2 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA	116
11.3 CUANTIFICACIÓN DE LA BIOPELÍCULA	121
11.4 SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA	123

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ILUSTRACIONES DE LOUIS PASTEUR. —————	4
FIGURA 2. IMÁGENES DEL TRABAJO ORIGINAL DE HØIBY N. —————	7
FIGURA 3. DIAGRAMA DE LOS COMPONENTES GENERALES DE UN SISTEMA DE BIOPELÍCULAS. —————	15
FIGURA 6. DIFERENTES TIPOS DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA EN INFECCIONES CRÓNICAS. —————	19
FIGURA 7. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LAS ESPECIES DE IMPORTANCIA MÉDICA DE <i>Candida</i> spp. —————	22
FIGURA 8. ÁRBOL FILOGENÉTICO BASADA EN LA COMPARACIÓN DE SECUENCIAS ITS. —————	23
FIGURA 9. MÉTODOS MÁS COMUNES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>Candida</i> . —————	24
FIGURA 10. SECUENCIA DE EVENTOS Y LA INTEGRACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Candida</i> EN LA FORMACIÓN DE UNA BIOPELÍCULA. —————	28
FIGURA 11. CLASIFICACIÓN DE LOS CATÉTERES POR SU LOCALIZACIÓN Y PERMANENCIA EN EL HOSPEDERO. —————	31
FIGURA 12. VÍAS DE CONTAMINACIÓN DE LOS CATÉTERES. —————	32
FIGURA 13. INCIDENCIA MUNDIAL DE LAS INFECCIONES POR <i>Candida</i> spp. EN LAS ÚLTIMAS DOS DÉCADAS. —————	34
FIGURA 14. INCIDENCIA DE LAS INFECCIONES POR <i>Candida</i> spp. EN AMÉRICA LATINA. —————	35
FIGURA 15. INCIDENCIA COMPARATIVA DE INFECCIONES NOSOCOMIALES RELACIONADAS CON EL USO DE CVC Y CATÉTER URINARIO EN DIFERENTES PAÍSES. —————	36
FIGURA 16. LAS BIOPELÍCULAS SON UNA ESTRUCTURA DE RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS. —————	41
FIGURA 17. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO. —————	49
FIGURA 18. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTOS PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE <i>Candida</i> spp. —————	51
FIGURA 19. LOS CATÉTERES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO. A) CVC; B) FLY; C) MHK Y D) TKF. —————	55
FIGURA 20. ÁNGULO DE CONTACTO SOBRE UNA SUPERFICIE. —————	56
FIGURA 21. ORIGEN DE LAS MUESTRAS PROCESADAS DE DONDE SE OBTUVIERON LOS AISLADOS DE <i>Candida</i> spp. INCLUIDOS EN ESTE ESTUDIO. —————	62
FIGURA 22. DATOS DEMOGRÁFICOS, FACTORES DE RIESGO E INFECCIONES DE LOS 36 PACIENTES, CUYAS MUESTRAS FUERON INCLUIDAS EN ESTE ESTUDIO. —————	64
FIGURA 23. A) ESPECIES DE <i>Candida</i> IDENTIFICADAS POR MÉTODOS TRADICIONALES. B) ORIGEN DE LA MUESTRA Y ESPECIES DE <i>Candida</i> AISLADAS DE CADA UNA DE ELLAS. —————	65
FIGURA 24. <i>Candida albicans</i> . —————	66
FIGURA 25. <i>Candida glabrata</i> . —————	67
FIGURA 26. <i>Candida guilliermondii</i> . —————	68
FIGURA 27. <i>Candida krusei</i> . —————	69
FIGURA 28. <i>Candida parapsilosis</i> complejo. —————	70
FIGURA 29. <i>Candida tropicalis</i> . —————	71
FIGURA 30. GEL DE AGAROSA ITS1-ITS4 DE ALGUNOS DE LOS AISLADOS. —————	72
FIGURA 31. GEL DE AGAROSA DEL RFLP CON <i>MspI</i> PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>Candida</i> . —————	72
FIGURA 32. GEL DE AGAROSA PARA LA DIFERENCIACIÓN DE <i>C. dubliniensis</i> DE <i>C. albicans</i> . —————	73
FIGURA 33. GEL DE AGAROSA DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>SADH</i> DEL COMPLEJO <i>C. parapsilosis</i> . Y GEL DE AGAROSA DEL RFLP CON <i>BAN</i> PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>C. metapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> Y <i>C. parapsilosis sensu stricto</i> . —————	73
FIGURA 34. COMPARACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES POR TÉCNICAS TRADICIONAL Y POR TÉCNICAS MOLECULARES. ———	74
FIGURA 35. GRADO DE RUGOSIDAD DETERMINADA PARA CADA UNA DE LAS SUPERFICIES (CVC, FLY, MHK Y TKF) PROBADAS A DISTINTAS ESCALAS DE OBSERVACIÓN. —————	75
FIGURA 36. IMÁGENES DE MFA DE LAS SUPERFICIES PLÁSTICAS DE LOS CUATRO DISTINTOS CATÉTERES. —————	76
FIGURA 37. ÁNGULOS DE CONTACTO OBTENIDOS SOBRE CVC CON FORMAMIDA (A), AGUA MQ [®] (B) Y GLICEROL (C). —————	77
FIGURA 38. GRÁFICA DE LA RUGOSIDAD VS ENERGÍA DE SUPERFICIE DE CADA UNA DE LAS SUPERFICIES PROBADAS (CVC, FLY, MHK, TKF). —————	78

FIGURA 39. COMPARACIÓN DE LA FASE DE ADHESIÓN ENTRE LAS SEIS DIFERENTES ESPECIES, EN CADA UNA DE LAS SUPERFICIES. ———	79
FIGURA 40. EFECTO DE LA RA Y RZ SOBRE LA ADHESIÓN DE LAS LEVADURAS DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE <i>Candida</i> EN CADA UNA DE LAS SUPERFICIES. —————	80
FIGURA 41. EFECTO DE LA ENERGÍA DE SUPERFICIE SOBRE LA ADHESIÓN DE LAS LEVADURAS EN LA FASE DE ADHESIÓN EN LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA. —————	80
FIGURA 42. IMÁGENES OBTENIDAS POR MEB DE <i>Candida albicans</i> DESPUÉS DE 90 MIN DE INCUBACIÓN EN LAS CUATRO SUPERFICIES. ———	81
FIGURA 43. CURVAS DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> SOBRE CVC, FLY, MHK Y TKF. —————	83
FIGURA 44. GRÁFICAS DE CRECIMIENTO COMPARATIVO ENTRE ESPECIES Y LAS SUPERFICIES PROBADAS. —————	84
FIGURA 45. BIOPELÍCULAS FORMADAS POR <i>C. albicans</i> DESARROLLADAS SOBRE CUATRO SUPERFICIES A DISTINTOS TIEMPOS, OBSERVADAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON BLANCO DE CALCOFLUÓR. —————	85
FIGURA 46. BIOPELÍCULAS FORMADAS POR <i>C. tropicalis</i> DESARROLLADAS SOBRE CUATRO SUPERFICIES A DISTINTOS TIEMPOS, OBSERVADAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON BLANCO DE CALCOFLUÓR. —————	86
FIGURA 47. IMÁGENES OBTENIDAS POR MEB DE LA BIOPELÍCULA FORMADA POR <i>C. albicans</i> (A) Y <i>C. tropicalis</i> (B). —————	87
FIGURA 48. BIOPELÍCULA DESARROLLADA POR <i>C. albicans</i> . —————	88
FIGURA 49. BIOPELÍCULA MADURA DE <i>C. albicans</i> FORMADA SOBRE CVC. —————	88
FIGURA 50. BIOPELÍCULA MADURA DE <i>C. albicans</i> FORMADA SOBRE FLY. —————	89
FIGURA 51. CLASIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE <i>Candida</i> spp. BAJO LOS PUNTOS DE CORTE ESTABLECIDOS. —————	91
FIGURA 52. CMI ₅₀ DE LAS BIOPELÍCULAS DESARROLLADAS POR <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> Y <i>C. tropicalis</i> EN CVC; FLY, MHK Y TKF. —	93
FIGURA 53. DAÑO FÚNGICO OCASIONADO POR AMB, CSF, PSZ SOBRE LAS BIOPELÍCULAS FORMADAS POR <i>C. ALBICANS</i> , <i>C. GLABRATA</i> Y <i>C. tropicalis</i> EN LAS DIFERENTES SUPERFICIES (CVC, FLY, MHK, TKF). —————	95
FIGURA 54. CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA PARA CADA UNA DE LAS ESPECIES PROBADAS CONTRA LA RA DE CADA UNA DE LAS SUPERFICIES EN LOS CINCO TIEMPOS ANALIZADOS. —————	116
FIGURA 55. CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE LAS ESPECIES PROBADAS CONTRA LA RZ —————	117
FIGURA 56. CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE LAS ESPECIES PROBADAS CONTRA LA ENERGÍA DE SUPERFICIE DE LOS CATÉTERES ESTUDIADOS EN LOS TIEMPOS ANALIZADOS. —————	118
FIGURA 57. CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE LAS ESPECIES PROBADAS CONTRA LOS VALORES OBTENIDOS DEL COMPONENTE POLAR DE LOS CATÉTERES ESTUDIADOS EN LOS TIEMPOS ANALIZADOS. —————	119
FIGURA 58. CUANTIFICACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA DE LAS ESPECIES PROBADAS CONTRA LOS VALORES OBTENIDOS DEL COMPONENTE POLAR DE LOS CATÉTERES ESTUDIADOS EN LOS TIEMPOS ANALIZADOS. —————	120

CUADRO 1. GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE LAS BIOPELÍCULAS. -----	11
CUADRO 2. COMPONENTES DE LA SUSTANCIA POLIMÉRICA EXTRACELULAR DE <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> Y <i>C. tropicalis</i> . -----	13
CUADRO 3. CICLO BIOLÓGICO DE LA FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA EN <i>P. aeruginosa</i> . -----	15
CUADRO 4. MICROORGANISMOS FORMADORES DE BIOPELÍCULAS EN DIFERENTES SUPERFICIES Y CAUSANTES DE INFECCIONES. -----	21
CUADRO 5. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ALGUNAS ESPECIES DE <i>Candida</i> . -----	25
CUADRO 6. FACTORES DE VIRULENCIA DESCRITOS EN <i>Candida albicans</i> . -----	27
CUADRO 7. FACTORES DE RIESGO PARA DESARROLLAR UNA CANDIDOSIS INVASIVA. -----	30
CUADRO 8. CATÉTERES MÁS COMUNES, EL MATERIAL DE ELABORACIÓN Y RIESGOS INFECCIOSOS. -----	33
CUADRO 9. RELACIÓN ENTRE LAS ESPECIES MÁS COMUNES DE <i>Candida</i> Y LA REGIÓN GEOGRÁFICA. -----	38
CUADRO 10. CARACTERÍSTICAS DE TRES ANTIFÚNGICOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES INVASIVA. -----	40
CUADRO 11. DIFERENTES MODELOS EMPLEADOS PARA EL ESTUDIO DE LAS BIOPELÍCULAS EN <i>Candida</i> spp. -----	45
CUADRO 12. CUARENTA Y NUEVE AISLADOS CLÍNICOS DE <i>Candida</i> spp. OBTENIDOS DE MUESTRAS CLÍNICAS. -----	50
CUADRO 13. MEZCLA DE REACCIÓN PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS POR PCR. -----	52
CUADRO 14. PATRONES DE CORTE ESPECÍFICOS PARA CADA UNA DE LAS ESPECIES DE <i>Candida</i> . -----	52
CUADRO 15. MEZCLA DE REACCIÓN PARA LA PCR-DÚPLEX PARA <i>C. dubliniensis</i> DE <i>C. albicans</i> . -----	53
CUADRO 16. MEZCLA DE REACCIÓN PARA LA PCR DEL GEN SADH. -----	54
CUADRO 17. PATRONES DE CORTE CON LA ENZIMA <i>BanI</i> DEL GEN SADH PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL COMPLEJO <i>C. parapsilosis</i> . -----	54
CUADRO 18. VALORES DE TENSIÓN SUPERFICIAL, PARTE POLAR Y PARTE DISPERSA DE LOS TRES LÍQUIDOS UTILIZADOS. -----	57
CUADRO 19. VALORES DE RA Y R OBTENIDOS PARA CADA UNA DE LAS SUPERFICIES A UNA ESCALA DE 5 μm . -----	75
CUADRO 20. ÁNGULOS DE CONTACTO OBTENIDOS Y AJUSTADOS CON LA CORRECCIÓN DE WENZEL PARA CADA UNA DE LAS SUPERFICIES PROBADAS CON TRES LÍQUIDOS. -----	77
CUADRO 21. VALORES DE LA ENERGÍA DE SUPERFICIE, SU COMPONENTE POLAR Y DISPERSO PARA CADA UNA DE LAS SUPERFICIES. -----	77
CUADRO 22. CRITERIOS ESTABLECIDOS CON LOS VALORES DE DO OBTENIDOS, CON BASE EN LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA: -----	90
CUADRO 23. VALORES DE CMI ₅₀ OBTENIDOS PARA LAS BIOPELÍCULAS FORMADAS POR CADA UNA DE LAS ESPECIES EN LAS SUPERFICIES PROBADAS. -----	92
CUADRO 24. DATOS DEMOGRÁFICOS Y GENERALES DE LOS PACIENTES DONDE SE OBTUVIERON LOS AISLADOS DE <i>Candida</i> spp. INCLUIDOS EN ESTE TRABAJO. -----	114
CUADRO 25. VALORES OBTENIDOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DESARROLLADA A LAS 72 H POR EL ENSAYO DE ACTIVIDAD METABÓLICA SOBRE LAS CUATRO SUPERFICIES DE TODOS LOS AISLADOS DE <i>Candida</i> spp. -----	121
CUADRO 26. VALORES DE CMI ₅₀ OBTENIDOS PARA AMB, CSF Y PSZ PARA BIOPELÍCULAS DESARROLLADAS POR AISLADOS DE <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> Y <i>C. tropicalis</i> SOBRE CUATRO TIPOS DE SUPERFICIES. -----	123

ABREVIATURAS

AMB	Anfotericina B
CAT	Catéter
CSF	Caspofungina
CVC	Catéter venoso central
DO	Densidad óptica
DPCA	Diálisis peritoneal continua ambulatoria
FLY	Catéter tipo Foley
ITS	Espacios intertranscripcionales (internal transcribed spacer)
MEB	Microscopia electrónica de barrido
MF	Microscopia de fluorescencia
MFA	Microscopía de fuerza atómica
MHK	Catéter tipo Mahurkar
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (por sus siglas en ingles Restriction Fragment Length Polymorphism)
PBS	Buffer de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en ingles polymerase chain reaction)
PSZ	Posaconazol
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medio
SPE	Sustancia polimérica extracelular
TKF	Catéter tipo Tenckhoff
UCI's	Unidad de cuidados intensivos
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida

RESUMEN

Las biopelículas son comunidades de microorganismos sésiles unidos a un sustrato o una interfase, embebidas en una matriz de sustancia polimérica extracelular de autoproducción y exhiben un fenotipo alterado y con alta tolerancia a los antimicrobianos. Los modelos de biopelículas en hongos más estudiados son los formados por algunas de las especies de *Candida*. Estas especies son levaduras oportunista, comensales de la piel y mucosas del sistema gastrointestinal y genitourinario. Estos microorganismos cuentan con diversos factores de virulencia como las biopelículas, que favorecen la colonización de superficies y tejidos. Las especies de *Candida* son la primera causa de infecciones nosocomiales de origen fúngico y el uso de catéteres es uno de los factores de riesgo más importantes para desarrollar infecciones sistémicas.

El objetivo de este trabajo fue conocer la capacidad de diferentes especies de *Candida* para formar biopelículas sobre cuatro tipos de superficies de catéteres (venoso central, tipo Foley, tipo Mahurkar, tipo Tenckhoff). Reconocer si la rugosidad y/o la energía de la superficie de los catéteres influyen en la formación de la biopelícula desarrollada por diferentes especies de *Candida* y el patrón de sensibilidad a anfotericina B, caspofungina y posaconazol.

Se estableció la biopelícula de 49 aislados clínicos de diferentes especies de *Candida* (*C. albicans* (N=20), *C. glabrata* (N=10), *C. guilliermondii* (N=2), *C. krusei* (N=2), *C. parapsilosis* (N=10) y *C. tropicalis* (N=9)) sobre fragmentos de las cuatro distintas superficies plásticas, se cuantificó por ensayo de actividad metabólica, se observaron por microscopia de fluorescencia y electrónica de barrido. A cada uno de las superficies se les determinó el grado de rugosidad y la energía de superficie. Los aislados de *Candida* spp. se clasificaron según su capacidad para formar biopelícula bajo los criterios de fuertes, moderados, débil y nulos formadores. Por microdilución en caldo se realizó la prueba de sensibilidad a anfotericina B, caspofungina y posaconazol sobre la biopelícula formada por *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* sobre las diferentes superficies.

La rugosidad de la superficie no mostró un efecto en la adhesión de las levaduras. El catéter venoso central fue la superficies con la menor energía de superficie y sobre la que se desarrolló mayor biopelícula después de 72 h. Las especies con mayor capacidad de formación de biopelícula fueron *C. albicans* y *C. tropicalis* sobre catéter venoso central. El 10% de los aislados se comportaron como fuertes formadoras de biopelícula al final del experimento

De manera general, las biopelículas desarrolladas por las especies de *Candida*, mostraron valores de resistencias para AMB ($1.8 \pm 0.59 \mu\text{g/mL}$), CSF ($1.02 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$) y PSZ ($3.87 \pm 1.087 \mu\text{g/mL}$) en la mayoría de las superficies probadas, principalmente los aislados de *C. albicans* y *C. tropicalis*.

ABSTRACT

The biofilms are communities of sessile microorganisms attached to a substrate or to each other or an interface, embedded in a self-produced matrix of extracellular polymeric substances and exhibit a phenotype altered with high tolerance to antimicrobials. The most studied fungi biofilm models are those formed by some species of *Candida*.

These species are opportunistic yeast, normally reside on the skin, the mucous membrane of gastrointestinal and genitourinary tract; *Candida* spp. have different virulence factors such as biofilms, they help colonize the surfaces and tissue. *Candida* spp. are the most common cause of nosocomial infection of fungal origin and the catheter is one the most important risk factor for development bloodstream infection.

The aim of this study was to know the ability of different *Candida* species to form biofilms on four types of catheter surfaces (central venous, type Foley, type Mahurkar, type Tenckhoff). Recognize if the roughness and/or surface energy of the catheters, influence biofilm formation by different *Candida* species, and the determinate of susceptibility profile to amphotericin B, caspofungin and posaconazole.

The biofilms were developed with 49 clinical isolates of different *Candida* spp. (*C. albicans* (N=20), *C. glabrata* (N=10), *C. guilliermondii* (N=2), *C. krusei* (N=2), *C. parapsilosis* (N=10) y *C. tropicalis* (N=9)), on the fragments of four plastic surfaces; the biofilm was quantified for metabolic assay, observed with scanner electronic microscopy and fluorescence microscopy. Also, each of the surfaces were determined the roughness and the surface energy. The classification of isolates for their ability to develop biofilm was established under the criteria of strong, moderate, weak and null formers. The susceptibility antifungal test was performed by broth microdilution method for amphotericin B, caspofungin and posaconazole for biofilm of *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis* on the four surfaces.

The species with the highest capacity for biofilms formations were *C. albicans* and *C. tropicalis* on central venous catheter. The roughness didn't showed effect on yeast adhesion. The central venous catheter surface showed the lowest surface energy and the highest biofilm developed after 72 h. The 10% of the isolates behaved as strong formers of biofilm at the end of the experiment. In general, the biofilms of *C. albicans* and *C. tropicalis* showed resistance to for AMB, CSF and PSZ in many of the surfaces tested.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia del estudio de las biopelículas

Los microorganismos adheridos a superficies han sido objeto de estudio desde las primeras observaciones realizadas en los albores de la introducción del microscopio por Anton van Leeuwenhoek. Este hallazgo quedó plasmado en las cartas escritas, en el periodo de 1683 a 1708. Louis Pasteur observó agregados bacterianos implicados en la fermentación del vinagre a partir del vino, tema en el que trabajó por más de 20 años y posteriormente describió a *Mycoderma aceti* como el agente productor de ácido acético, el cual producía una membrana en el vinagre a la que llamó “mere du vinaigre” o masa gelatinosa (Barnett 2000) (Høiby N. 2014). En la Figura 1 se muestra uno de los bosquejos de Louis Pasteur, donde representó los agregados de microorganismos adheridos a las paredes del instrumento de fermentación desarrollado y utilizado. Estos hallazgos han tenido un impacto relevante hasta nuestros días, en áreas como la industria alimenticia, farmacéutica y en diversos aspectos médicos (Høiby N. 2014).

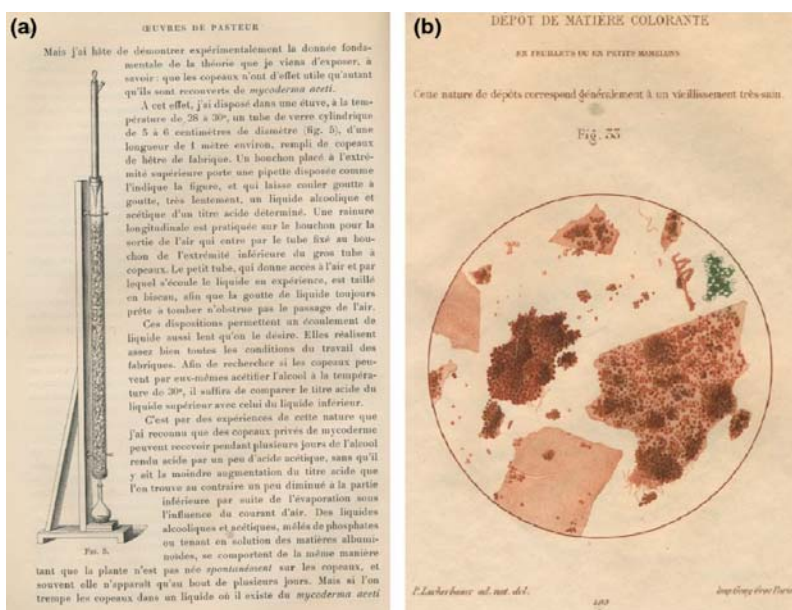


Figura 1. Ilustraciones de Louis Pasteur (a) Instrumento diseñado y construido por Louis Pasteur para el estudio de la fermentación del vinagre a partir de vino, realizada por bacterias que crecen en la superficie de las virutas de madera; (b) Agregados de microorganismos adheridos a las superficies del instrumento de fermentación (biopelículas) (Høiby N. 2014).

En los siglos XIX y XX, el estudio de las biopelículas no fue de interés entre los microbiólogos, ya que estaban enfocados en obtener el crecimiento de los microorganismos en forma planctónica y libremente suspendidos, con la finalidad de identificar al agente infeccioso causante de la enfermedad y cumplir con uno de los postulados establecidos por Robert Koch (Battin *et al.* 2007).

El paradigma establecido desde los postulados de Robert Koch para la investigación de los microorganismos fue desde un punto de vista unicelular, planctónico, en cultivo puro y homogéneo; pero este modelo nos da una visión sesgada, ya que en ambientes naturales los microorganismos no se encuentran bajo esas condiciones, esto limita la comprensión en las interacciones entre el microorganismo y su ambiente. Generalmente, éstos se desarrollan en forma de agregados sobre alguna superficie sólida; este comportamiento les proporcionó grandes ventajas tanto en ambientes naturales como dentro de un hospedero, ya que esta forma de crecimiento es una antigua estrategia de supervivencia (Battin *et al.* 2007) (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

A través de la historia, los métodos para estudiar a los microorganismos se han ido modificando, hasta el redescubrimiento de las biopelículas, que son comunidades adosadas a superficies y se pueden encontrar de forma abundante en diversos ecosistemas, principalmente acuáticos (Battin *et al.* 2007) (Davey y O’toole, 2000) (Parsek y Fuqua, 2004).

Estas comunidades de microorganismos han jugado un papel muy importante a lo largo de la historia de la Tierra, los tapetes microbianos (un tipo de biopelícula) posiblemente fueron los primeros ecosistemas en la era temprana de las Arqueas, el registro fósil de las primeras biopelículas formadas por procariontes data de más de 3.3 mil millones de años en la formación de Kornberg en África (Berlanga y Guerrero, 2016) (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

Diversos microbiólogos retomaron el estudio de las biopelículas formadas por bacterias basados en la teoría de que el 99% de las bacterias crecen formando estas estructuras (Nazar 2007). De los primeros trabajos realizados fue el de Henrichi AT (1933) colocando portaobjetos en cuerpos de agua dulce, observó la formación de una película uniforme de bacterias (Henrici 1933); Zobell CE y Allen EC (1935) quienes trabajaron en cuerpos de agua salada sumergiendo una laminilla de vidrio, demostraron que aproximadamente 30 millones de bacterias se adhirieron en una superficie de 6.25 cm² en 24 h (Zobell y Allen, 1935). Angst EC (1922) realizó observaciones de los microorganismos adheridos en la parte baja de los cascos de los barcos (Hoiby N. 2014) (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

El estudio formal de las biopelículas está descrito desde finales de la década de los 70's del S. XX, incrementando en el número de investigaciones en la década de los 90's hasta la actualidad. El Dr. JW Costerton fue uno de los pioneros en el estudio de estas estructuras, él y su grupo de trabajo fueron los que nombraron a las microcolonias adheridas a una superficie como “biopelículas”. Los estudios se enfocaron en comprender la interacción de las bacterias con los diversos ambiente que las rodean, como por ejemplo sobre una roca, en un dispositivo médico o en el tejido humano (McLean, Lam, y Graham, 2012).

En la década de 1970, en el campo de la medicina, por primera vez se puso de manifiesto el vínculo entre la etiología de los agregados bacterianos de *P. aeruginosa* rodeados de una gran cantidad de material cohesivo en una infección pulmonar persistente; hallazgo demostrado en un examen microscópico de esputo de un paciente con fibrosis quística (Høiby N. 2014), posteriormente se evidenció la resistencia incrementada a los antimicrobianos en los microorganismos formadores de biopelículas en comparación con los del estado planctónico (Figura 2) (Nickel *et al.* 1985).

1.2 Definiciones de biopelículas

La palabra biopelícula (biofilm en inglés) procede del híbrido (griego/latín): *bio* “vida”, película (traducción “*film*”): *pell* “piel”; *cula* “pequeña” (Cortes-Gabaudan y Ureña-Bracero, 2011).

En los estudios iniciales de las biopelículas se creía que los microorganismos marinos eran los únicos que podían formar estas estructuras; por la connotación del término “película” que se refería a la capacidad de adhesión, agregación y multiplicación de los microorganismos en una superficie; este término se utilizó para distinguir a los microorganismos que se encontraban adheridos (sésiles) de los libres nadadores (planctónicos) (Høiby 2014).

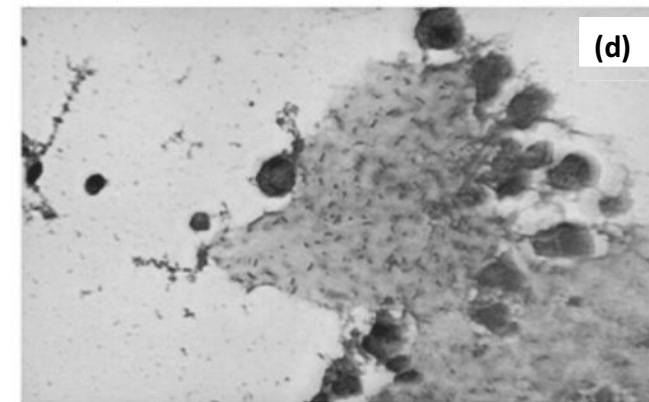
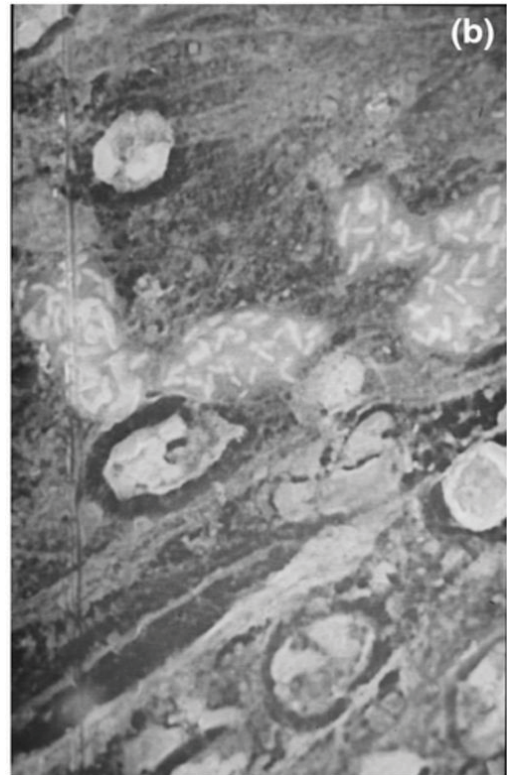
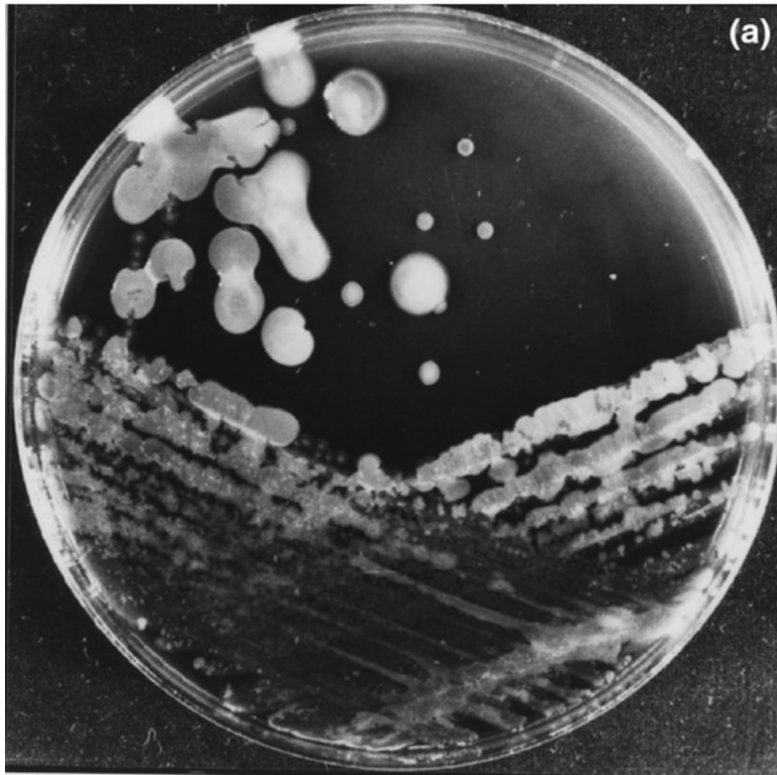


Figura 2. Imágenes obtenidas del trabajo original de Høiby N (1977) (a) Colonias de *P. aeruginosa*, mucoides (largas) y no mucoides (cortas) aisladas de paciente con fibrosis quística. (c) Pulmón de una paciente con fibrosis quística e infección crónica por biopelícula de *P. aeruginosa*. (b) Tinción de Gram de una muestra de esputo de paciente con fibrosis quística (Høiby N. 2014).

Las biopelículas pueden definirse de una manera sencilla, simple y general como una comunidad de microorganismos que se encuentra adherida a una superficie biótica o abiótica (O'Toole *et al.* 2000).

Costerton y cols, las definieron como una comunidad de bacterias adheridas a una superficie embebidas en una matriz “glicocálix” (Costerton *et al.* 1978); posteriormente ampliaron la definición especificando que son una población de bacterias adheridas unas a otros y/o a una superficie o en la interfase (Costerton *et al.* 1995).

La definición fue cobrando complejidad dependiendo del enfoque de cada uno de los estudios, para dar prioridad a alguna característica en particular, por ello, también se consideró un consorcio estructurado de células microbianas rodeadas de una matriz de polímeros de producción propia y éstas son de origen mono especie o multi-especie (Høiby N. 2014).

Una biopelícula también se refiere a un ensamblaje de células microbianas, las cuales se encuentran firmemente adheridas a una superficie y están rodeadas por una matriz de sustancia polimérica extracelular, en dicha matriz podemos encontrar diversos componentes no celulares que dependen del ambiente donde se desarrollen como: minerales cristalizados, partículas de corrosión, partículas de limosas y arcillosas o componentes sanguíneos (Donlan 2002).

Desde un enfoque médico es “un grupo de células ‘bacterianas’ embebidas en una matriz extracelular, las cuales presentan una alta tolerancia a los agentes antimicrobianos y al sistema inmunológico del hospedero, que su contraparte planctónica” (Bjarnsholt 2011).

En el año 2002, Donlan RM y Costerton JW (Donlan y Costerton, 2002) ampliaron el concepto de biopelícula como una comunidad sésil formada por microorganismos que se unen irreversiblemente a un sustrato o interfase, los cuales están embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares de autoproducción y exhiben un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y la transcripción de genes en comparación con su contraparte planctónico.

1.3 Las biopelículas como un sistema complejo

Los microorganismos regularmente se ven como simples “criaturas” cuando éstos se comparan con los organismos “superiores”, aunque se ha demostrado que los microorganismos también presentan una diferenciación y comportamiento (O’Toole *et al.* 2000).

La capacidad de formar biopelículas es una característica en el linaje filogenético más antiguo del grupo de las arqueas y de las bacterias; además desde el punto de vista adaptativo y evolutivo estas estructuras proveen un equilibrio a los microorganismos que las desarrollan, frente a un ambiente cambiante y a condiciones adversas de temperatura, pH extremo y la exposición a radiación ultravioleta (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

La propiedad de desarrollar biopelículas facilita las interacciones complejas entre un grupo de células individuales, en un microambiente estable que favorezca las vías de señalización y movilidad quimiotáctica. Para que se de este tipo de señalización se requiere un contacto entre las células, la adhesión a una superficie permite anclarse a un sustrato y concentrar los nutrientes (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Hall-Stoodley y cols demostraron la importancia de conocer el origen natural y evolutivo de las biopelículas, para desarrollar estrategias de control contra la formación de estas estructuras (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Diversos autores señalaron que en ambientes naturales predominan las biopelículas multi-especie, mientras en los dispositivos médicos generalmente son mono especies (Donlan 2002) (Donné y Dewilde, 2015) (O’Toole *et al.* 2000).

Los microorganismos que cuentan con la capacidad de formar biopelículas, presentan un comportamiento morfológico y genéticamente distinto que su contraparte planctónica, lo cual les conferirá una rapidez y flexibilidad para adaptarse a diversos ambientes, esto puede estar relacionado con una regulación genética, por mecanismos de selección o por ambos, lo cual les otorga una indudable ventaja (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

Las características fundamentales de las biopelículas son (McCarty *et al.* 2014):

- Estructura tridimensional.
- Formadas por una o más especies.
- Desarrolladas en las interfases del sistema (sólido/líquido, líquido/aire, líquido/líquido o sólido/aire).
- Son estructuras heterogéneas dependientes del ambiente circundante.
- Cuentan con un sistema de canales denominado “sistema circulatorio”.
- Le confieren a los microorganismos resistencia a los agentes antimicrobianos y al sistema inmunológico del hospedero.

1.4 Estructura de las biopelículas

La biopelícula está compuesta por un 97% de agua, proporcionando protección para evitar la desecación. Las características y la estructura pueden cambiar, dependiendo del ambiente donde se desarrolle y varía a través del tiempo. Algunos autores han propuesto que la estructura es el reflejo de su función (Lewandowski y Beyena, 2007). Para explicar la complejidad estructural de la biopelícula se han llevado a cabo estudios en los que se incluyeron diversos aspectos morfológicos y moleculares (Hall-Stoodley *et al.* 2004). La alta complejidad, también se debe a la formación de diferentes estructuras como huecos, canales, cavidades, poros y filamentos, así como la disposición de los microorganismos, agrupados en racimos o en capas (de Beer *et al.* 1994). La integridad de esta estructura depende de la producción de la matriz extracelular formada por los microorganismos; aunque muchas de las características químicas y fisiológicas están relacionadas con los microorganismos que la conforman y el ambiente que los rodea (McCarty *et al.* 2014). La estructura formada va ser la óptima bajo las diferentes condiciones para controlar la distribución y afluencia de los nutrientes desde las capas más internas hacia las más externas, así como la salida de los materiales de desecho; por ello, hay una relación entre la complejidad, la función y la forma (Hall-Stoodley *et al.* 2012) (Lewandowski y Beyena, 2007).

La arquitectura de las biopelículas puede cambiar por factores externos, como las condiciones ambientales o por los factores internos como el perfil genético de los microorganismos que las conforman. Cada especie puede actuar de diversas maneras frente a un mismo estímulo ambiental (Donné y Dewilde, 2015); por

ejemplo, la biopelícula formada por *P. aeruginosa* va a depender del nutriente disponible en el medio, ya que si hay glucosa, la forma es abultada o en forma de hongo; mientras que la forma plana está influida por la presencia de citrato como fuente de carbono (Klausen *et al.* 2003). Por otro lado, en *Escherichia coli* y *Myxococcus xanthus* se ha observado que en respuesta a la disponibilidad de los nutrientes pueden pasar de un estado planctónico a sésil y regresar a planctónico (O'Toole *et al.* 2000). Para la formación de las biopelículas se han descrito genes esenciales, los cuales están relacionados con la regulación de su desarrollo (Cuadro 1). La señalización celular puede mostrar algún control en la diferenciación de la biopelícula, lo cual puede verse reflejado en la disminución del crecimiento bajo diferentes condiciones de nutrientes (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

Cuadro 1. Genes involucrados en el desarrollo de las biopelículas.

Especie	Genes	Función	Referencia
<i>P. aeruginosa</i>	<i>psl</i> (12 genes)	Formación de exopolisacárido <i>psl</i>	(Colvin <i>et al.</i> 2012) (Reinhart y Oglesby-Sherrouse, 2016)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>pel</i> (7 genes)	Formación de exopolisacárido <i>pel</i>	(Colvin <i>et al.</i> 2012) (Reinhart y Oglesby-Sherrouse, 2016)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>hcnABC</i>	Biosíntesis de hidrógeno de cianuro Quorum Sensing (QS)	(Chowdhury y Bagchi, 2016)
<i>E. coli</i>	<i>fimA</i>	Formación de fimbrias	(Kim <i>et al.</i> 2013)
<i>E. coli</i>	<i>ymdB</i>	Desarrollo de la biopelícula y resistencia	(Kim <i>et al.</i> 2013)
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>luxS</i>	QS y desarrollo de la biopelícula	(Yoshida <i>et al.</i> 2005)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>ica</i> (7 genes)	Polisacárido de adhesión intercelular	(Beenken <i>et al.</i> 2004)
<i>Candida albicans</i>	<i>als</i>	Proteínas de adhesión	(Finkel y Mitchell, 2011) (Sheppard <i>et al.</i> 2004)
	<i>hwp1</i>	Promueve la adhesión a células epiteliales	(Araújo <i>et al.</i> 2017) (Staab <i>et al.</i> 1999)
<i>Candida tropicalis</i>	<i>efg1</i>	Filamentación y formación de biopelículas	(Araújo <i>et al.</i> 2017)
<i>Candida glabrata</i>	<i>epa6</i>	Adhesión a la pared	(Araújo <i>et al.</i> 2017)
	<i>fls1</i>	Síntesis de matriz extracelular	(Araújo <i>et al.</i> 2017)

En la Figura 3 se muestra los cuatro componentes que conforman un sistema de biopelícula:



Figura 3. Diagrama de los componentes generales de un sistema de biopelículas. 1) Sustrato o superficie donde se va a desarrollar. 2) Microorganismos. 3) Fase líquida. 4) Fase gaseosa. 5) sustancia polimérica extracelular (SPE).

El estudio de las biopelículas puede basarse en la caracterización de uno o varios de los componentes (Lewandowski y Beyena, 2007). Por ello es importante considerar que todos son factores determinantes desde la primera fase de formación de la microcolonia. También se tiene que considerar la hidrodinámica del sistema acuoso, las características del medio líquido y de la superficie, así como propiedades intrínsecas de los microorganismos (Donlan 2002).

Bajo las condiciones adecuadas la mayoría de las bacterias, hongos levaduriformes o filamentosos, algas y protozoarios pueden formar biopelículas (Donné y Dewilde, 2015). Diversos autores han demostrado que la mayoría de las especies de importancia médica como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus* spp. y *C. albicans* pueden formar biopelículas (Donné y Dewilde, 2015) (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Las biopelículas conformadas por multi-especie, se da una competencia por los nutrientes y el oxígeno del ambiente, siendo las células de las capas más externas las que presentan una exposición mayor a los cambios ambientales y agentes tóxicos (Donné y Dewilde, 2015).

De los componentes más importantes de las biopelículas es la matriz extracelular, la cual fue descrita inicialmente como una masa de fibras integrada por polisacáridos que van desde la superficie celular formando una malla denominada “glicocálix” (Costerton *et al.* 1978), cuya función principal es mantener unidas a las células y fijarlas a un sustrato; posteriormente con el análisis con microscopía electrónica de barrido (MEB) se pudo corroborar la naturaleza de dicha matriz (Flemming 2016). Aunque el término “glicocálix” rápidamente quedó en desuso; la matriz fue renombrada como sustancia polimérica extracelular (SPE), la cual está constituida por polímeros orgánicos de origen microbiano, y son los responsables de la unión entre las células y

cohesión de los componentes, así como la adhesión al sustrato en un sistema de biopelícula; posteriormente se incluyeron otros componentes como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Flemming 2016) (Flemming, Neu, y Wozniak, 2007). Algunos autores han calculado que entre el 15 y el 20% de la masa de una biopelícula corresponde a los microorganismos, mientras que hasta un 80% del peso es de la SPE, la cual está conformada por capas delgadas de material adhesivo y cohesivo que rodean y protegen las células de factores dañinos que se encuentran en el ambiente circundante (Donné y Dewilde, 2015). La composición SPE va depender diversos factores como la especie que la forme, la superficie y el medio ambiente en el que se desarrolle (Cuadro 2) (Donné y Dewilde, 2015). La cantidad de polisacáridos y proteínas son los que van a determinar la viscosidad de esta matriz (Flemming et al. 2007).

Cuadro 2. Componentes de la sustancia polimérica extracelular de *E. coli*, *C. albicans* y *C. tropicalis*.

Componente	<i>E. coli</i> ¹	<i>C. albicans</i> ^{2,3,4,5}	<i>C. tropicalis</i> ⁴
Polisacáridos	Celulosa	β-1,3 glucano	Carbohidratos
	Ácido colónico	β-1,6 glucano	
	Poli-β-1,6-N-acetil-glucosamina (PGA)	α-1,6 manana	
	Lipopolisacáridos	Glucosa	
Proteína/Enzimas	Flagelina (flagelos)	N/D	N/D
Apéndices	Curlin (curli) Fimbrina (fimbria)		
Proteínas de superficie	Ag43 adhesina AidA TibA	Lipasas Fosfolipasas ADNasas	Lipasas Fosfolipasas ADN asas
Ácidos nucleicos	ADN extracelular	ADN extracelular	ADN extracelular
Moléculas de señalización	Acil-homoserina lactona (AHL)	Farnesol	N/D
Otros	Agua Nutrientes Moléculas antimicrobianas Iones (ambiente)	Agua Nutrientes Hexosamina Moléculas antimicrobianas Iones (ambiente)	Agua Nutrientes Hexosamina Moléculas antimicrobianas Iones (ambiente)

N/D no descrito

¹(Donné y Dewilde, 2015); ²(Nett *et al.* 2007); ³(Mitchell, Zarnowski, y Andes, 2016); ⁴(Al-Fattani y Douglas, 2006);

⁵(Albuquerque y Casadevall 2012).

1.5 Formación de la biopelícula

La compleja arquitectura de una biopelícula es una de las primeras señales que indican que el desarrollo no es ni simple, ni uniforme (Hall-Stoodley *et al.* 2004), es decir, es un proceso dinámico y complejo que involucra una serie de pasos regulados por una red de señalizaciones conectadas a una gran variedad de rutas fisiológicas como la movilidad, adhesión y la comunicación controlada de célula a célula por la producción y secreción de moléculas difusibles, auto inducibles (comunicación microbiana o sistema de quorum sensing (QS)) como la acil-homoserina lactona y algunos oligopéptidos o en el caso de *C. albicans*, el farnesol, la respuesta al estrés, la virulencia y la producción de SPE (Albuquerque y Casadevall 2012) (Berlanga y Guerrero 2016) (Donné y Dewilde 2015). Durante la formación de las biopelículas se lleva a cabo el ciclo biológico de los microorganismo, donde cada uno de los estadios está regulado por el sistema QS, el microorganismo cambia su comportamiento de un estado libre desplazamiento o planctónico a un conglomerado de microorganismos adheridos, seguido del crecimiento y finalmente el desprendimiento y la dispersión de células (Figura 4) (Donné y Dewilde, 2015) (O'Toole *et al.* 2000). Cada uno de estos factores están relacionados con la estimulación de genes transcripcionales y/o metabólicos (Akers *et al.* 2015).



Figura 4. Ciclo de vida de una biopelícula bacteriana (Tomado y modificado de Abed SE y cols (Abed *et al.* 2012)).

Diversos estudios realizados muestran que la formación de las biopelículas es un proceso regulado de manera secuencial. En *P. aeruginosa* se han propuesto tres etapas (Cuadro 3) (Donné y Dewilde 2015) (Hall-Stoodley *et al.* 2012).

Cuadro 3. Ciclo biológico de la formación de la biopelícula en *P. aeruginosa*.

Etapa	Descripción
Adhesión	1. Reversible: Fase de contacto y adhesión libre o transitoria de células planctónicas a la superficie. 2. Irreversible: Fase de adhesión fuerte o intensa de las células previamente adheridas a la superficie.
Maduración	Crecimiento y agregación de nuevas células a la microcolonia formada.
Dispersión	Desprendimiento completo de la biopelícula y/o regreso a estado planctónico de algunas células.

La duración de cada una de las fases va a depender de diversos factores como la o las especies que la estén conformando, la disponibilidad de nutrientes y los factores ambientales (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

En las células fúngicas también se ha demostrado un evento similar al observado en las células procariotas, como se ejemplifica en la Figura 5, la capacidad de las células libres o planctónicas y las colonias multicelulares unidas por la SPE y adheridas a un sustrato (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

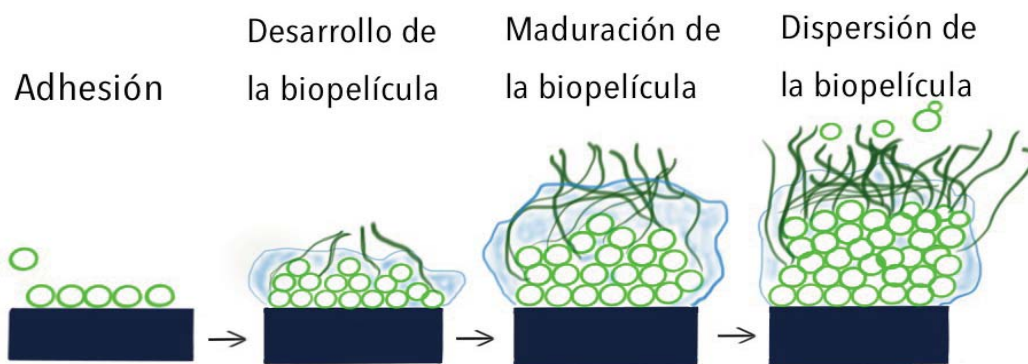


Figura 5. Ciclo de formación de una biopelícula establecida en especies de *Candida*. Tomado y modificado de Blankenship JR y Mitchell AP (Blankenship y Mitchell 2006).

1.5.1 Adhesión

En esta fase, las características de la superficie en la que se va a formar la biopelícula pueden influir en el desarrollo, por ejemplo, las superficies hidrofóbicas (plásticos) son más favorables que las superficies hidrofílicas (vidrio o metal) (McCarty *et al.* 2014). Los microorganismos planctónicos al detectar una superficie, buscan las condiciones más favorables debido a una respuesta fototáctica o quimiotáctica. Por otro lado, el movimiento browniano de los microorganismos provoca el contacto inicial con la superficie dando lugar a la etapa de adhesión; ésta se divide en dos fases: 1. Reversible o adhesión débil, ya que los microorganismos pueden separarse; 2. Irreversible o adhesión permanente, en este proceso influyen un gran número de interacciones físico-químicas como las fuerzas de Van Der Waals, enlaces de hidrógeno y otras fuerzas electrostáticas gravitacionales y la microtopografía del sustrato; además de los factores ambientales como la concentración de los nutrientes, el pH, la temperatura y algunos factores biológicos (Barraud *et al.* 2015) (Donné y Dewilde, 2015) (McCarty *et al.* 2014) (Sharma y Rao, 2002).

La interfase que se genera entre el componente sólido y la fase acuosa, crea un ambiente adecuado para la adhesión de los microorganismos (Donlan 2002). Este proceso se divide en dos etapas: A) evento predecible, la célula se comporta como una partícula coloidal; B) etapa que involucra la formación de los apéndices o flagelos, los cuales les permiten detectar y dirigirse hacia el sustrato; los apéndices se perderán y posteriormente se producirán las proteínas de adhesión y la SPE (Barraud *et al.* 2015) (Hermansson 1999) (Hori y Matsumoto, 2010). Otro de los factores que pueden determinar la adhesión está mediado por interacciones específicas y no-específicas. En las interacciones específicas se incluyen las proteínas de adsorción; mientras que en las interacciones no específicas las sustancias proteicas que no interactúan con un ligando específico. La adhesión es la fase más importante en el desarrollo de la biopelícula, ya que sin este paso esta estructura no se desarrollará (Hori y Matsumoto, 2010).

1.5.2 Crecimiento y maduración

En esta etapa del ciclo de vida, la biopelícula tomara una estructura compleja en tres dimensiones, durante la maduración mostrara regulación positiva, por ejemplo, en la fase de adhesión se da la síntesis de polisacáridos y posteriormente estos sirven como señal de reclutamiento para nuevas células, durante esta etapa, la biopelícula presenta una expresión genética diferenciada entre los genes metabólicos y los genes encargados de la producción de SPE y esto se puede dar por el gradiente de nutrientes o de oxígeno en el ambiente circundante, resultando en la formación de una estructura heterogénea (Barraud *et al.* 2015).

1.5.3 Dispersión

La última etapa en el ciclo biológico de las biopelículas es la dispersión, en la cual se da la liberación coordinada de las células diferenciadas y móviles, denominadas células de dispersión (Barraud *et al.* 2015). Las biopelículas presentan varias vías de liberación: a) desorción; b) desprendimiento y c) dispersión. La desorción consiste en una transferencia directa al medio circundante. El desprendimiento involucra diversas fuerzas externas como el aumento en la corriente del flujo, abrasión o erosión que ocasionarán una ruptura brusca en la estructura de la biopelícula; mientras que la dispersión es un proceso interno regulado por cambios fisiológicos y señalizaciones que generarán la degradación enzimática de SPE o de las proteínas de unión a la superficie (Berlanga y Guerrero, 2016) (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

El desprendimiento y dispersión de células especializadas es un evento activo en el ciclo de vida de la biopelícula; este proceso le permitirá la propagación y colonización de nuevos sustratos, promoviendo la regeneración y rejuvenecimiento de la población de los microorganismos en el núcleo de la biopelícula. Por otro lado, también se ha propuesto como un mecanismo evolutivo y adaptativo, generando así un nuevo ciclo de vida y por ende una nueva biopelícula. Para algunas especies el desprendimiento de la biopelícula se considera como parte de un sistema de muerte programada en una subpoblación celular de la microcolonia (Barraud *et al.* 2015) (Hall-Stoodley *et al.* 2004). En ambientes naturales la dispersión es un proceso costoso e incierto, ya que las células que se desprenden, se enfrentan a un entorno no controlado, aunque también puede ser perjudicial cuando no se presenta dispersión, ya que puede llegar a colapsar la comunidad sésil. La dispersión es dependiente de energía y está coordinada por un sistema regulado a través de vías de señalización, que se genera al interior de la biopelícula hacia el exterior o viceversa, los cuales son la respuesta a los diferentes cambios ambientales, logrando así la colonización de nuevos sustratos; además de manera externa otros microorganismos pueden generar señales que podrían influir en la dispersión. Las células que se liberan para la dispersión muestran un genotipo especializado y diferenciado a las células sésiles y planctónicas (Barraud *et al.* 2015).

1.6 Las biopelículas y su importancia

Ecosistemas. Las comunidades de microorganismos sésiles son parte importante en los ambientes acuáticos y marinos; en suelos y sedimentos. Estas estructuras están involucradas en los ciclos de diversos

nutrientes y en la degradación de la materia orgánica, e incluso algunas comunidades pueden utilizar metales en diversas vías metabólicas (Wang *et al.* 2016).

Biorremediación. Las biopelículas son utilizadas en el tratamiento biológico de las aguas residuales y suelos (Maksimova 2014).

Industria. Las biopelículas presentan un papel dual. A) Perjuicios: obstrucción, corrosión y deterioro de las tuberías y diversas maquinarias industriales, provocando la disminución en la eficiencia de dichas maquinarias. Las biopelículas a largo plazo en este tipo de instalaciones van a resistir a los agentes desinfectantes o antimicrobianos, comprometiendo la calidad del agua, alimentos y diversos productos de uso humano y como consecuencia generan pérdidas económicas y en ocasiones humanas. Por otra parte, las biopelículas formadas por microorganismos patógenos en redes de suministro de agua provocarán riesgos en la salud pública (Berlanga y Guerrero, 2016) (Donné y Dewilde, 2015) (Maksimova 2014). B) Beneficios: Las biopelículas pueden presentar grandes beneficios, ya que son utilizadas en la elaboración de diversos productos de uso comercial como alcoholes (etanol) o ácidos (acético o láctico), por diferentes procesos, principalmente por la vía de la fermentación (Berlanga y Guerrero, 2016) (Maksimova 2014).

Potencial agente infeccioso. En diversos ambientes médicos y hospitalarios, los microorganismos forman biopelículas como una estrategia de supervivencia para resistir a las células del sistema inmunológico del hospedero y la presencia de antimicrobianos. Diversas publicaciones muestran que más del 75% de las infecciones están relacionadas con el desarrollo de una biopelícula (Bryers 2008) (Donné y Dewilde 2015) (Gupta, Sharma, Jaiswal, y Sharma, 2016). Estas infecciones se pueden clasificar en dos:

- A. Desarrollo en tejidos, como en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística, endocarditis y en úlceras.
- B. Desarrollo en dispositivos médicos: catéteres, válvulas o implantes.

Estas estructuras pueden ser mono o multi-especie y presentar varias funciones como la resistencia a los antimicrobianos y el rechazo a implantes médicos y odontológicos. También se pueden encontrar en los dientes y en el estómago sin causar sintomatología (Beenken *et al.* 2004) (McCarty *et al.* 2014).

Los microorganismos al ingresar a un hospedero forman biopelículas con la finalidad de tener una protección contra el medio circundante. La incapacidad del sistema inmunológico para eliminar las biopelículas, radica en la deficiente penetración de los anticuerpos y de los diversos agentes tóxicos al interior de éstas por el efecto de barrera que proporciona la SPE (Figura 6) (Fux, Costerton, Stewart, y Stoodley, 2005). Por otro lado es

importante mencionar que si se presenta una infección en la cual esté relacionada una biopelícula no se exige que se puedan encontrar célula en estado planctónico (Parsek y Fuqua, 2004).

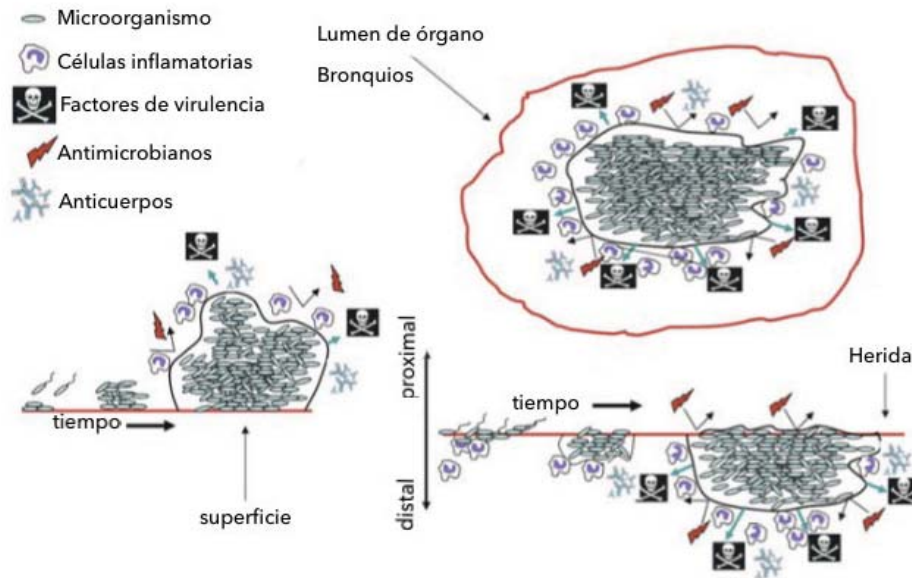


Figura 6. Diferentes tipos de formación de biopelícula en infecciones crónicas. En una superficie abiótica (dispositivo médico), en el lumen de un órgano (bronquios) o embebidos bajo una superficie (úlceras). Tomada y modificada de Bjarnsholt T (Bjarnsholt 2011).

1.7 Las biopelículas, interacciones y fuente de infección

Las interacciones que se presentan entre los diferentes organismos pueden ser de dos tipos: A) perjudiciales por lo menos para uno de los integrantes como en una relación patógena o parasitaria; B) las interacción positiva de tipo comensal o simbiótica, es benéfica para uno o todos los organismos implicados (Costerton 2007). En aspectos médicos y odontológicos, las biopelículas juegan un papel muy importante, tanto en la salud como en la enfermedad (Stacy, McNally, Darch, Brown, y Whiteley, 2016). En un sistema microorganismo–hospedero se da un gran número de interacciones: inicialmente la relación puede ser mutualista y/o simbiótica y eventualmente cambiar, es decir el microorganismo presenta una conducta patógena y llega a matar rápidamente al hospedero. Este tipo de proceso puede ser por la combinación de los factores de virulencia del microorganismo y la actividad del sistema inmunológico del hospedero, desarrollando una infección aguda o crónica (Parsek y Fuqua, 2004). Por otro lado, el tipo de infección que se va presentar dependerá de la vía de entrada del microorganismo al hospedero: si hay un crecimiento y proliferación rápida del microorganismo, generalmente está asociada con una infección aguda y microorganismos planctónicos; por

el contrario si se establece una comunidad de microorganismos de crecimiento más lento, como son las biopelículas, esto dará lugar a infecciones crónicas (Donné y Dewilde, 2015). Los cambios que se llegan a generar en los microorganismos son la modificación en su fenotipo, en su forma de crecimiento y propiciar la formación de una biopelícula (Hall-Stoodley *et al.* 2004), por ello es evidente que las biopelículas juegan un papel muy importante en el curso de una infección (Parsek y Fuqua, 2004). Para que se logre el desarrollo de una infección en la que esté involucrada esta estructura va a depender de diversos factores como: las señales ambientales y el estado inmunológico de hospedero, la integridad del tejido, los nutrientes y oxígeno disponibles para el microorganismo (Donné y Dewilde, 2015).

Actualmente, las infecciones en las que están involucradas las biopelículas representan un papel predominante en el control y detección oportuna de las infecciones nosocomiales, por lo que se han establecido cuatro criterios para considerar si una infección está causada por una biopelícula (Parsek y Fuqua, 2004):

1. Microorganismos adheridos a algún sustrato o superficie.
2. Microorganismos agrupados o en microcolonias observados en el tejido infectado mediante un examen directo.
3. La infección está localizada en un solo sitio.
4. La infección es difícil o imposible de erradicar

La mayoría de las infecciones causadas por una biopelícula son generadas por especies comensal o ubicuas (Cuadro 4).

1.8 *Candida* spp. y su papel en las infecciones

En el género *Candida* se han reconocido aproximadamente 200 especies, de las cuales 15 son las más comunes como causantes de infección en los humanos (Brandt y Lockhart, 2012) (Spellberg, Marr, y Filler, 2012). Este grupo de microorganismos es muy versátil, ya que presentan la capacidad de desarrollarse en diferentes microambientes del cuerpo humano (Spellberg *et al.* 2012) (Turner y Butler, 2014). La mayoría de las especies son comensales de las mucosas del sistema gastrointestinal, vagina y de la piel (Moran, Coleman, y Sullivan, 2012) (Spellberg *et al.* 2012).

Cuadro 4. Microorganismos formadores de biopelículas en diferentes superficies y causantes de infecciones (Baghdadi *et al.* 2016) (Donné y Dewilde, 2015) (Fernández-Barat y Torres, 2016) (Sampaio *et al.* 2016).

Tejidos	Especies
Caries	<i>S. mutans</i> (cocos Gram-positivos acidogénicos)
Periodontitis	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (Bacterias anaeróbicas Gram-negativas)
Otitis media	<i>Haemophilus influenzae</i>
Osteomielitis	Diversas especies de bacterias y hongos generalmente asociados a <i>S. aureus</i>
Neumonía (Fibrosis quística)	<i>P. aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cenocepacia</i>
Endocarditis	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.
Tracto biliar	Enterobacterias (<i>E. coli</i>)
Infecciones nosocomiales	
Neumonía en la UCI	Gram-negativos
Peritonitis por DPCA	<i>Candida</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>S. aureus</i> .
Catéter venoso central	<i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i>
Catéter urinario	<i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i>
Válvulas cardíacas	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.
Implantes ortopédicos	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.
Cánula endotraqueales	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i>
Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> y cocos Gram-positivo
Suturas	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>

UCI: Unidad de cuidados intensivos; DPCA: Diálisis peritoneal continua ambulatoria

1.8.1 Ubicación taxonómica

La caracterización taxonómica de las especies de *Candida* es muy compleja, ya que no comparten un mismo origen evolutivo (Turner y Butler, 2014). El gran tamaño y rango filogenético de este género lo hace aún más complejo. Por mucho tiempo la taxonomía se basó en las características morfológicas, fisiológicas y de reproducción. Actualmente con los métodos de secuenciación de ADN se han dilucidado las relaciones taxonómicas de este género (Criseo, Scordino, y Romeo, 2015) (Spellberg *et al.* 2012).

La clasificación taxonómica de acuerdo con la descripción de Hibbett DS y cols (Hibbett *et al.* 2007) es la siguiente:

Reino: Fungi
Subreino: Dikarya
Phylum: Ascomycota
Subphylum: Saccharomycotina
Clase: Saccaromicete
Orden: Saccharomycetales
Familia: Saccharomycetaceae
Género: *Candida*
Especies: *C. albicans*
C. glabrata
C. parapsilosis
C. krusei
C. guilliermondii
C. tropicalis

Los estudios filogenéticos moleculares han agrupado a la mayoría de las especies de importancia médica del género *Candida* en el clado CTG (especies que traducen CTG en serina en lugar de leucina) con la excepción de *C. glabrata* y *C. krusei*, como se muestra en la Figura 7 (Fitzpatrick *et al.* 2006) (Moran *et al.* 2012).

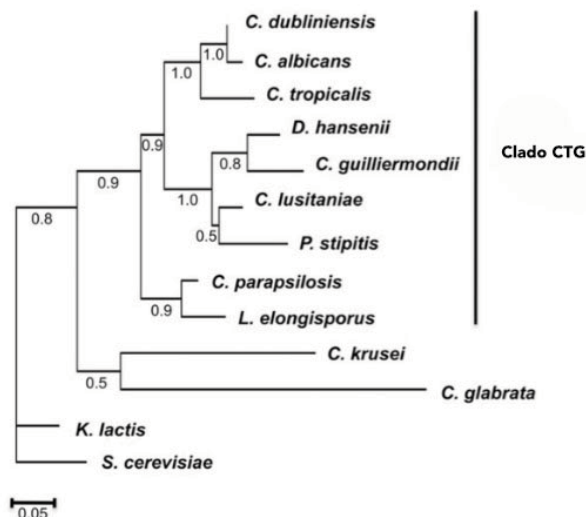


Figura 7. Árbol filogenético de las especies de importancia médica de *Candida* spp. Tomada de Moran y cols. (Moran *et al.* 2012).

Diferentes autores han observado la existencia de especies morfológicamente idénticas como:

- *Candida albicans*/*Candida dubliniensis*
- complejo de *Candida parapsilosis*.

En el primer caso ambas especies comparten un gran número de características fenotípicas, por ello se conocen como “hermanas gemelas” y la identificación molecular es el método más confiable para su diferenciación (Ahmad, Khan, Asadzadeh, Theyyathel, y Chandy, 2012). Por otro lado, el complejo de *C. parapsilosis* es un grupo de especies genotípicamente heterogéneo, formado por tres especies *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis sensu stricto* identificadas únicamente por estudios molecular (Figura 8) (Lattif *et al.* 2010) (Tavanti, Davidson, Gow, Maiden, y Odds, 2005). Los blancos moleculares especie – específicos para identificar a las especies de *Candida* son secuencias altamente conservadas como los genes que codifican para las subunidades de ARN ribosomal (5.8S, 18S, 28S), como por ejemplo los espacios internos transcripcionales (ITS) (Alam *et al.* 2014).

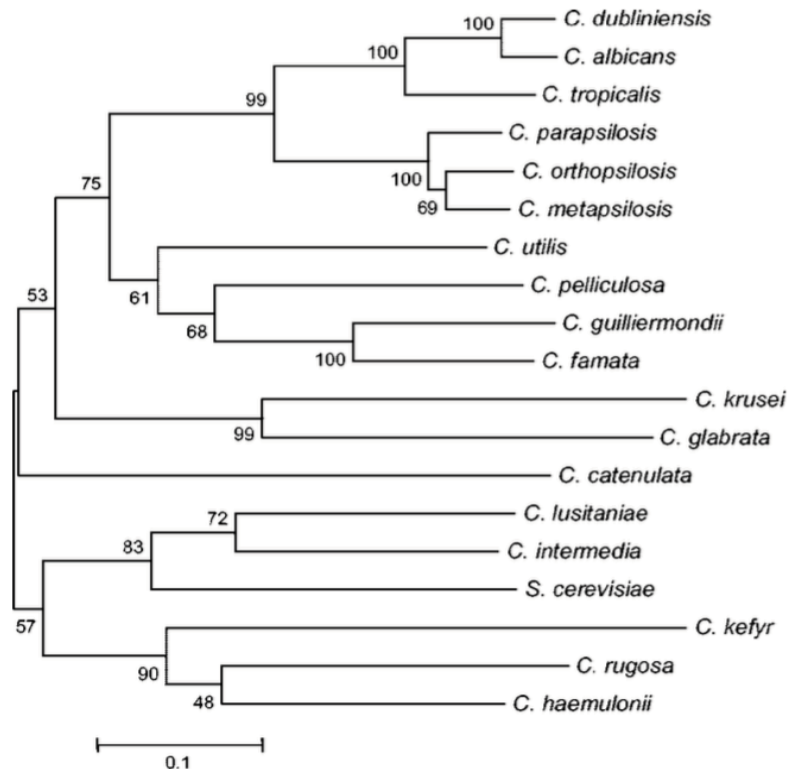


Figura 8. Árbol filogenético basada en la comparación de secuencias ITS. Los números indican el porcentaje de similitud. Tomado de Tavanti A. y cols (Tavanti *et al.* 2005).

1.8.2 Características generales e identificación de las especies de *Candida*

Las especies de *Candida* son levaduras unicelulares y solo algunas presentan la capacidad de formar pseudohifas y/o hifas (Hibbett *et al.* 2007) (Spellberg *et al.* 2012). En el Cuadro 5 se resume las características morfológicas y fisiológicas sobresalientes de 6 de las especies que están incluidas en este trabajo.

La identificación de las especies es fundamental en la clínica, principalmente porque cada una de ellas presentan diferentes patrones de sensibilidad a los antifúngicos, además del riesgo para desarrollar infecciones diseminadas e invasivas; evento que va a depender de la especie causal. Finalmente, una correcta identificación es indispensable para obtener datos epidemiológicos relacionados con la micosis y los agentes causales (Daef, Moharram, Eldin, Elsherbiny, y Mohammed, 2014) (Ellepola y Morrison, 2005).

Los métodos utilizados en el laboratorio para la identificación de *Candida* spp. incluyen características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y métodos moleculares (Figura 9) (Alam *et al.* 2014). Las técnicas para la identificación basadas ADN incluyen la amplificación de regiones conservadas como ITS y posteriormente la secuenciación o la obtención de patrones de corte específico para cada especie por enzimas de restricción (polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Alam *et al.* 2014).

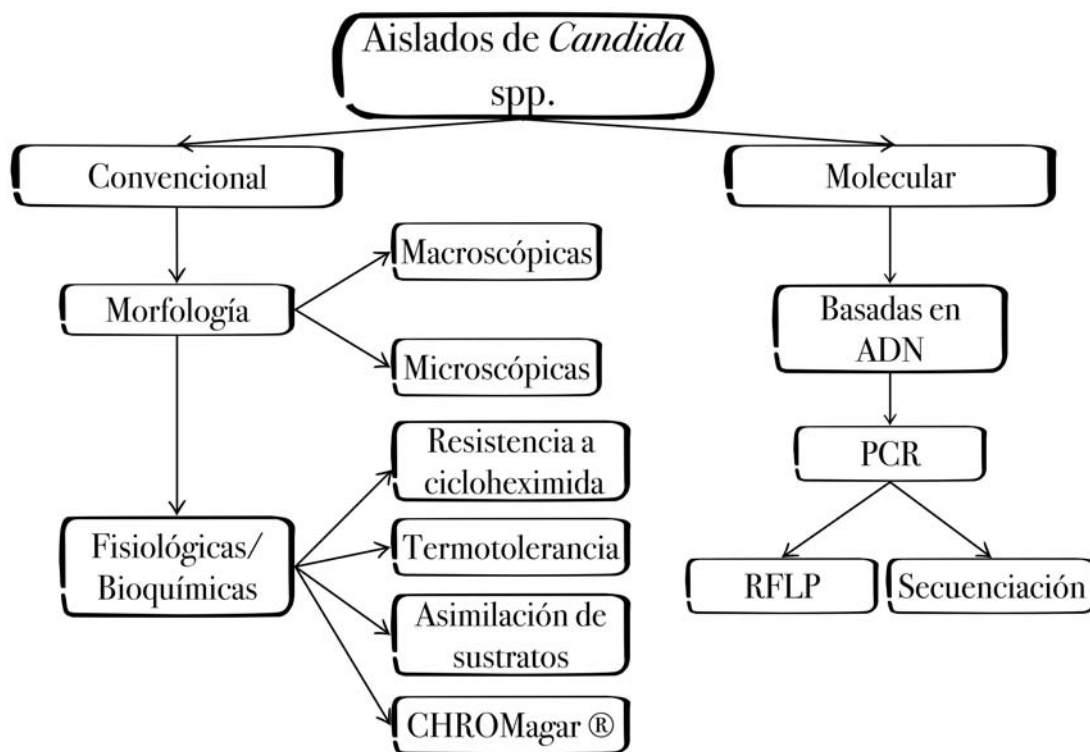


Figura 9. Métodos más comunes para la identificación de las especies de *Candida*.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; RFLP: Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción

Cuadro 5. Características morfológicas y fisiológicas para la identificación de algunas especies de *Candida* (Larone 2011) (Spellberg *et al.* 2012) (Sullivan, Westerneng *et al.* 1995) (Tavanti *et al.* 2005).

Morfología		Estructuras	Fisiología	CHROM agar®	Filamentación en suero	Importancia
Macroscópica	Microscópica					
<i>C. albicans</i> Colonias cremosas de superficie lisa, color blanco a crema	Células esféricas ovoides a elongadas uni o multigemantes (3.5-7 x 4-8 µm)	Blastoconidios Pseudohifas Hifas Clamidoconidios	Resistente a cicloheximida. Maltosa +	Verde claro	Forma tubo germinativo	Causante de candidosis invasiva (50-60%). Fenotípicamente similar a <i>C. dubliniensis</i>
<i>C. glabrata</i> Colonias pequeñas cremosas y brillantes; color blanco a crema	Células ovoides (2-3 x 3-4 µm)	Blastoconidios	Sensible a la cicloheximida. Glucosa y trealosa +	Púrpura	Solo levaduras	Candidemias, infección de vías urinarias (9.8%). Asociada a otras especies de <i>Candida</i> .
<i>C. guilliermondii</i> Colonias planas lisas o rugosas y brillantes; color blanco	Células ovoides o elongadas (2-5 x 3-7 µm)	Blastoconidios Pseudohifas	Resistente a cicloheximida. Dulcitol, rafinosa y meliobiosa +	Rosado	Solo levaduras	Endocarditis, osteomielitis, infecciones cutáneas y urogenitales
<i>C. krusei</i> Colonias opacas, planas y secas con halo de hifas; color crema	Células rectangulares (2-6 x 4-10 µm)	Blastoconidios Pseudohifas	Resistente a la cicloheximida. Galactosa, xilosa, trealosa, maltosa -	Rosa con margen blanco y superficie rugosa	Levaduras rectangulares	Candidosis invasiva 3%
<i>C. parapsilosis</i> complejo Colonias cremosas, opacas, color blanco	Células ovoides (2.5-4 x 3-8 µm)	Blastoconidios Pseudohifas Hifas	Sensible a la cicloheximida. Rafinosa y ácido láctico -	Rosa pálido	Solo levaduras	Candidosis sistémica en neonatos y candidemias relacionadas con el uso de catéteres
<i>C. tropicalis</i> Colonias cremosas lisas con halo filamentoso. Color blanco a crema	Células redondas, ovoides o elongadas (3.5-7 x 5.5-10 µm)	Blastoconidios Pseudohifas Hifas	Resistente a la cicloheximida. Rafinosa, ácido láctico y sacarosa -	Azul acero	Levaduras y pseudohifas	Candidemia 9.8% y mortalidad 44.5%

1.8.3 Factores de virulencia

Los hongos patógenos tienen varias estrategias que les ayudan en la colonización de superficies e invasión de tejidos (Pais *et al.* 2016). *Candida* (principalmente *C. albicans*) es un hongo que ha sido ampliamente estudiado por la habilidad que tiene para colonizar e infectar diversos nichos. Esta capacidad es el resultado del gran número de factores de virulencia que posee (Mayer, Wilson, y Hube, 2013). Los factores de virulencia son moléculas producidas por los microorganismos para ayudar a infectar los tejidos del hospedero (Schaechter, Medoff, y Eisenstein, 1993); éstos son expresados durante el establecimiento de la infección. La finalidad es favorecer al hongo para evadir al sistema inmune, sobrevivir, dividirse y diseminarse en los tejidos del hospedero; además interactúa directamente con las células para causar daño tisular (Calderone y Fonzi, 2001) (Kumamoto y Vinces, 2005a) (Yang 2003).

Los factores de virulencia que se han descrito en *C. albicans*, son: A) adhesión e invasión; B) producción de enzimas proteolíticas; C) dimorfismo (levadura – hifa); D) cambio fenotípico (“switching”); y E) formación de biopelículas (Cuadro 6). Otros factores descritos son la rápida adaptación a las fluctuaciones de pH ambiental, flexibilidad metabólica y un sistema altamente eficiente para responder al estrés (Kumamoto y Vinces, 2005a) (Mayer *et al.* 2013).

El cambio fenotípico es un evento que se ha relacionado con la virulencia, donde el morfotipo opaco presenta la mayor capacidad para colonizar la piel y son menos virulentos que el morfotipo blanco (Yang 2003).

Cuadro 6. Factores de virulencia descritos en *Candida albicans*.

Factor de Virulencia	Función	Familia genes	Descripción	Referencia
Adhesinas	Grupo de proteínas mediadoras de adhesión entre <i>Candida</i> , con otros microorganismo, células del hospedero y superficies abióticas	<i>ALS</i>	“Agglutinin-like sequence”. Principal proteína mediadora de la adhesión	(Calderone y Fonzi, 2001) (Hoyer y Cota, 2016) (Mayer <i>et al.</i> 2013) (Sundstrom 1999) (Yang 2003)
		<i>HWP</i>	“Hyphal wall protein”, proteína involucrada en la adhesión del tubo germinativo	(Mayer <i>et al.</i> 2013) (Sundstrom 1999) (Yang 2003)
Enzimas proteolíticas	Grupo de enzimas que facilitarán la penetración a las células del hospedero	<i>SAP1-10</i>	Proteasas que facilitan la penetración y actividad proteolítica	(Kumamoto y Vincens, 2005b) (Mayer <i>et al.</i> 2013) (Schaller <i>et al.</i> 2003) (Yang 2003)
		Fosfolipasa (A,B,C,D)	Contribuyen a la patogenicidad por medio de la ruptura de la membrana celular del hospedero	(Mayer <i>et al.</i> 2013) (Yang 2003)
		<i>LIP1-10</i>	Lipasas	(Mayer <i>et al.</i> 2013)
Dimorfismo	Cambio morfológico, de levadura a pseudohifa e hifa, controlado por proteínas y factores transcripcionales. Las hifas invaden las células y levaduras colonizan superficies	<i>Efg1</i>	Factor transcripcional	(Kumamoto y Vincens, 2005b) (Mayer <i>et al.</i> 2013) (Pais <i>et al.</i> 2016) (Yang 2003)
		<i>HGC1</i>	Proteína que se expresa en la levadura hasta el momento de la morfogénesis	
		<i>Cph1</i>	Factor transcripcional y participación en el acoplamiento de las pseudohifas	
		<i>Tup1p</i>	Control negativo para la producción de hifas	
Cambio fenotípico “Switching”	Diferencia en el fenotipo de las colonias blanco-opaco, generando cambio entre ambas, como el arreglo de los cromosomas	Fenotipo blanco: <i>Sap2</i> , <i>WH11</i> , <i>EFG1</i>	Macroscópicamente: colonias suaves y de color blanco Microscópicamente: células redondas u ovaladas	(Calderone y Fonzi, 2001) (Yang 2003)
		Fenotipo opaca <i>OPA1</i> <i>Sap3</i>	Macroscópicamente : colonias de color gris Microscópicamente: células elongadas	
Biopelículas	Estructura de resistencia que le permite sobrevivir en el hospedero, evadir al sistema inmune y resistir a los fármacos	<i>Als3</i>	Adhesión y formación de la biopelícula	(Mayer <i>et al.</i> 2013) (Pais <i>et al.</i> 2016) (Spellberg <i>et al.</i> 2012)
		<i>Hwp1</i>	Adhesión y formación de la biopelícula	
		<i>Hsp90</i>	Proteína de choque térmico, regula la dispersión de las células y resistencia a los antifúngico	

En la Figura 10 se ejemplifica la secuencia de los factores de virulencia que intervienen en la formación de la biopelícula sobre diferentes superficies.

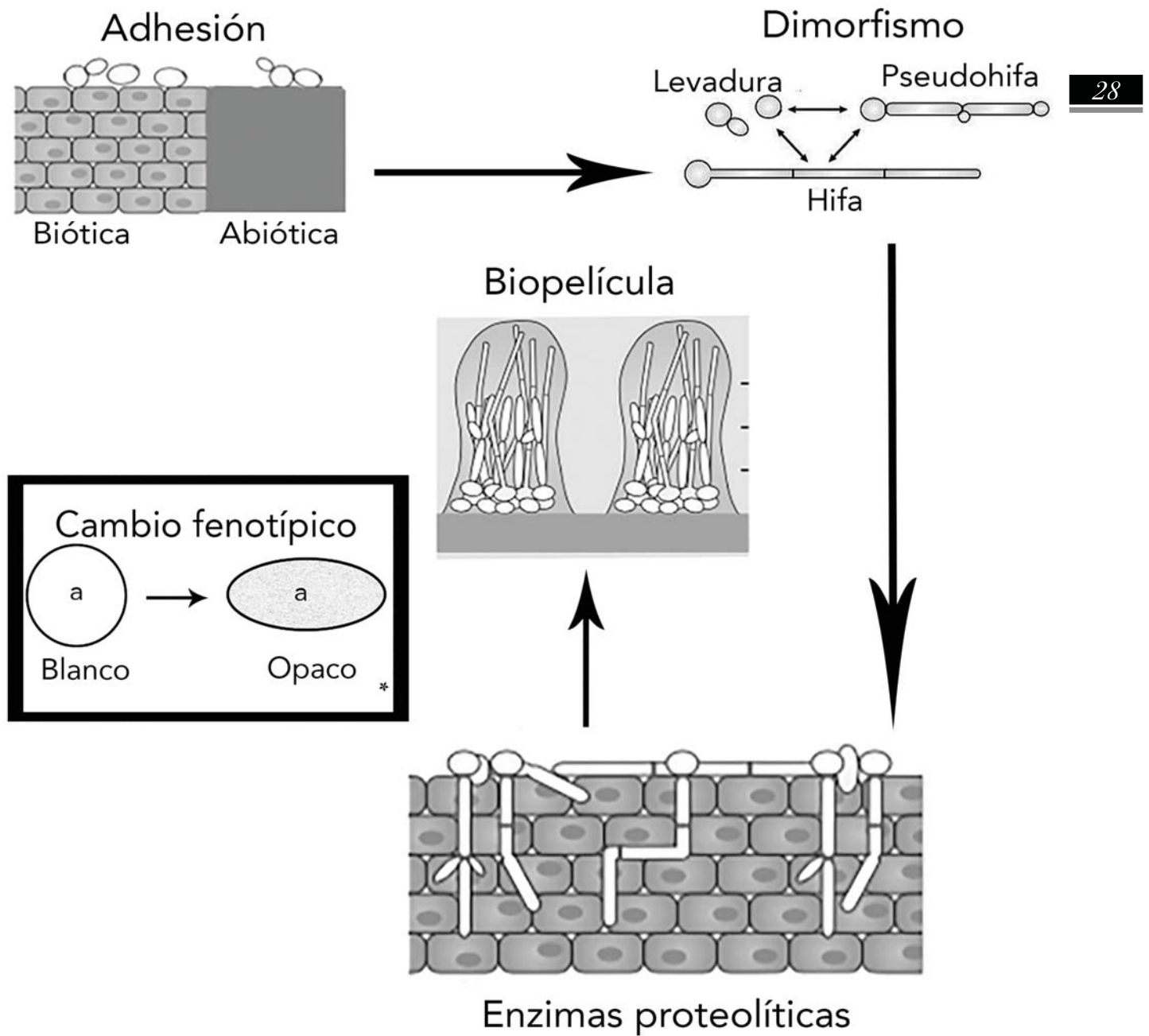


Figura 10. Secuencia de eventos y la integración de factores de virulencia de *Candida* en la formación de una biopelícula. *El cambio fenotípico o “switching” es un fenómeno que solo se ha observado *in vitro*. Imágenes tomadas y modificadas de Nobel SM y cols (Noble, Gianetti, y Witchley, 2017).

1.9 Biopelículas de *Candida* spp.

Las especies de *Candida* presentan la capacidad de adherirse a diferentes células (epiteliales y endoteliales) y superficies inertes. Esta característica juega un papel muy importante en la patogénesis microbiana de estas especies, confiriéndole el prerrequisito para desarrollar biopelículas (Baillie y Douglas, 1999).

A diferencia de las bacterias, la mayoría de las especies de este género son dimórficas, de tal manera que las biopelículas desarrolladas pueden estar conformadas por blastoconidios, pseudohifas, hifas o la combinación de éstas. La composición y arquitectura de la superficie celular de las estructuras de *Candida* son más grandes y diferentes a las bacterias permitiendo la sedimentación de las células más rápido y el desprendimiento es más fácil (Baillie y Douglas, 1999).

Algunos autores han reportado que las biopelículas por *Candida* pueden presentar varias alternativas, dependiendo de la configuración del locus de “mating type”: A) relacionadas con patogenia y B) vinculadas con la reproducción teleomorfa (sexual) (Soll y Daniels, 2016), además se ha observado que las especies de *Candida* no-*albicans* presentan una mayor capacidad de formación de biopelículas en comparación con *C. albicans* (Akers *et al.* 2015) (Soll y Daniels, 2016); otro de los hallazgos observados es la ausencia de formación de biopelículas de algunos aislados, aún no existe suficiente evidencia que demuestre la relación entre la capacidad de formar biopelícula y la mortalidad de los pacientes (Akers *et al.* 2015).

Hawser y Duglas en 1994 describieron el primer protocolo de investigación de las biopelículas formadas por *Candida* (Hawser y Douglas, 1994).

El desarrollo de las biopelículas de *Candida* spp. *in vitro* está formado por diferentes componentes que se interrelacionan (Singh *et al.* 2011) (Soll y Daniels, 2016):

- Inóculo: Levaduras en estado planctónico.
 - Superficie: sustrato biótico o abióticos, los cuales presentan diversas características (cargas electrostáticas, hidrofobicidad, rugosidad y composición química).
 - Medio ambiente en el que se desarrolla:
 - Medio de cultivo
 - Temperatura
 - Agitación
-

La gran variedad de modelos que actualmente se utilizan para desarrollar las biopelículas limita la comparación de los diferentes resultados obtenidos en los diversos estudios (Soll y Daniels, 2016).

1.10 Patogenia de *Candida* spp.

Las diversas especies de *Candida* tienen la capacidad de colonizar e invadir diferentes nichos, esto es gracias al gran número de factores de virulencia y atributos que presentan, ocasionando diferentes infecciones agudas y/o crónicas (Mayer *et al.* 2013) (Wang, van de Veerdonk, y Netea, 2016). Estas infecciones se dividen en:

- Infecciones superficiales
 - Piel.
 - Mucosas (vulvovaginitis, candidosis orofaríngea).
- Infecciones invasivas. *Candida* spp. tiene la capacidad de infectar torrente sanguíneo y eventualmente invadir tejidos profundos y órganos.

Para que *Candida* cause estas infecciones, es fundamental que el hospedero presente algún factor de riesgo; este evento genera modificación en el microambiente, lo que favorece el cambio en el estado del microorganismo, de comensal a patógeno, permitiendo la invasión a los tejidos. En el Cuadro 7 se muestra diversos factores de riesgo que contribuyen en el proceso de la infección. En la mayoría de los casos puede presentarse la asociación de más de un factor, como por ejemplo en las candidemias están relacionadas con enfermedades adyacentes, la aplicación de diversos tratamientos, aunado al uso de catéteres (Berdal *et al.* 2014) (Morrell, Fraser, y Kollef, 2005) (Quindós 2014) (Spellberg *et al.* 2012).

Cuadro 7. Factores de riesgo para desarrollar una candidosis invasiva.

Origen	Factor de riesgo	Origen	Factor de riesgo
Padecimientos	Neoplasias	Tratamientos	Antibióticos de amplio espectro
	Neutropenia		Nutrición parenteral
	Diabetes		Quimioterapia
	Falla renal		Cortico esteroides
	Múltiples cirugías		Hemodiálisis
	Quemaduras		Uso de dispositivos médicos
	Trasplante de órganos		
	Tiempo prolongado de hospitalización		

1.10.1 Catéteres

La palabra catéter se deriva del griego *kathiénai* que significa “meter en” o “enviar”, su utilización data desde los egipcios (1,500 AC), los cuales eran tubos elaborados de diversos materiales como plantas (papiro) o metal (bronce) (Feneley, Hopley, y Wells, 2015) (García *et al.* 2003) insertados en cavidades corporales, conductos, vasos o tejidos y permite el acceso de manera cómoda y de forma prolongada a las venas. Las funciones son diversas: 1) a nivel central, para el drenaje o inyección de líquidos; 2) con fines terapéuticos y/o profilácticos para la administración de soluciones, medicamentos, hemocomponentes. Actualmente, los catéteres son elaborados de diversos materiales plásticos y pueden ser utilizados en niños y adultos (Figura 11) (Carruthers 1991) (Huang y Abrahm, 2013) (Secretaría de Salud 2012) .

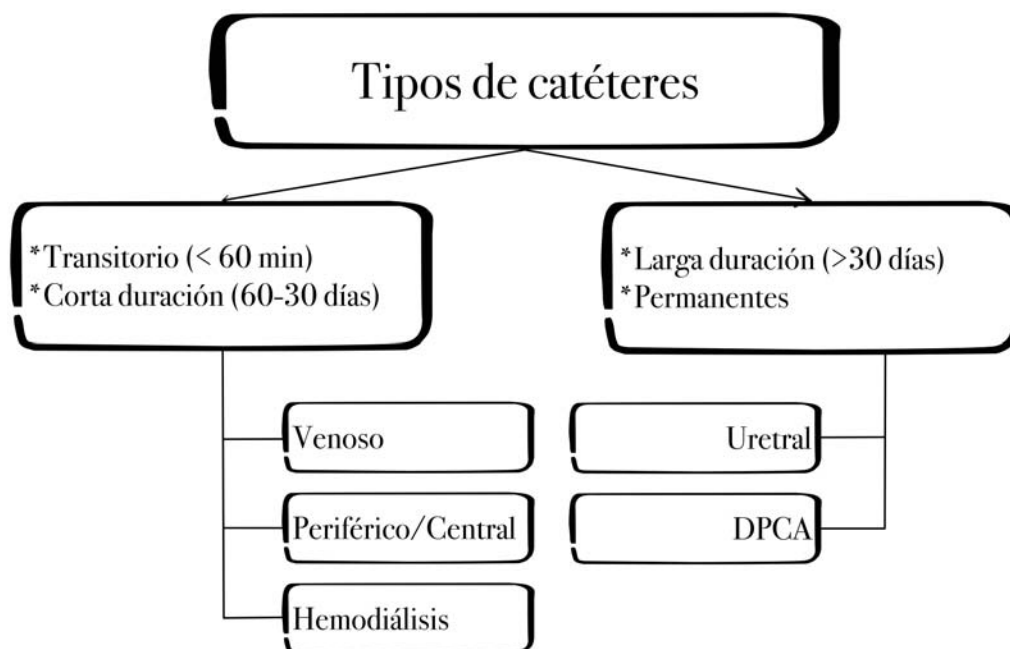


Figura 11. Clasificación de los catéteres por su localización y permanencia en el hospedero (García *et al.* 2003). DPCA: diálisis peritoneal continua ambulatoria.

Beheshti MV reportó que en Estados Unidos de América (EUA) se colocaron 15 millones de catéteres anualmente, incluyendo líneas venosas centrales, catéteres para diálisis y catéteres periféricos (Beheshti 2011). En México, al 85% de los pacientes hospitalizados se les colocó algún dispositivo intravenoso (Secretaría de Salud 2011) .

El catéter urinario tipo Foley es uno de los dispositivos ampliamente utilizado en los pacientes hospitalizados (Osuna-Huerta *et al.* 2009); en EUA se estima que del 12 al 16% de los pacientes se les aplicó este catéter, mientras que en México fue el 20% (Secretaría de Salud 2011).

Los materiales utilizados para la fabricación de los catéteres deben de estar diseñados para resistir la adhesión de los microorganismos, incorporando antibióticos o iones de plata para prevenir la formación de biopelículas. Estos componentes pueden interferir en el sistema de QS y evitar la formación de la biopelícula. La finalidad es inhibir las infecciones relacionadas al uso de catéteres (Stamm y Norrby, 2001). Además la utilización, colocación y mantenimiento adecuado del catéter disminuye las complicaciones asociadas a éstos y aumenta la calidad de vida de los pacientes (Huang y Abrahm, 2013). Sin embargo, diversos reportes confirman que no importa el material de los dispositivos médicos, ya que todos son susceptibles de ser colonizados por microorganismos y posible fuente de infecciones (Colvin *et al.* 2012).

Diversos investigadores han demostrado que la colonización de los catéteres venosos de corto plazo normalmente se desarrolla en la salida del catéter, mientras que los de largo plazo se ubican en el cono. Los patógenos pueden estar en el lumen o en la parte externa del catéter y eventualmente migrar hacia el torrente sanguíneo y causar una septicemia (Figura 12) (Abebe *et al.* 2014).

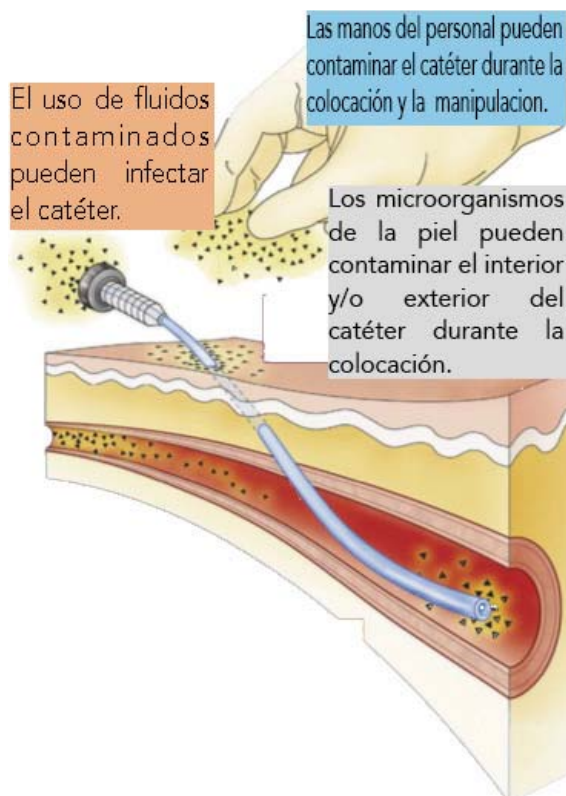


Figura 12. Vías de contaminación de los catéteres. Tomado y modificado de Abebe y cols (Abebe *et al.* 2014).

El material con el que son elaborados se recomienda que sean lisos, por ejemplo el poliuretano (Osuna-Huerta *et al.* 2009). La características macro, micro y nano estructurales de los catéteres, así como la composición química y su topografía, van a tener un efecto directo sobre el comportamiento de los microorganismos (Cuadro 8) (Campoccia, Montanaro, y Arciola, 2013).

Cuadro 8. Catéteres más comunes, el material de elaboración y riesgos infecciosos.

Catéter	Función	Material	Riesgo	Agentes infecciosos más comunes
Venoso Central 1, 2, 3, 4, 5 6	Acceso a las venas para nutrición parenteral	Poliuretano, algunos pueden tener plata/antibióticos	Colonización de la punta del catéter. En EUA se utilizan 15 millones de dispositivos/año En México en el 85% de los pacientes hospitalizados	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa, <i>S. aureus</i> , Enterobacterias Gram-negativas y <i>Candida</i> spp.
Tipo Tenckhoff 1, 7	Diálisis peritoneal	Silicón	Infecciones en el lugar de salida, túnel, sepsis	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa, <i>S. aureus</i> ,
Tipo Mahurkar 1, 8	Hemodiálisis	Poliuretano flexible radiopaco	N/D	<i>Pseudomonas</i> spp., Bacilos Gram-negativos, <i>Candida</i> spp.
Urinario tipo Foley 9, 10, 11, 12	Manejo retención de incontinencia urinaria	Látex, plásticos y silicón	En EUA, la aplicación es del 12-16% y en México del 20%. En EUA el 40% de las infecciones se asocian al uso de este catéter. Muertes/año: 13,000	N/D

N/D: No descrito

¹(Abebe *et al.* 2014), ²(Beheshti 2011), ³(García *et al.* 2003), ⁴(Huang y Abrahm, 2013), ⁵(Huang y Abrahm, 2013), ⁶(Secretaría de Salud 2011), ⁷(Karátson *et al.* 1992), ⁸(Woo y Rowe, 2014), ⁹(Hunter 1995), ¹⁰(CDC 2016), ¹¹(Schuur, Chambers, y Hou, 2014), ¹²(Stamm y Norrby, 2001)

I.II Epidemiología de las Infecciones por *Candida*

Mundialmente, las infecciones nosocomiales son un problema de salud de alta morbilidad y mortalidad (Percival, Suleman, y Donelli, 2015). En la última década se ha observado un incremento en los costos de atención en los diversos sistemas de salud (Carter, Pouch, y Larson, 2014) (Percival *et al.* 2015). El 5% de los pacientes hospitalizados presentan alguna infección; de éstos el 10% van a desarrollar una infección sanguínea, el 10% serán ocasionadas por algunas especies de *Candida*. Por ello, desde 1980 en Europa y en los EUA se

considera la cuarta causa de infecciones hematológicas (Quindós 2014) (Spellberg *et al.* 2012). La infección por *Candida* spp. varía entre regiones geográficas y países (Berdal *et al.* 2014); en general, la incidencia de la candidosis invasiva ha mostrado un incremento desde la década de 1990, de 8 a 10 casos/100,000 habitantes. Sin embargo en Australia y Canadá se ha observado una disminución de estas infecciones (Figura 13) (Quindós 2014).

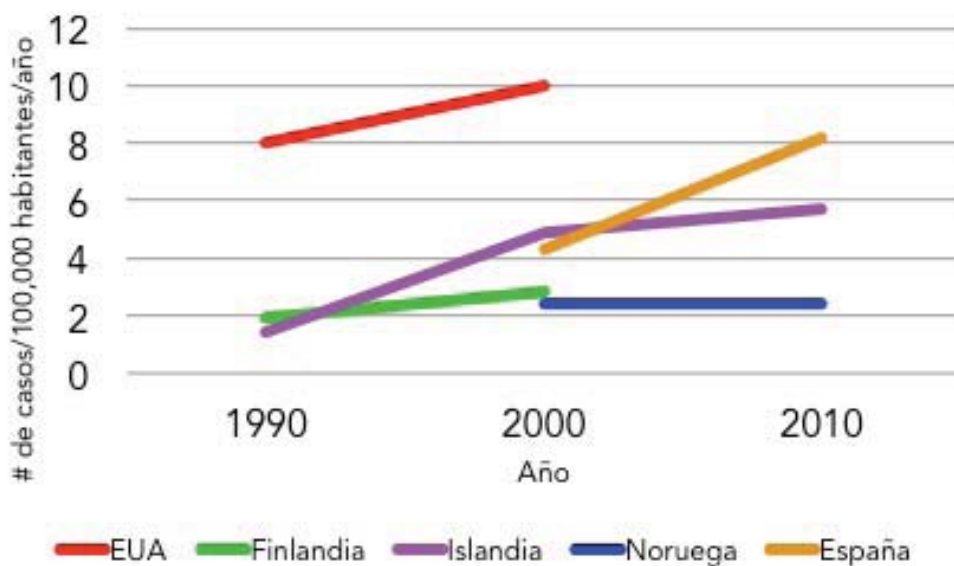


Figura 13. Incidencia mundial de las infecciones por *Candida* spp. en las últimas dos décadas (Quindós 2014).

Por otro lado, en América Latina se ha reportado una incidencia de 0.33 a 1.96 casos por cada 1,000 admisiones hospitalarias/año (Figura 14) (Nucci *et al.* 2013) (Quindós 2014). En EUA la frecuencia de las infecciones hematológicas por *Candida* se han incrementado del 8% al 12% en un periodo de 7 años (1995 a 2002). En la región del sur de EUA, la incidencia de las candidosis en pacientes hospitalizados se reporta 19 a 26 casos por cada 100,000 habitantes (Pfaller *et al.* 2014).

La aplicación de catéteres es uno de los factores más importantes relacionados con el incremento de este tipo de infecciones. En EUA se calcula entre 200,000 a 400,000 episodios de infecciones relacionados con la aplicación de catéter venoso central (CVC). En el Reino Unido aproximadamente son 1'000,000 de casos por año (Percival *et al.* 2015) (Zakhour, Chaftari, y Raad, 2016). La permanencia del CVC por más de 14 días, está asociada directamente con fiebre de origen infeccioso (Osuna-Huerta *et al.* 2009), lo cual ocasiona el aumento en la morbilidad, retraso en el tratamiento primario, estancias más prolongadas en el hospital y mayor

mortalidad (Zakhour *et al.* 2016). La incidencia de los episodios de infecciones relacionadas al uso de dispositivos médicos varía entre el 1.7 y 44.6 infecciones por 1,000 días/catéter, dependiendo del catéter (Allegranzi *et al.* 2011).

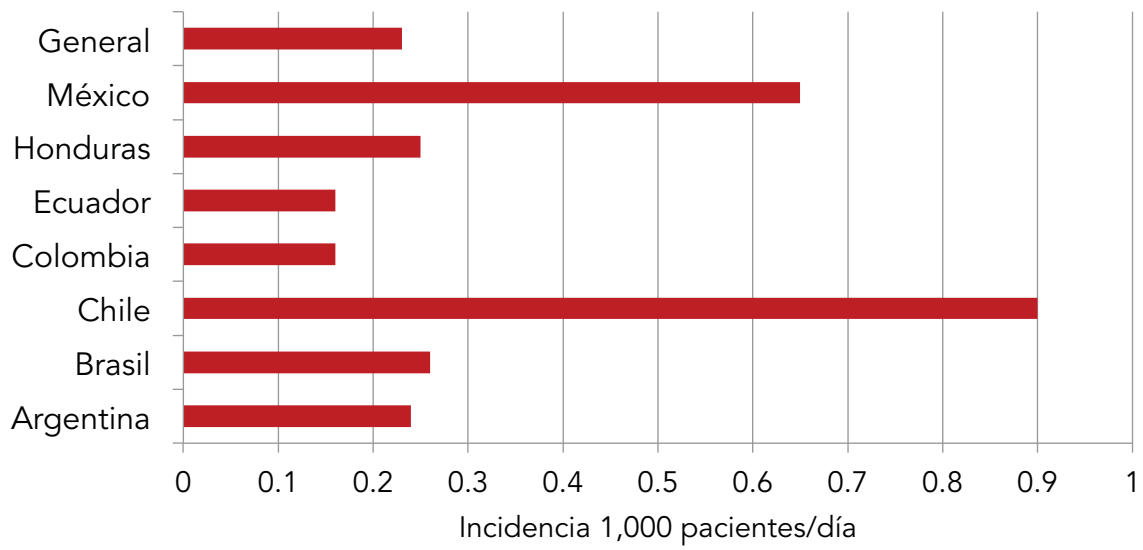


Figura 14. Incidencia de las infecciones por *Candida* spp. en América Latina. (Nucci *et al.* 2013) (Reséndiz-Sánchez y Morales-Aguirre, 2007).

El riesgo de desarrollar una infección asociada a los dispositivos médicos va a depender de los factores de riesgo del hospedero, del tipo de catéter y de las buenas prácticas del personal médico (Osuna-Huerta *et al.* 2009)(Zakhour *et al.* 2016), ya que el 70% de las infecciones asociadas a los cuidados de la salud pueden ser prevenibles con la aplicación de mejores prácticas por el personal de cuidados de la salud (Carter *et al.* 2014). El 40% de las infecciones nosocomiales están relacionadas con el uso de dispositivos médicos (Duszyńska *et al.* 2016). El personal médico debe de seguir una serie de lineamientos para evitar la colonización del catéter, la cual se puede generar por la pérdida de la integridad de la piel en el sitio de la colocación y por el uso de soluciones parenterales contaminadas (Osuna-Huerta *et al.* 2009). Un gran número de estas infecciones están relacionadas con procedimientos invasivos, el uso de los CVC y catéter urinario, contaminación cruzada persona - persona o por la diseminación después del manejo de material contaminado o fómites (Carter *et al.* 2014). Los pacientes con enfermedades hematológicas o que han recibido trasplantes de órganos, neoplasias o con algún grado de inmunosupresión son los que presentan mayor riesgo para desarrollar estas infecciones (Zakhour *et al.* 2016). En pacientes oncológicos, las infecciones asociadas al uso de catéter causan del 12 al 40% de mortalidad (Zakhour *et al.* 2016).

Allegranzi B y cols en el 2011 publicaron un estudio comparativo de los índices de incidencia observados por diferentes asociaciones de vigilancia de las infecciones nosocomiales, relacionadas al uso de dispositivos médicos, en algunos países en vías de desarrollo se estimó el 47.9, mientras que en EUA 13.6 por cada 1,000 pacientes-días (Figura 15) (Allegranzi *et al.* 2011).

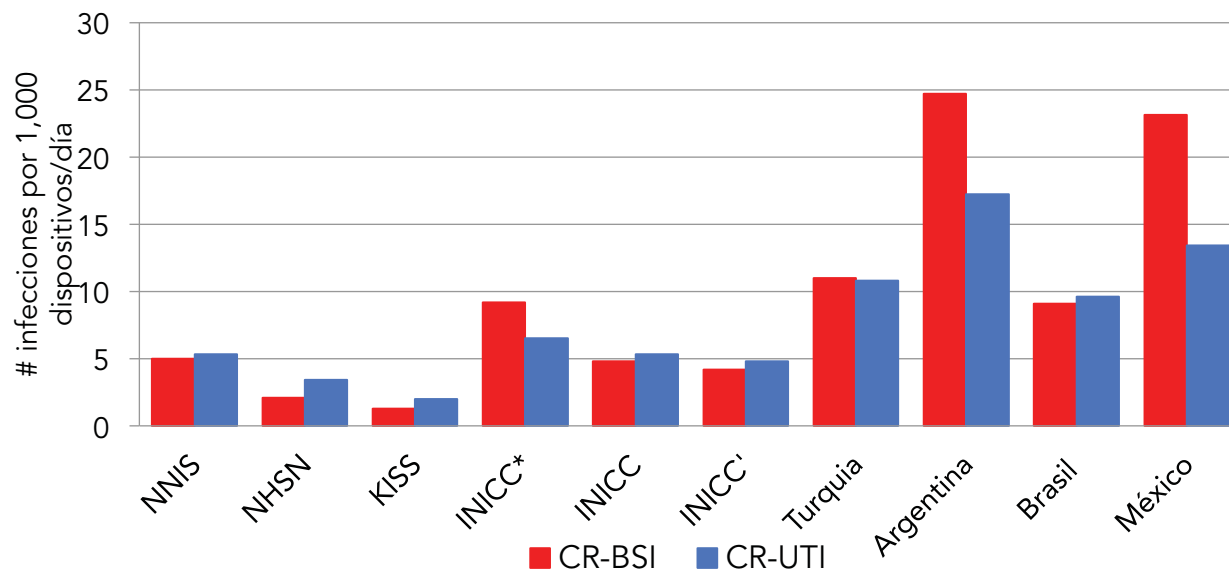


Figura 15. Incidencia comparativa de infecciones nosocomiales relacionadas con el uso de CVC y catéter urinario en diferentes países.

CR-BSI: Infecciones relacionadas con catéter venoso, CR-UTI: Infecciones relacionadas con catéter urinario; NNIS: National Nosocomial Infection Surveillance EUA; NHSN=National Healthcare Safety Network, EUA; KISS: Krankenhaus Infektions Surveillance System, Alemania (Sistema de vigilancia de infecciones de hospital); INICC: International Nosocomial Infection Control Consortium.(Allegranzi *et al.* 2011) (Ramírez Barba *et al.* 2006) (Rosenthal, Guzmán, y Crnich, 2004) (Salomao *et al.* 2008).

La tasa de mortalidad asociada a la candidosis invasiva se estimó en 0.4 muertes por cada 100,000 habitantes en el periodo de 1997 a 2003 (Spellberg *et al.* 2012). Mundialmente, estas infecciones causan del 40 al 70% de las defunciones (Alangaden 2011) (Berdal *et al.* 2014). En Alemania se ha reportado la mortalidad más baja (11%) (Tragiannidis *et al.* 2012), mientras que en Corea la más alta (96%) (Han et al. 2010). En EUA la tasa de mortalidad fue del 10 al 49% (Pfaller y Diekema, 2010) y en Centro y Sudamérica del 36 al 61% (Enoch *et al.* 2017).

1.11.1 Infecciones invasivas causadas por *Candida spp.* en México

En México, el número de candidosis invasiva registrado no se conoce con exactitud, ya que hay una falta de recursos para el diagnóstico oportuno de estas infecciones y no es de reporte nacional (Méndez-Tovar *et al.*

2016). Actualmente, se ha calculado una incidencia de 0.65/1,000 días de estancia (Reséndiz-Sánchez y Morales-Aguirre, 2007). A nivel mundial, las especies de *Candida* ocasionan entre el 33 al 80% de las fungemias, mientras que en México, en un periodo de 10 años, se encontró el 44% (Gaona-Flores, Campos-Navarro, Cervantes-Tovar, y Alcalá-Martínez, 2016). La mortalidad observada fue del 60% (Cornely *et al.* 2015).

En un estudio en el cual se incluyeron 54 hospitales generales a nivel nacional, reportaron que el uso de algún tipo de dispositivo médico aumentó hasta un 83% la probabilidad de adquirir una infección nosocomial, de las cuales el 5% fueron por *Candida* spp. (Secretaría de Salud 2011).

1.11.2 Relación entre infecciones asociadas a dispositivos médicos y el microorganismo causal

Diversos autores han encontrado poca o nula correlación entre la formación de las biopelículas *in vitro* y las infecciones (Stepanovic, Vukovic, Dakic, Savic, y Svabic-Vlahovic, 2000). Las bacterias aisladas con mayor frecuencia en estas infecciones son: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *P. aeruginosa*. De los hongos, las especies de *Candida* son las más importantes (Cuadro 9) (González, Elizondo, y Ayala, 2008) (Osuna-Huerta *et al.* 2009) (Méndez-Tovar *et al.* 2016) (Percival *et al.* 2015) (Tumbarello *et al.* 2007). La distribución de la frecuencia de las especies varía por regiones geográficas (Spellberg *et al.* 2012) (Tournu y Van Dijck, 2012) (Turner y Butler, 2014).

Mundialmente, *Candida* spp. se han considerado como los principales hongos causantes de infecciones intrahospitalarias, especialmente en los pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCIs), las cuales inician a las 48 h de ser admitidos (Alangaden 2011) (Pfaller *et al.* 2012).

En las últimas décadas se ha visto un cambio en la epidemiología de *C. albicans* con un decremento del 70% al 60% de las infecciones (Tournu y Van Dijck, 2012), mientras que en los EUA, otras especies *Candida* no-*C. albicans* presentan un incremento en la frecuencia desde 1990. En América Latina las principales especies de *Candida* no-*C. albicans* son *C. glabrata* y *C. parapsilosis* (Spellberg *et al.* 2012) (Tavanti *et al.* 2005). Estas especies están asociadas a la formación de biopelículas en diferentes sustratos como tejidos y dispositivos médicos (Cuadro 9) (Tournu y Van Dijck, 2012).

Cuadro 9. Relación entre las especies más comunes de *Candida* y la región geográfica.

Especies	Porcentaje	Región geográfica
<i>C. albicans</i>	65	Mundial
<i>C. glabrata</i>	11.3	Canadá, EUA
<i>C. tropicalis</i>	7.2	Taiwán
<i>C. parapsilosis</i>	6.00	Turquía
<i>C. krusei</i>	2.4	Mundial

1.12 Diagnóstico y tratamiento

En general, las infecciones invasivas por *Candida* son de difícil diagnóstico clínico, los signos y síntomas son similares a otras infecciones nosocomiales. Las infecciones por biopelículas son un problema emergente y son un reto en el diagnóstico, ya que no hay una prueba microbiológica específica para la confirmación de la infección en el laboratorio (Ellepola y Morrison, 2005) (Hall-Stoodley *et al.* 2012). Para la demostración se requiere de la identificación de *Candida* spp., en sangre o en otro espécimen estéril o de las puntas de los catéteres. En la revisión de Ellepola ANB y Morrison CJ (Ellepola y Morrison, 2005) reportaron que aproximadamente el 50% de los cultivos de sangre son negativos para *Candida* spp. en pacientes que fallecieron por candidosis invasivas demostrada por el estudio anatomopatológico. Estos cultivos son positivos en las infecciones de larga evolución. Por tanto, algunos autores han propuesto algunos criterios para establecer el diagnóstico (Hall-Stoodley *et al.* 2012).

- Historia médica del paciente con datos de proceso infeccioso severo y diversos factores predisponentes (colocación de dispositivos médicos, fibrosis quística, endocarditis, cirugía mayor).
- Evidencia microbiológica.
 - Cultivos positivos.
 - Microorganismos visibles pero no cultivables, identificados por técnicas moleculares.
- Evidencia microscópica de agregados microbianos.
- Infecciones recurrentes localizadas o sistémicas.
- Falla terapéutica con antifúngicos.

Por ejemplo, para considerar una septicemia relacionada al uso de catéteres es cuando la infección bacteriana o fúngica está presente en el torrente sanguíneo del paciente, relacionado con la colocación de catéteres y con al

menos un hemocultivo positivo obtenido a partir de sangre periférica de un paciente con manifestaciones clínicas y ninguna fuente aparente de infección; además se debe de tomar en cuenta la presencia de >15 UFC de un cultivo de la punta del catéter y/o un cultivo subsecuente (Abebe *et al.* 2014).

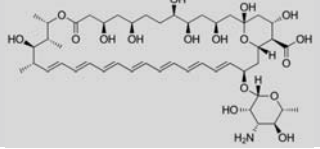
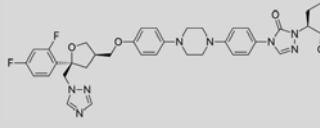
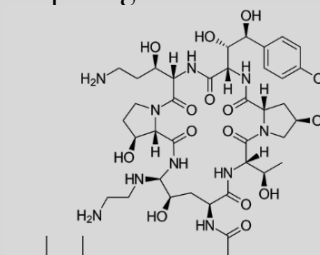
En los hongos causantes de fungemias es fundamental conocer su patrón de sensibilidad para determinar los valores de concentración mínima inhibitoria. Esta prueba se realiza a los azoles, cuando el cultivo de *Candida* se obtuvo de sangre; o bien para equinocandinas, si el tratamiento inicial administrado al paciente fue con este fármaco y sin evidencia de mejoría, o si las especies aisladas son *C. parapsilosis* y/o *C. glabrata*, ya que la baja actividad del antifúngico puede orientar a un fracaso en el tratamiento (Albatineh *et al.* 2016)(Pappas *et al.* 2016).

Diversos grupos de investigadores han diseñado guías para el tratamiento de la candidosis invasiva, que van a depender de los factores de riesgo que presenta cada paciente y la especie involucrada. Ante el aislamiento de *Candida* spp. en sangre se inicia el tratamiento antifúngico empírico y es indispensable retirar el catéter por el riesgo de diseminación de la infección a otros órganos (Fux *et al.* 2005) (Osuna-Huerta *et al.* 2009) (Pappas *et al.* 2016). Otra de las evidencias observadas en los pacientes sometidos a la aplicación de catéteres es el riesgo de desarrollar una candidemia y generalmente, los tratamientos con antifúngicos son ineficaces. La resistencia de las biopelículas a los antifúngicos es un obstáculo para el tratamiento de estas infecciones (Taff *et al.* 2013).

1.13 Antifúngicos

Los antifúngicos que han mostrado actividad contra las especies de *Candida* causantes de infección invasiva son los polienos (anfotericina B y AMB liposomal); triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol) y las equinocandinas (caspofungina, anidulafungina y micafungina). En el Cuadro 10 se muestran los aspectos relevantes de anfotericina B, posaconazol y caspofungina.

Cuadro 10. Características de tres antifúngicos utilizados en el tratamiento de las infecciones invasivas (Ghannoum y Rice, 1999) (Georgopapadaku 1998).

Antifúngico y molécula	Familia	Síntesis y año	Mecanismo de acción
<p>Anfotericina B</p> 	Polieno	<i>Streptomyces nodosus</i> (1955)	Actúa uniéndose a esteroides (ergosterol), ocasionando poros en la membrana y alterando su permeabilidad.
<p>Posaconazol</p> 	Triazol de 2ª generación	Molécula sintética a partir de itraconazol (1996)	Inhibe la biosíntesis del ergosterol, actuando sobre la enzima citocromo 14 α -desmetilasa dependiente del citocromo P450.
<p>Caspofungina</p> 	Equinocandina	Derivado semisintético de <i>Glaea lozoyensis</i>	Inhibe la 1,3- β glucano sintetasa para la formación de la pared celular

1.14 Mecanismos de resistencia

La resistencia que presentan los hongos ante los antifúngicos no ha llegado a las tasas de resistencia observada en las bacterias. Reportes actuales demuestran que la resistencia a los antifúngicos puede llegar a ser un problema emergente en algunos hongos patógenos (Albatineh *et al.* 2016).

Los mecanismos de resistencia a los antifúngicos presentes en los microorganismos en su forma planctónica son el resultado a exposiciones prolongadas a estos compuestos, por cambios genéticos irreversibles y por la formación de biopelículas asociadas a la adaptación al medio, permitiendo que las células persistan debido a su estructura física, complejidad y alta densidad. Además de una alteración o sobreexpresión de la diana, evitando la difusión y una alta tolerancia a los antifúngicos (Ramage y Williams, 2013) (Taff *et al.* 2013).

La resistencia a los antifúngicos que presentan las biopelículas fúngicas son multifactoriales, ya que involucra barreras físicas y procesos regulatorios complejos, esta puede ser intrínseca a un compuesto determinado o por un cambio genético irreversible o por exposición prolongada (Figura 16) (Ramage, Rajendran, Sherry, y Williams, 2012). Estos mecanismos proporcionan a la biopelícula tolerancia a concentraciones mayores de 1,000 veces que su contraparte planctónica (Taff *et al.* 2013).

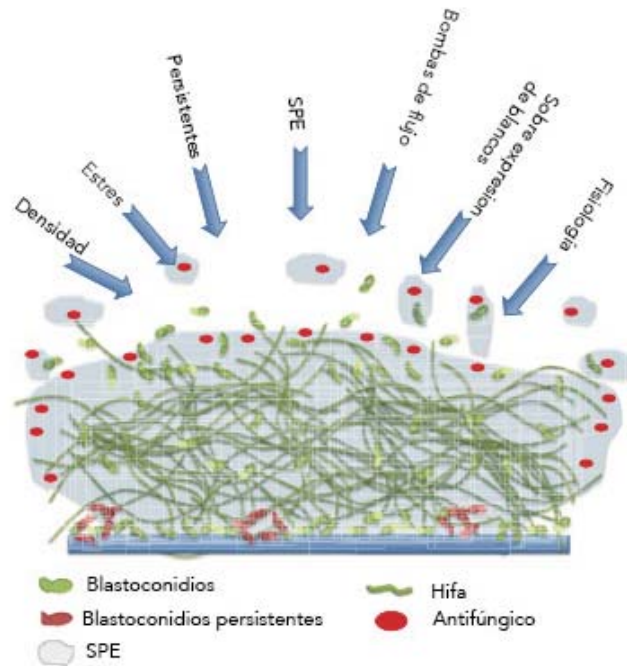


Figura 16. Las biopelículas son una estructura de resistencia a los antifúngicos. Tomada y modificada de Ramage G y cols (Ramage *et al.* 2012).

Los mecanismos generales que se pueden activar en las biopelículas de hongos para evadir la acción de los antifúngicos son (Ramage *et al.* 2012):

Arquitectura y densidad celular de las biopelículas. La estructura de las biopelículas es altamente ordenada y permite la perfusión de los nutrientes y la expulsión de los productos de deshecho. La biopelícula madura es una estructura densamente poblada, formada por microcolonias y canales. La resistencia a los azoles se incrementa cuando la densidad poblacional aumenta en comparación con las células planctónicas. Aparentemente, las células que se encuentran en la parte más interna de la biopelícula presentan una tasa de crecimiento menor por la falta de nutrientes y posteriormente serán más resistentes a los antifúngicos. En las biopelículas altamente densas se presentan cooperación entre las células individuales a través del sistema de QS, permitiendo la comunicación y coordinación de la conducta a la respuesta al estímulo, secretando moléculas señales y activando genes involucrados en la resistencia. Las equinocandinas tiene un efecto limitado sobre la densidad celular (Ramage, Robertson, y Williams, 2014) (Taff *et al.* 2013).

Alteraciones o sobreexpresión de las moléculas blanco. Los azoles presentan un efecto fungistático contra *Candida* spp., esto genera una fuerte selección a la población resistente. Los aislados clínicos multi-resistentes presentan mecanismos acumulados, como alteraciones en el gen que codifica para la 14- α -desmetilasa (*Erg11*) (Ramage *et al.* 2014).

Activación de las bombas de flujo. El principal papel de las bombas de flujo es proporcionar una homeostasis en entornos complejos y proteger a las células de una toxicidad aguda (Ramage *et al.* 2012); y evitar la acumulación del antifúngico en la célula. Las bombas de flujo están compuestas por proteínas transportadoras de unión ATP (ABC) y por transportadores MFS. Las proteínas ABC están codificadas en algunos de los genes CDR (CDR1-4); por otro lado, los transportadores secundarios MFS están codificados en el gen MDR1. Estos son los primeros mecanismos de resistencia que se describieron en *Candida* frente a los azoles, por la sobreexpresión de estos genes causando resistencia a estos compuestos (Ramage *et al.* 2014) (Taff *et al.* 2013). El papel protector se induce en la primera etapa de la formación de la biopelícula, antes de que se genere la SPE (Ramage y Williams, 2013) (Ramage *et al.* 2014). Este mecanismo se ha reportado en *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* (Ramage y Williams, 2013) (Taff *et al.* 2013).

Limitar la difusión del antifúngico por la sustancia polimérica extracelular (SPE). La SPE es un material polimérico que promueve la adhesión y puede retener nutrientes, agua y algunas enzimas; además protege a las células de las condiciones ambientales, dentro del hospedero del sistema inmune y de la actividad de los antifúngicos. La difusión del antifúngico se dificulta por la SPE, la composición química de ésta podría regular la resistencia, por la acción de la β -1-3 glucano que secuestra las moléculas del antifúngico, evitando que llegue a su diana (Ramage *et al.* 2012) (Ramage y Williams, 2013) (Ramage *et al.* 2014) (Taff *et al.* 2013).

Células persistentes. Estas células son importantes en el mecanismo de resistencia en infecciones crónicas, son células regulares que se forman de manera estocástica en las poblaciones microbianas y presentan una alta tolerancia a los antifúngicos, regulación diferente en los genes involucrados en la síntesis del ergosterol y de la pared celular. En la biopelículas de *C. albicans* se ha reportado que algunas levaduras muestran alta tolerancia a los antifúngicos después de la adhesión. Las células persistentes están relacionadas con especies y cepas específicas de: *C. albicans*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*. La aplicación regular de agentes antifúngicos, puede seleccionar cepas con altos niveles de células persistentes. Este tipo de células pueden desarrollar una nueva biopelícula que presentará el mismo porcentaje de células persistentes (Ramage *et al.* 2012) (Taff *et al.* 2013).

Tolerancia al estrés. Los hongos presentan una modulación fenotípica que responde a la amplia gama de factores fisiológicos estresantes: factores ambientales como cambios de temperatura, estrés iónico, cambios en la osmolaridad, estrés oxidativo (Ramage y Williams, 2013) (Taff *et al.* 2013). Las células levaduriformes están censando los diversos factores ambientales mediante receptores, los cuales generan respuesta en la vía de

señalización, lo que puede inducir al desarrollo de la biopelícula y a la resistencia a los antifúngicos (Ramage *et al.* 2012). Uno de los principales factores responsable para lograr controlar las rutas que regulan estos cambios es la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), el cual es activado cuando la célula entra en estrés y presenta diferentes funciones biológicas, como el crecimiento celular, adhesión y diferenciación. Las proteínas de choque térmico es otra ruta para la respuesta al estrés (Ramage y Williams, 2013) (Taff *et al.* 2013).

2. ANTECEDENTES

A lo largo de treinta años de investigaciones relacionadas con biopelículas formadas por *Candida* existen más de 2,000 publicaciones (Pubmed 2017-08-22); inicialmente éstos estudios fueron únicamente observacionales, principalmente de dispositivos médicos de pacientes contaminados y posteriormente se estableció el primer modelo *in vivo* descrito por Hawser y Douglas (Hawser y Douglas, 1994), el cual fue modificado (Cuadro 11) (Soll y Daniels, 2016).

En diferentes estudios se ha reportado que las superficies pueden influir en el desarrollo de la biopelículas en su arquitectura y morfología. Se ha observado que las superficies como el látex o el elastómero de silicón muestran un ligero incremento en la formación de la biopelícula en comparación del polivinilo y mucho menor que el poliuretano (Hawser y Douglas, 1994), posteriormente Chandra y cols (Chandra *et al.* 2001a), demostraron que las biopelículas desarrolladas en dos tipos superficies presentaban características distintas en las diferentes fases de maduración. Otro de los aspectos importantes para el estudio de las biopelículas es el impacto de las características de las superficies como rugosidad y energía libre de superficie en la formación de *novo* de una biopelícula. Diversos grupos de investigadores han publicado diferentes estudios en los que se han relacionado las características físicas de las superficies y la cantidad de biopelícula desarrollada por diversos microorganismo (Nakazato, Tsuchiya, Sato, y M, 1989) (Quiryne y Bollen, 1995) (Teughels, Van Assche, Sliepen, y Quiryne, 2006) (Hahnel, Wieser, Lang, y Rosentritt, 2015).

De las primeras funciones que se han descrito de las biopelículas es la protección de los microorganismos contra el ambiente circundante, como puede ser los antifúngicos aplicados en pacientes con algún catéter instalado. Chandra y cols (Chandra *et al.* 2001b) reportó que las biopelículas de *C. albicans* requieren concentraciones mayores de anfotericina B (8 µg/mL) y fluconazol (64 µg/mL) para inhibir el 50% de la actividad metabólica en su contraparte planctónica; por otro lado, Bachmann y cols (Bachmann *et al.* 2002) publicó una buena actividad de caspofungina sobre las biopelículas de *C. albicans*, obteniendo hasta un 97% de inhibición de la actividad metabólica a concentraciones de 0.125µg/mL.

Cuadro 11. Diferentes modelos empleados para el estudio de las biopelículas en *Candida* spp.

Autor		Medio de cultivo	Sustrato	Pre-tratamiento	Cuantificación	Condición	Método de observación
Tipo de modelo	Especie						
Hawser SP y Douglas LJ (Hawser y Douglas, 1994)		YNB	Catéter Látex (Foley) PVC (CVC) Silicón elastómero-látex (Foley) Silicón (Foley) Poliuretano CVC En placas 24 pozos	Suero	Peso seco ³ H Leucina MTT	Adhesión: 37°C/60 min Formación: 37°C/72 h (s/agitación)	MEB
<i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i> 						
Daniels KJ y cols (Daniels, Srikantha, Lockhart, Pujol, y Soll, 2006)		RPMI	Catéter de elastómero de silicón en placas de 12 pozos		Nothern	Adhesión: 29°C/90 min Formación: 29°C/48 h	MCL Calcoflúor
<i>In vitro</i>	<i>C. albicans</i> morfotipo blanco/opaco						
<i>In vivo</i>	<i>C. albicans</i>						
Nobile CJ y cols (Nobile, Nett, Andes, y Mitchell, 2006)		Medio Spider	Silicón Placas 12 pozos	Suero bovino	Peso seco Ensayo retención de células	Adhesión: 37°C/90 min 150 rpm Formación: 37°C/48 h 150rpm	MCL
<i>In vitro</i>							
<i>In vivo</i>	<i>C. albicans</i>		Catéter de polietileno		Detección Hwp1	24 h	MEB
Chandra J y cols (Chandra, Mukherjee, y Ghannoum, 2008)		RPMI	Tiras dentales Catéter de silicón Lentes de contacto	Saliva SBF PBS	XTT Peso seco	Adhesión: 37°C/90 min Formación: 37°C/6, 24, 48, 72 h 110 rpm	Microscopía Fluorescencia MEB y MCL
<i>In vitro</i>	<i>C. albicans</i>						

MEB: Microscopía electrónica de barrido; MCL: Microscopía confocal láser; SBF: suero bovino fetal; PBS: buffer de fosfato salino.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las dos últimas décadas la prevalencia e incidencia de infecciones por especies de *Candida* han ido en aumento, asociadas a una alta mortalidad. Estas infecciones se presentan en pacientes que cursan con diversos factores de riesgo como trasplante de órganos, inmunosupresión, neoplasias, hospitalización prolongada en las unidades de cuidados intensivos y el uso de catéteres.

Diferentes grupos de investigadores han realizado estudios relacionados con los factores de virulencia de *Candida* principalmente en biopelículas y su papel como fuente de infección en el hospedero, con la finalidad de poder explicar el incremento de estas infecciones.

Mundialmente, en los últimos seis años los estudios análogos con las biopelículas formadas por especie de *Candida* han aumentado; los investigadores han utilizado diversos modelos para poder describir y explicar a las biopelículas y su importancia.

Actualmente las biopelículas son consideradas un problema de salud pública en los grupos más vulnerables; en México no se conoce la incidencia de las fungemias por *Candida* y los trabajos relacionados con la formación de biopelículas por estas especies son escasos.

Las descripciones disponibles en la literatura indican que las infecciones a nivel sanguíneo inician con la formación de biopelículas en los catéteres que han permanecido *in situ*. Es probable que el material y las características físicas y químicas de éste favorezcan el establecimiento de la biopelícula.

Por ello es importante conocer la capacidad que presentan las diferentes especies de *Candida* causantes de infección en México, para desarrollar biopelículas sobre la superficie de los catéteres, así como conocer la actividad de los antifúngicos de uso rutinario sobre estas estructuras, lo que podría explicar el incremento de estas infecciones y la alta mortalidad de los pacientes hospitalizados.

4. HIPÓTESIS

Las especies de *Candida* son la primera causa de infecciones fúngicas nosocomiales, las cuales están asociadas a múltiples factores de riesgo como el uso de dispositivos médicos o catéteres. En algunas especies de este género se ha demostrado la capacidad para desarrollar biopelículas en diferentes tipos de superficie. Se ha visto que las biopelículas pueden estar relacionadas con el aumento de estas infecciones y el incremento de la resistencia los antifúngicos.

La capacidad de formación de la biopelícula estará relacionada con diferentes variables,

- Las características morfológicas de cada una de las especies influirá en la capacidad de desarrollo de la biopelícula, siendo las especies con formación de pseudohifa e hifas, serán las que mostrarán un fuerte formación de biopelícula.
- Las características intrínsecas de cada superficie influirá en la formación de la biopelícula, siendo las de mayor índice de rugosidad las que promoverán mayor formación de biopelícula.
- Las biopelículas formadas por algunas especies de *Candida*, mostrarán resistencia a los antifúngicos, principalmente las especies que formen pseudohifa e hifas y sobre superficies con índices de rugosidad alta.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Inducir el establecimiento de la biopelícula con aislados clínicos de diferentes especies de *Candida* sobre cuatro tipos de catéteres (catéter venoso central, Tenckhoff, Mahurkar y Foley) y conocer el patrón de sensibilidad a tres antifúngicos.

5.2 Objetivos Particulares

Corroborar la identidad de los aislados clínicos obtenidos por diferentes técnicas moleculares.

Caracterizar la superficie de los cuatro catéteres (catéter venoso central, Tenckhoff, Mahurkar y Foley).

Detectar y cuantificar la capacidad de cada uno de los aislados clínicos para formar biopelículas sobre los cuatro catéteres.

Determinar si existe una relación entre los cuatro catéteres probados y la formación de la biopelícula

Obtener el patrón de sensibilidad a tres antifúngicos de las biopelículas formadas por algunos de los aislados clínicos de *Candida* sobre los cuatro catéteres probados.

Comparar la actividad de los tres antifúngicos sobre las biopelículas formadas por los aislados de *Candida* spp. sobre los cuatro catéteres probados.

6. METODOLOGÍA

6.1 Aislados

Estudio transversal, observacional, descriptivo y comparativo, realizado en 49 aislados clínicos de *Candida* spp. obtenidos de 36 pacientes con diversos factores de riesgo. Los aislados se obtuvieron de los siguientes tipos de muestras: a) sangre; b) orina; c) líquido de diálisis y d) puntas de catéter, los cuales fueron previamente identificados por métodos tradicionales (Cuadro 12) y la morfología macro y microscópica fue verificada en cada una de ellos. Las cepas de referencia utilizadas fueron *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis sensu stricto* ATCC 29019, *C. metapsilosis* ATCC 96144, *C. orthopsilosis* 96141, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. dubliniensis* ATCC MYA-577 y *C. krusei* ATCC 6258.

En la Figura 17 se muestra de manera general el diagrama de trabajo que se realizó en este proyecto.

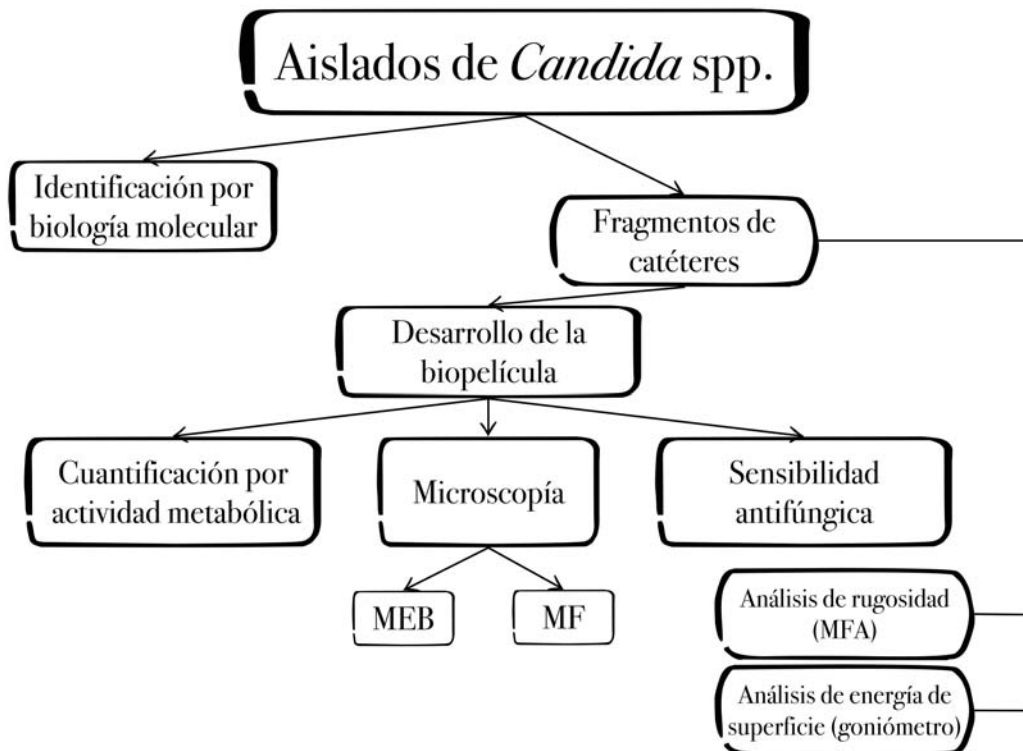


Figura 17. Diagrama general de trabajo. MEB: microscopía electrónica de barrido; MF: microscopía de fluorescencia.

Cuadro 12. Cuarenta y nueve aislados clínicos de *Candida* spp. obtenidos de muestras clínicas.

#	Clavedel aislado	Especie	Origen	Inst.	#	Clavedel aislado	Especie	Origen	Inst.
1	39	<i>C.parapsilosis</i>	P.catéter	IMSS	26	24948	<i>C.tropicalis</i>	Sangre	ISSSTE
2	40	<i>C.parapsilosis</i>	P.catéter	IMSS	27	27258	<i>C.albicans</i>	Liq.díalisis	ISSSTE
3	48	<i>C.albicans</i>	P.catéter	IMSS	28	54552	<i>C.albicans</i>	Liq.díalisis	ISSSTE
4	89	<i>C.parapsilosis</i>	P.catéter	IMSS	29	55288	<i>C.krusei</i>	Orina	ISSSTE
5	100	<i>C.parapsilosis</i>	P.catéter	IMSS	30	60804	<i>C.albicans</i>	Sangre	ISSSTE
6	CAT09	<i>C.albicans</i>	P.catéter	ISSSTE	31	61529	<i>C.albicans</i>	Orina	ISSSTE
7	CAT11	<i>C.parapsilosis</i>	P.catéter	ISSSTE	32	67860	<i>C.albicans</i>	Liq.díalisis	ISSSTE
8	CAT14	<i>C.guilliermondii</i>	P.catéter	ISSSTE	33	75785	<i>C.parapsilosis</i>	Orina	ISSSTE
9	CAT15M	<i>C.glabrata</i>	P.catéter	ISSSTE	34	14607R	<i>C.glabrata</i>	P.catéter	ISSSTE
10	CAT15V	<i>C.dubliniensis</i>	P.catéter	ISSSTE	35	14607V	<i>C.albicans</i>	P.catéter	ISSSTE
11	CAT18M	<i>C.glabrata</i>	P.catéter	ISSSTE	36	60394A	<i>C.tropicalis</i>	Orina	ISSSTE
12	CAT18R	<i>C.krusei</i>	P.catéter	ISSSTE	37	60394M	<i>C.glabrata</i>	Orina	ISSSTE
13	CAT18V	<i>C.dubliniensis</i>	P.catéter	ISSSTE	38	64554M	<i>C.glabrata</i>	Orina	ISSSTE
14	CAT19	<i>C.tropicalis</i>	P.catéter	ISSSTE	39	64554V	<i>C.albicans</i>	Orina	ISSSTE
15	CAT33	<i>C.parapsilosis</i>	P.catéter	ISSSTE	40	64555M	<i>C.glabrata</i>	Orina	ISSSTE
16	CAT37	<i>C.parapsilosis</i>	P.catéter	ISSSTE	41	64555V	<i>C.albicans</i>	Orina	ISSSTE
17	CAT43	<i>C.albicans</i>	P.catéter	ISSSTE	42	80320A	<i>C.glabrata</i>	Sangre	ISSSTE
18	CAT47	<i>C.albicans</i>	P.catéter	ISSSTE	43	80320B	<i>C.albicans</i>	Sangre	ISSSTE
19	CAT51	<i>C.krusei</i>	P.catéter	ISSSTE	44	80320U	<i>C.tropicalis</i>	Orina	ISSSTE
20	CAT52M	<i>C.glabrata</i>	P.catéter	ISSSTE	45	83332H	<i>C.albicans</i>	Sangre	ISSSTE
21	CAT52V	<i>C.albicans</i>	P.catéter	ISSSTE	46	83332V	<i>C.albicans</i>	P.catéter	ISSSTE
22	CAT56	<i>C.tropicalis</i>	P.catéter	ISSSTE	47	83332R	<i>C.glabrata</i>	P.catéter	ISSSTE
23	12420	<i>C.albicans</i>	Sangre	ISSSTE	48	83254	<i>C.tropicalis</i>	P.catéter	ISSSTE
24	16926	<i>C.tropicalis</i>	Sangre	ISSSTE	49	87325	<i>C.albicans</i>	Liq.díalisis	ISSSTE
25	21466	<i>C.tropicalis</i>	P.catéter	ISSSTE					

6.2 Identificación molecular

A todos los aislados se les realizó identificación por técnicas moleculares siguiendo el método de diversos autores y con algunas modificaciones de acuerdo con el siguiente esquema de la Figura 18 (Ahmad *et al.* 2012) (Mirhendi *et al.* 2010) (Mohammadi *et al.* 2013) (Tavanti *et al.* 2005). De cada uno de los aislados de *Candida* spp. se realizó un cultivo masivo en agar dextrosa Sabouraud (ADS) y se incubó a 35°C por 48 h.

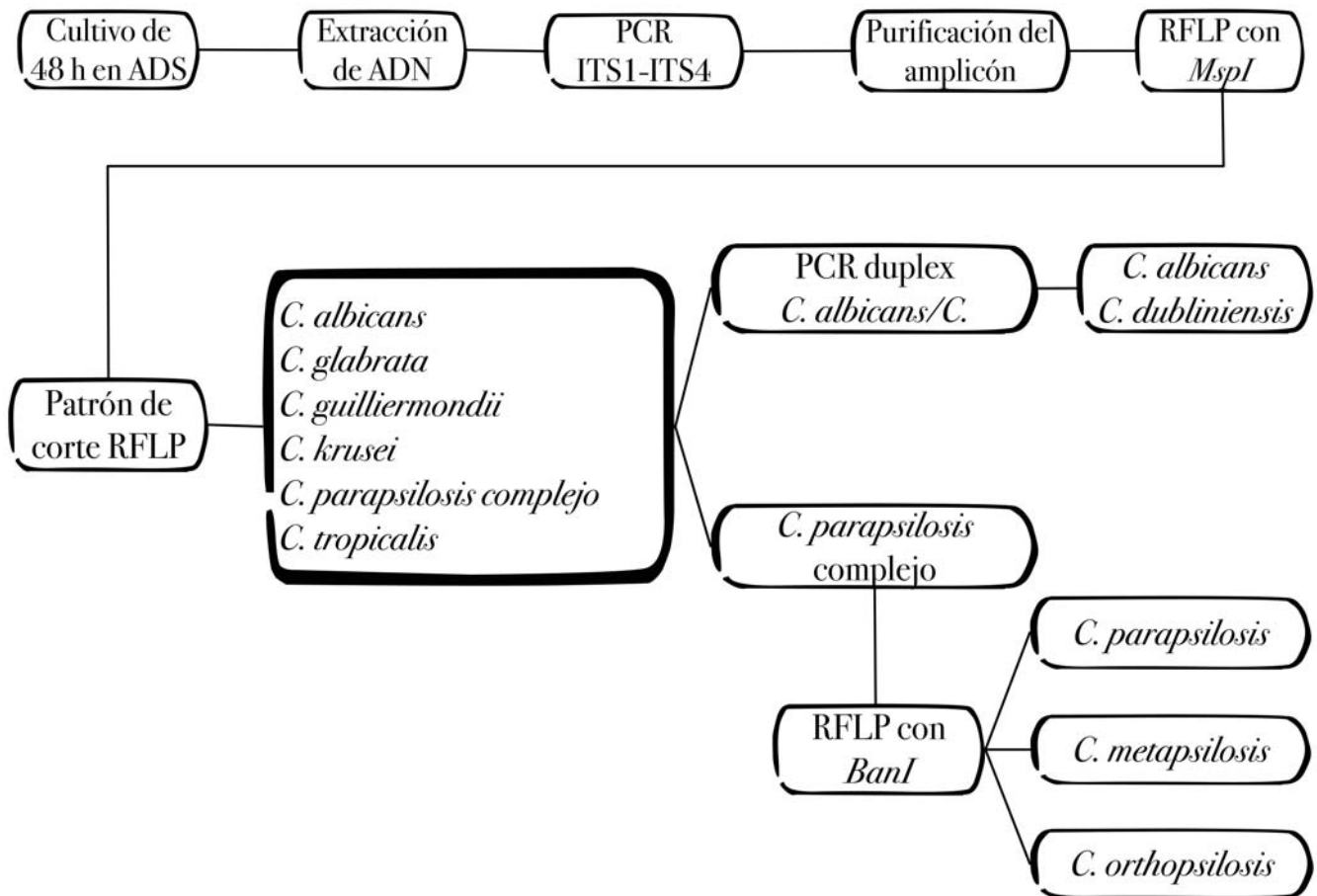


Figura 18. Diagrama de procedimientos para la identificación molecular de los aislados de *Candida* spp.

6.2.1 Extracción de ADN

El ADN de todos los aislados fue obtenido con un kit de extracción comercial GeneAll® Exgene™ Plant (GeneAll Biotechnology CO, Songpa-gu, Seoul Korea) siguiendo las indicaciones del fabricante. La integridad y calidad del ADN se verificó por electroforesis en un gel de agarosa (Invitrogen®, Carlsbad, CA) al 0.8%, teñido con SYBER® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®). La cuantificación del ADN se realizó por espectrofotometría (EPOCH, BioTek®, Winooski, VT).

6.2.2 Identificación de *Candida* spp. por PCR de la región ITS

Para la identificación de las especies de *Candida* se amplificó la región de espacios internos transcripcionales (ITS1-ITS4) de cada uno de los aislados (Cuadro 13) (Mohammadi *et al.* 2013).

Cuadro 13. Mezcla de reacción para la amplificación de la región ITS por PCR con volumen final de 50 µL.

Mezcla de reacción	[Final]
Buffer de reacción	1X
MgCl ₂	2.0 mM
dNTPs*	0.5 mM c/u
Taq polimerasa**	2.5 U
ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')	1 µM
ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')	1 µM
ADN	100 ng

* Invitrogen® ** Applied Biosystems (Foster City, CA)®

Las condiciones de la PCR en el termociclador (Perkin Elmer®, Waltham, MA) fueron:

Temperatura	96°C	94°C	58°C	72°C	72°C
Tiempo	5'	30''	30''	30''	5'
Ciclos	1	40			1
	Desnaturalización	Desnaturalización	Alineación	Elongación	Terminación

La amplificación se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBER® Safe (Invitrogen®).

6.2.3 Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

52

El amplicón obtenido en la PCR para la región ITS de cada uno de los aislados fue purificado con el kit DNA clean y concentrator -5 (Zymo Research Corp, Irvine, CA) y fue sometido a una digestión con la enzima de restricción *MspI* (New England®, Ipswich, MA) (Mohammadi *et al.* 2013), bajo las condiciones establecidas por el fabricante. Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 3% y teñido con EpiQuick DNA stain (EpiGentek®, Farmigdale, NY). Los patrones de restricción se compararon con los descritos por otros autores (Cuadro 14) (Mohammadi *et al.* 2013).

Cuadro 14. Patrones de corte específicos para cada una de las especies de *Candida* (Mohammadi *et al.* 2013).

Especie	Tamaño del amplicón ITS1-ITS4 (pb)	Tamaño de los fragmentos de la digestión enzimática con <i>MspI</i> (pb)
<i>C. albicans</i> / <i>C. dubliniensis</i>	537	239, 298
<i>C. glabrata</i>	881	320, 561
<i>C. guilliermondii</i>	607	82, 155, 370
<i>C. krusei</i>	510	250, 260
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	530	530
<i>C. metapsilosis</i>	531	531
<i>C. orthopsilosis</i>	510	510
<i>C. tropicalis</i>	526	186, 340

6.2.4 PCR dúplex para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*

La identificación específica de estas especies se basó en la PCR dúplex con secuencias blanco, en las regiones ITS1-ITS2 de la región del ADNr (Ahmad *et al.* 2012). Para ello se utilizó el ADN extraído previamente. La amplificación de la región específica se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L. La mezcla se muestra en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Mezcla de reacción para la PCR-dúplex con volumen final de 50 μ L.

Mezcla de reacción	[Final]
Buffer de reacción	1X
MgCl ₂	1.2 mM
dNTPs *	0.1 mM c/u
Taq polimerasa **	2.5 U
CALF (5'-TGG TAA GGC GGG ATC GCT T 3')	0.4 μ M
CALR (5'-GGT CAA AGT TTG AAG ATA TAC3')	0.4 μ M
CDUF (5'-AAA CTT GTC ACG AGA TTA TTT TT 3')	0.4 μ M
CDUR (5'-AAA GTT TGA AGA ATA AAA TGG C-3')	0.4 μ M
ADN	50 ng

* Invitrogen® ** Applied Biosystems (Foster City, CA)®

Las condiciones de reacción para la PCR fueron las siguientes:

Temperatura	96°C	95°C	55°C	72°C	72°C
Tiempo	5'	1'	30''	1''	10'
Ciclos	1	30			1
	Desnaturalización	Desnaturalización	Alineación	Elongación	Terminación

Los amplicones obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% teñido con SYBER® SAFE (Invitrogen®). El tamaño esperado del producto amplificado fue de 100 pb para *C. albicans* y 325 pb para *C. dubliniensis* (Ahmad *et al.* 2012).

6.2.5 Identificación del complejo *Candida parapsilosis* por PCR-RFLP

Al confirmar la identidad de *C. parapsilosis* por PCR-RFLP con *MspI*, se realizó una segunda PCR para amplificar la región del gen SADH (alcohol deshidrogenasa secundaria) y así diferenciar *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis sensu stricto*. (Mirhendi *et al.* 2010) (Tavanti *et al.* 2005). La mezcla de la reacción se muestra en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Mezcla de reacción para la PCR del gen SADH, para un volumen final de 50 μ L.

Mezcla de reacción	[Final]
Buffer de reacción	1X
MgCl ₂	1.5 mM
dNTPs **	0.2 mM c/u
Taq polimerasa *	2.5 U
SADHF (5'-GTT GAT GCT GTT GGA TTG T-3')	0.25 μ M
SADHR (5'-CAA TGC CAA ATC TCC CAA-3')	0.25 μ M
Albúmina	0.2 μ g/mL
ADN	100 ng

* Invitrogen® **Bioline® (Taunton, MA)

Las reacciones fueron llevadas a cabo bajo las siguientes condiciones:

Temperatura	94°C	95°C	55°C	72°C	72°C
Tiempo	7'	30''	1'	90''	5'
Ciclos	1	35			1
	Desnaturalización	Desnaturalización	Alineación	Elongación	Terminación

Los amplicones fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%. Los productos obtenidos en la PCR para el gen SADH fueron purificados en un DNA clean y concentrator -5 de Zymo research® y posteriormente digeridos con la enzima *BanI* (New England®) bajo las condiciones establecidas por el fabricante. Los productos de la digestión enzimática fueron observados en un gel de agarosa al 3% teñido con EpiQuick DNA stain (Epigentek®). Los tamaños de los productos digeridos fueron comparados con los descritos previamente por Tavanti y cols (Tavanti *et al.* 2005) para identificar las especies del complejo *C. parapsilosis* (Cuadro 17).

54

Cuadro 17. Patrones de corte con la enzima *BanI* del gen SADH para la identificación de las especies del complejo *C. parapsilosis* (Mirhendi *et al.* 2010).

Especie	Tamaño de la región SADH (pb)	Patrón de corte para la región SADH con <i>BanI</i> (pb)
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	720	200 y 520
<i>C. orthopsilosis</i>	720	716
<i>C. metapsilosis</i>	720	100, 190 y 390

6.3 Caracterización de las superficies

Los cuatro tipos de catéteres utilizados fueron: catéter venoso central Trokar[®] (CVC), catéter urinario tipo Foley Holy[®] (FLY), catéter para hemodiálisis tipo Mahurkar Covidien[®] (MHK), catéter para diálisis tipo Tenckhoff Covidien[®] (TKF) (Figura 19). Se les determinó rugosidad y energía de superficie.

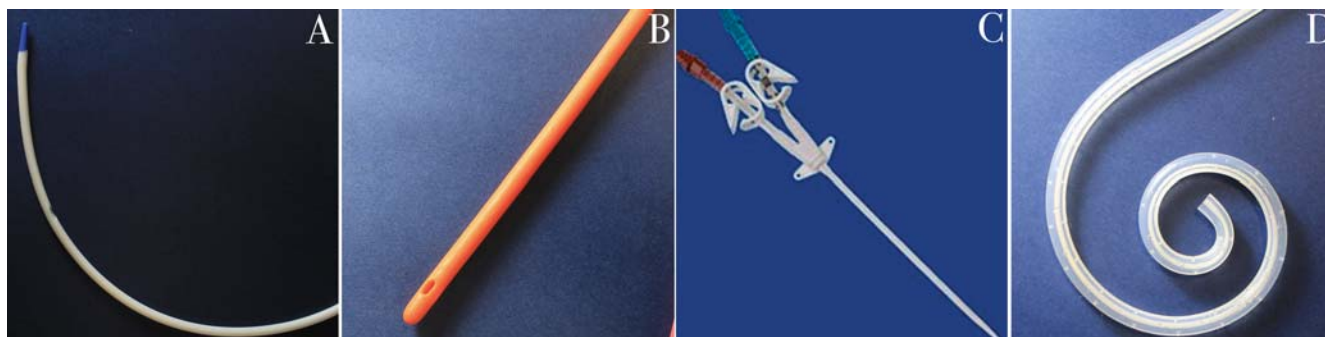


Figura 19. Los catéteres utilizados en este estudio. A) CVC; B) FLY; C) MHK (medline.com/product/MAHURKAR) y D) TKF.

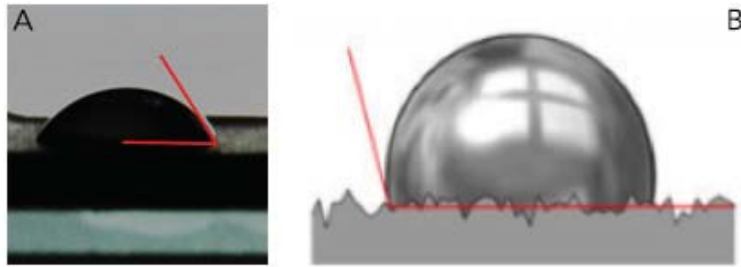
6.3.1 Rugosidad

De cada uno de los catéteres se determinó el grado de rugosidad por microscopía de fuerza atómica (MFA), aplicando la técnica de contacto intermitente (JSPM-4210 Jeol[®], Peabody, MA). Se obtuvieron imágenes a diferentes escalas de observación (10 μ m, 5 μ m, 2 μ m, 1 μ m, 0.5 μ m) y éstas fueron observadas y analizadas con el programa WinSPMSystem[®]; se obtuvo el valor de la media de la rugosidad (Ra), el pico más alto (Rz), el promedio de 10 picos más altos (Rzjis), factor de rugosidad o índice de área (r) y el perfil de cada una de las superficies (Rodríguez-Hernández *et al.* 2011).

6.3.2 Energía de superficie

A todas las superficies se les midió el ángulo de contacto con la ayuda de un Goniometro Drop Contour Analysis. Para esta prueba los catéteres se cortaron en fragmentos de 1.5 cm y se colocaron sobre soportes de acrílico, se comprimieron para obtener una superficie plana sin alterar la superficie de la muestra, se colocó una gota de 2 μ L de tres líquidos (agua tridestilada, formamida (Sigma[®], St. Louis; MO[®]) y glicerol (Hycel[®], México)) a temperatura ambiente. En experimentos independientes se tomaron videos durante 1 minuto de cada gota y se analizaron los fotogramas a los 5 seg. El experimento se realizó por triplicado para cada material y cada líquido. Las imágenes fueron analizadas con los programas Pinnacle Study HD v15.0 (Corel Co, Menlo Park, CA) e ImageJ, para obtener el ángulo de contacto del lado derecho e izquierdo (Figura 20-A).

Por la naturaleza de la rugosidad y heterogeneidad de la superficie se utilizó la ecuación de Wenzel para la corrección del ángulo de contacto. En la Figura 20-B se muestra como la rugosidad puede influir en el ángulo de contacto (Rodríguez-Hernández *et al.* 2011).



Ecuación 1:

$$\cos \theta \alpha = r \cos \theta$$

Figura 20. Ángulo de contacto sobre una superficie. En A se observa el ángulo de contacto formado por una gota en una superficie y en B se esquematiza la rugosidad de una superficie (Imagen tomada y modificada de Rodríguez-Hernández AG (Rodríguez-Hernández *et al.* 2011)). En la Ecuación 1 (Ecuación de Wenzel) se muestra como el factor de rugosidad o factor de Wenzel (r) influye en el ángulo de contacto.

La energía libre de superficie y sus componentes polares y dispersivos se calcularon a partir de los datos de los ángulos de contacto obtenidos para cada tipo de superficie con la corrección de Wenzel, por el método Owens, Wendt, Rabel, Kaelble (OWRK) (Rodríguez-Hernández *et al.* 2011), el cual se fundamenta en la ecuación de Young (Ecuación 2), donde existe una relación entre el ángulo de contacto θ , la tensión superficial del líquido σ_l , la tensión entre la fase líquida y sólida σ_{sl} y la energía libre del sólido σ_s .

Ecuación 2:

$$\sigma_s = \sigma_{sl} + \sigma_l \cdot \cos \theta$$

Es necesario determinar σ_{sl} , lo cual se basa en la tensión superficial de σ_s y σ_l (Ecuación 3) y se interpreta como la media geométrica de una parte dispersa σ_l^d y una parte polar σ_l^p de líquido y el sólido (Ecuación 4), para ello se requieren líquidos con valores conocidos de tensión superficial y su parte polar y dispersa (Cuadro 18); al menos uno de ellos debe de tener una parte polar (>0).

Ecuación 3:

$$\sigma_l = \sigma_l^d + \sigma_l^p \quad y \quad \sigma_s = \sigma_s^d + \sigma_s^p$$

Ecuación 4:

$$\sigma_{sl} = \sigma_s + \sigma_l - 2 \left(\sqrt{\sigma_s^d \cdot \sigma_l^d} + \sqrt{\sigma_s^p \cdot \sigma_l^p} \right)$$

Cuadro 18. Valores de tensión superficial, parte polar y parte dispersa de los tres líquidos utilizados.

	Agua	Formamida	Glicerol
Tensión superficial (mJ/m ²)	72.1	56.9	63.1
Parte polar σ_l^p (mJ/m ²)	52.2	33.4	26.1
Parte dispersa σ_l^d (mJ/m ²)	19.9	23.5	37

La Ecuación 4 se arregla para expresarse según la ecuación general de la recta ($y = mx + b$) (Ecuación 5) para obtener los componentes σ_l^p y σ_l^d de la energía libre superficial del sólido, como la pendiente y la ordenada al origen, respectivamente; la suma de ambas partes da como resultado el valor de la energía libre superficial (Rodríguez-Hernández *et al.* 2011).

Ecuación 5

$$\frac{(1 + \cos \theta)\sigma_l}{2\sqrt{\sigma_l^d}} = \sqrt{\sigma_s^p} \sqrt{\frac{\sigma_l^p}{\sigma_l^d}} + \sqrt{\sigma_s^d}$$

6.4 Formación de la biopelícula

Las biopelículas se desarrollaron sobre los fragmentos de cuatro sustratos plásticos de catéteres comerciales, de acuerdo al método descrito por Chandra J y cols (Chandra *et al.* 2008) y Nweze EI y cols (Nweze *et al.* 2012).

6.4.1 Preparación de las superficies

Los cuatro tipos de catéteres utilizados fueron cortados en fragmentos de 3 mm Ø para obtener las superficies para la formación de la biopelícula, éstos se dividieron por tipo y fueron esterilizados por luz UV durante 3 ciclos de 90 segundos cada uno. De cada lote se tomó un fragmento para realizar la prueba de esterilidad en caldo RPMI-glucosa 2%, a 35°C por 48 h.

6.4.2 Pre-tratamiento de las superficies

Los fragmentos fueron colocados en placas de 96 pozos y se añadieron 100 µL de suero bovino fetal. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h, a 110 rpm. Posteriormente se lavaron dos veces con a buffer de fosfatos salino (PBS).

6.4.3 Inóculo

Cada uno de los aislados fueron crecidos en ADS a 37°C por 24 h; de este crecimiento se tomaron 3 colonias para ser inoculadas en 7 mL de caldo de levadura nitrogenada (BD[®]) suplementada con dextrosa (50 mM) e incubadas a 37°C por 24 h, a 110 rpm. La masa levaduriforme fue lavada por centrifugación a 2,500 g a 4°C por 5 min; las células se re-suspendieron en 5 mL de PBS; este proceso se repitió tres veces para eliminar todo el medio de cultivo. Finalmente, las células se re-suspendieron en 5 mL de PBS y se preparó una suspensión a una concentración de 1×10^8 células/mL. La suspensión inóculo se centrifugó y re-suspendió en 5 mL de caldo RPMI-glucosa 2%.

6.4.4 Inoculación de las superficies

Las placas preparadas previamente con los fragmentos de cada uno de las superficies fueron inoculadas con 100 μ L de la suspensión de inóculo preparado e incubas a 37°C por 90 min (sin agitación) para favorecer la fase de adhesión.

6.4.5 Desarrollo de la biopelícula

Después de la fase de adhesión, las placas fueron lavadas 2 veces con PBS y las superficies fueron transferidas a una nueva placa de 96 pozos, a cada pozo se le agregaron 200 μ L de caldo RPMI-glucosa 2%, se incubaron a 37°C a diferentes tiempos (12, 24, 48, 72 h), a 110 rpm. En cuatro pozos de la columna 12 de cada placa se colocaron las superficies sin inocular, como control de esterilidad y control blanco.

6.4.6 Cuantificación de la biopelícula

Las biopelícula formadas en las superficies a los diferentes tiempos probados (90 min, 12, 24, 48 y 72 h) se cuantificaron por el ensayo de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilido (XTT) (SIGMA[®]). Inicialmente cada fragmento se lavó dos veces con PBS y fueron transferidos a una placa nueva que contenía 100 μ L de una mezcla de XTT (5 mg/mL)/PBS 1:5 (vol/vol) y 8 μ L menadiona (1 mM). Las placas se incubaron a 37°C por 3 h, a 110 rpm en obscuridad. De la reacción obtenida 80 μ L fueron transferidos a una nueva placa y se leyó por espectrofotometría a $\lambda 492$ nm (Dynex[®]). El experimento se realizó por triplicado para cada uno de los aislados y en cada una de las superficies.

6.4.7 Clasificación de los aislados por su capacidad de formación de biopelícula.

Todos los aislados se clasificaron por su capacidad de formación de biopelícula con base en la actividad metabólica cuantificada por XTT (DO_{492}) en cada una de las superficies bajo dos criterios descritos previamente:

Criterio Muadcheigka T (Muadcheingka y Tantivitayakul, 2015): Los aislados se clasificaron en altos, bajos y nulos formadores de biopelículas considerando su DO_{492} : $DO < 0.05$, se definieron como nulos formadores de biopelícula (NFB); $0.25 > OD \leq 0.05$ bajos formadores de biopelículas (BFB); y $DO > 0.25$ altos formadoras de biopelícula (AFB).

Criterio Stepanović S (Stepanovic *et al.* 2000): Se estableció un punto de corte (DO_c) como tres veces la desviación estándar sobre la media del control negativo. Los criterios se establecieron bajo los siguientes lineamientos: $DO \leq DO_c$ como no formadores de biopelícula (NF); $DO_c < DO \leq 2xDO_c$ como débil formador (DF); $2xDO_c < DO \leq 4xDO_c$ moderado formador (MF); y $4xDO_c < DO$ fuerte formador (FF).

6.5 Microscopía

Las biopelículas formadas en cada uno de las superficies, bajo las mismas condiciones fueron procesadas para la observación en dos tipos de microscopía:

- a) Microscopía de fluorescencia (MF): El fragmento donde se desarrolló la biopelícula se colocó en un portaobjetos y se le añadió una gota de blanco de calcoflúor (SIGMA[®]), se observó en un microscopio de fluorescencia (IX70 con fluorescencia, Olympus[®]). La observación se realizó a los 90 min, 24 y 48 h de desarrollo.
- b) Microscopía electrónica de barrido (MEB) por punto crítico al alto vacío y las observaciones se realizaron a los 90 min, 24 y 48 h de desarrollo. La superficie con la biopelícula se trató bajo el siguiente tratamiento.

Primera fijación: Los fragmentos con las biopelículas fueron sumergidos en una solución de glutaraldehído con cacodilato de sodio al 2.5% por 1 h. Se realizaron tres lavados con buffer de cacodilato de sodio al 0.1 M por 10 min y se mantuvieron en refrigeración hasta el siguiente paso.

Segunda fijación: Los fragmentos fueron transferidos a una solución de tetraóxido de osmio al 2% por 30 min. Se realizaron tres lavados con buffer de cacodilato de sodio al 0.1 M por 10 min y se mantuvieron en refrigeración hasta el siguiente paso.

Deshidratación: Los fragmentos fueron sumergidos en etanol a concentraciones crecientes (30% 10 min, 50% 10 min, 70% 10 min, 80% 10 min, 90% 10 min, 100% 15 min, 100% 15 min).

Desecado: Este proceso se llevó a cabo por el método de punto crítico.

Montaje: Los fragmentos se montaron sobre un porta muestras con adhesivo y un conductor eléctrico, se almacenaron en un desecador al vacío.

Recubrimiento: Las muestras se colocaron dentro de un pulverizador catódico para obtener un capa de oro de ~10 nm.

Observación: Para la obtención de las imágenes se utilizó un microscopio electrónico de barrido (DSM950, Carl Zeiss[®]). Para cada muestra se tomaron diferentes imágenes en escalas de 500 a 5000 aumentos. Las imágenes fueron capturadas en película de emulsión de plata y posteriormente digitalizadas y convertidas a positivo en Adobe Photoshop CC[®].

6.6 Prueba de sensibilidad a tres antifúngicos

Seis aislados fueron seleccionados de cada una de las siguientes especies *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*. La formación de biopelícula fue inducida bajo las mismas condiciones descritas previamente para obtener una biopelícula madura (48 h), las cuales se sometieron a prueba de sensibilidad a tres antifúngicos (anfotericina B (AMB), posaconazol (PSZ) y caspofungina (CSF)).

Para las pruebas de sensibilidad se prepararon placas de microdilución en caldo con RPMI-glucosa 2% a diferentes concentraciones de antifúngicos (AMB, de 0.03 a 16 µg/mL; PSZ, de 0.03 a 16 µg/mL; CSF, de 0.03 a 16 µg/mL (CLSI 2008)). La biopelícula fue formada en once fragmentos de cada tipo de superficie por aislado, las cuales se dejaron madurar por 48 h, se lavaron con PBS y se transfirieron a las placas de microdilución preparadas previamente con los antifúngicos de acuerdo con el documento M27-A3 (CLSI 2008), se incubaron a 37°C por 24 h, a 110 rpm (Nweze *et al.* 2012). Posteriormente se lavaron una vez con

PBS y se cuantificaron, los fragmentos se transfirieron a placas nuevas, las cuales contenían 100 μL de una solución de XTT (5 mg/mL)/PBS 1:5 (vol/vol) y 8 μL menadiona (1mM), se incubaron a 37°C por 3 h, a 110 rpm y se transfirieron 80 μL de la reacción a una nueva placa. Finalmente, la lectura se realizó por espectrofotometría a $\lambda 492$ nm (DYNEX[®]) (Nweze *et al.* 2012). El experimento se hizo por duplicado. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se estableció como la reducción del $\geq 50\%$ de la actividad metabólica con respecto al control.

6.7 Análisis de los datos

El programa Prisma 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) fue utilizado para el análisis de los datos. Se obtuvieron medias, desviación estándar (DS) y error estándar (ErS). Para analizar la diferencia entre la formación de la biopelícula de las especies de *Candida* en las diferentes superficies probadas se utilizó ANOVA de dos vías con una prueba post hoc de Tukey, así como para la comparación de la actividad de los antifúngicos en las pruebas de sensibilidad ($p < 0.05$). Se realizó regresión logística para la correlación entre la adhesión y las características de las superficies.

7. RESULTADOS

7.1 Pacientes y aislados

En el Hospital General Darío Fernández (ISSSTE) se procesaron 11,141 muestras microbiológicas, en un periodo de 604 días (01- Enero -2014 al 29 – Mayo - 2015), de las cuales 97 fueron positivas para alguna especie de *Candida* (0.87%); en este trabajo solo se incluyeron las causantes de infección de vías urinarias, fungemias, diálisis peritoneal y de puntas de catéter (44 aislados), además de 5 aislados obtenidos de puntas de catéter del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS) de un muestreo realizado a 100 puntas de catéter venoso central.

En la Figura 21 se muestra el origen de los 49 aislados de *Candida* spp. provenientes de 36 pacientes. El 57% de los aislados de *Candida* se recuperaron de diversos catéteres, principalmente de catéter venoso central (CVC) y catéter tipo Foley (FLY), en el 42.8% y 35.7%, respectivamente.

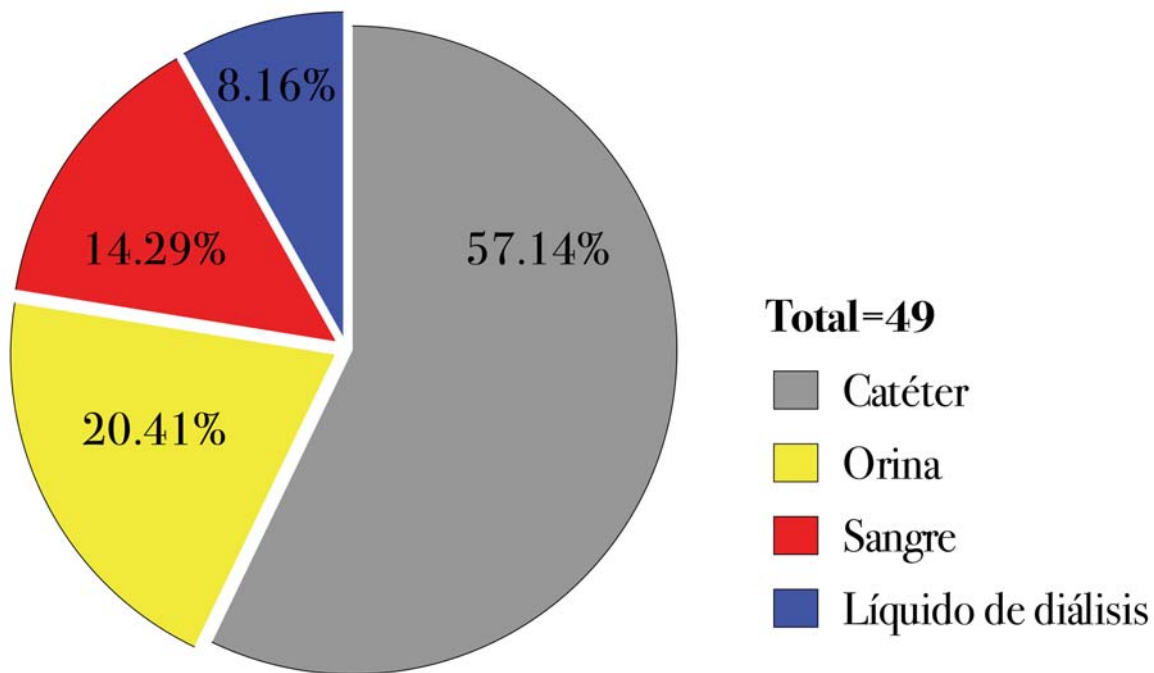


Figura 21. Origen de las muestras procesadas de 36 pacientes, de donde se obtuvieron los aislados de *Candida* spp. incluidos en este estudio.

Los datos demográficos y los factores de riesgo se muestran en la Figura 22. El rango de edad de los pacientes fue de cero hasta 96 años, con un promedio de 62 años (A); el 61.1% correspondió a mujeres (B); el factor de riesgo más común fue la aplicación de algún tipo de catéter (94%) (C), principalmente el CVC en 18 pacientes, seguido del catéter tipo Foley, en 17 pacientes (D). El 30% de los pacientes tenían colocado más de un catéter, la combinación más usual fue CVC con FLY (6 casos), seguida por cánula-CVC-FLY (4 casos). Otro de los factores de riesgo fue el tratamiento con antimicrobianos (83%) asociado al diagnóstico de algún tipo de infección; las más frecuentes fueron septicemia e infección en vías urinarias (E). El 30.5% de los pacientes presentó más de un tipo de infección, es decir la asociación de septicemia e infección de vías urinarias (F). La mortalidad de los pacientes fue del 28.57%.

De los 36 pacientes incluidos en este estudio se obtuvieron 49 aislados de *Candida* spp. los cuales fueron previamente identificados por técnicas tradicionales. En la Figura 23-A se muestra la distribución de las especies, la más común fue *C. albicans* (36.73%), seguida por *C. glabrata* (18.37%), *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (16.33% cada una). *Candida albicans* se aisló de todos los tipos de muestras (catéter, orina, sangre y líquido de diálisis); ocho de los aislados de *C. parapsilosis* fueron obtenidos de catéter, principalmente de CVC (6 aislados) y *C. guilliermondii* del catéter de diálisis TKF (Figura 23-B).

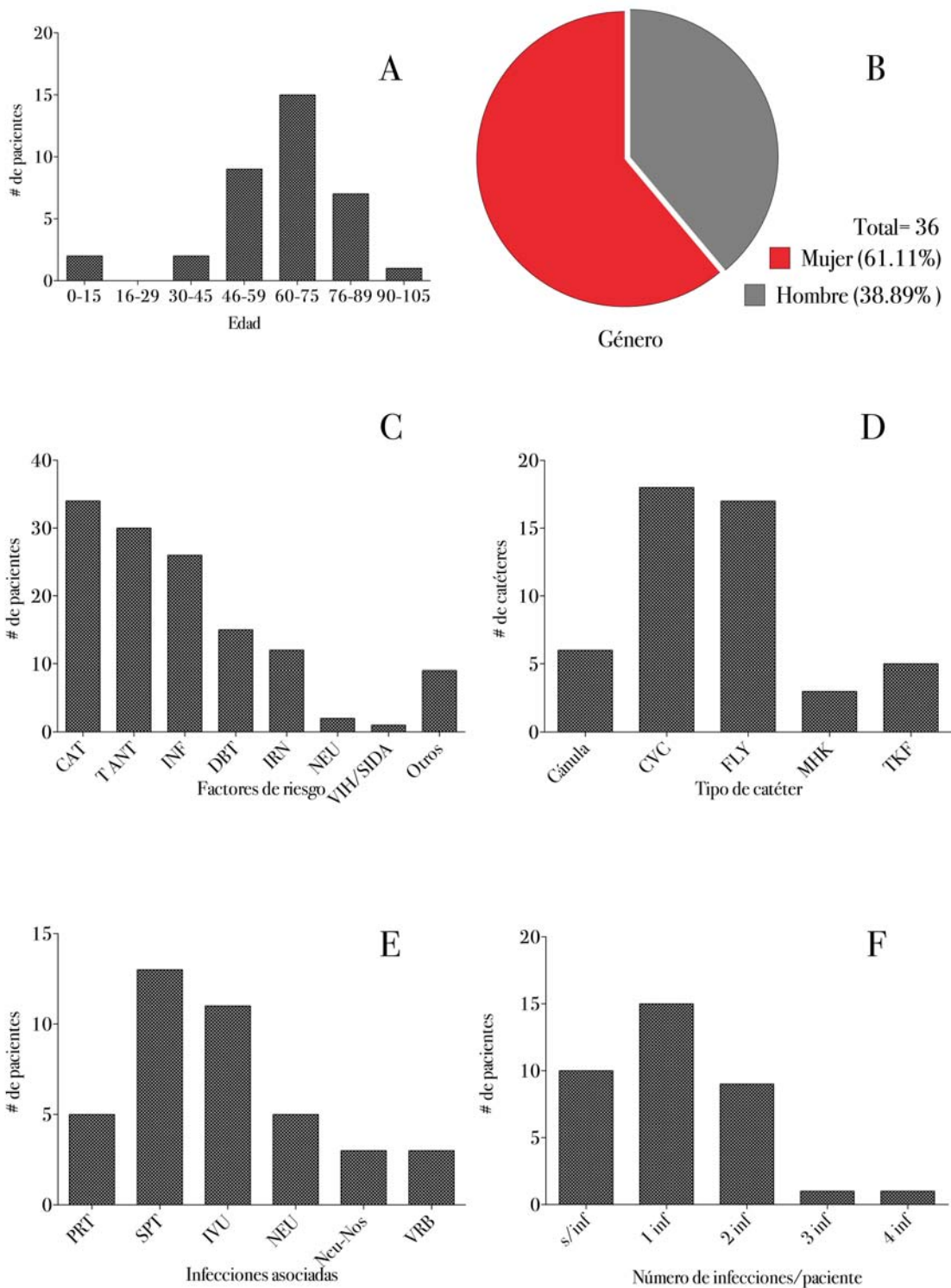


Figura 22. Datos demográficos, factores de riesgo e infecciones de los 36 pacientes, cuyas muestras fueron incluidas en este estudio. A) intervalos de edad, B) porcentajes de mujeres/hombres afectados, C) factores de riesgo, (CAT: catéter; TANT: Terapia antibacteriana; INF: infección; DBT: diabetes; IRN: Insuficiencia renal; NEU: neumonía) D) tipos de catéteres colocados, (CVC: venoso central; FLY: tipo Foley; MHK: tipo Mahurkar; TKF: tipo Tenckhoff), E) tipos de infecciones detectadas (PRT: peritonitis; SPT: septicemia; IVU: infección vías urinarias; NEU: neumonía; Nue-Nos: neumonía de origen nosocomial; VRB: infecciones de vías respiratorias bajas). y F) número de infecciones detectadas en el paciente.

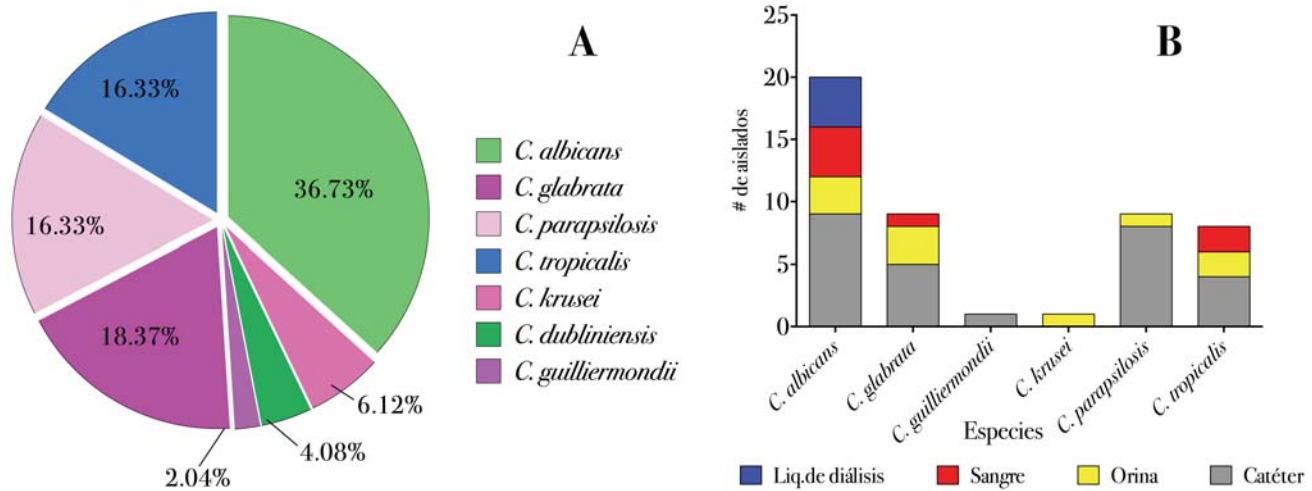


Figura 23. A) Especies de *Candida* identificadas por métodos tradicionales. B) Origen de la muestra y especies de *Candida* aisladas de cada una de ellas.

Las características macro y microscopias fueron verificadas en cada uno de los aislados, de la Figura 24 a la 29 se muestra las imágenes correspondientes a las especies incluidas en este estudio: *C. albicans* (Figura 24), *C. glabrata* (Figura 25), *C. guilliermondii* (Figura 26), *C. krusei* (Figura 27), *C. parapsilosis* (Figura 28) y *C. tropicalis* (Figura 29).

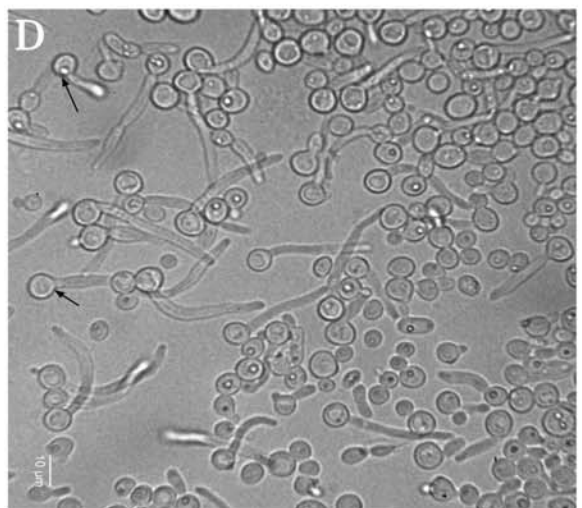
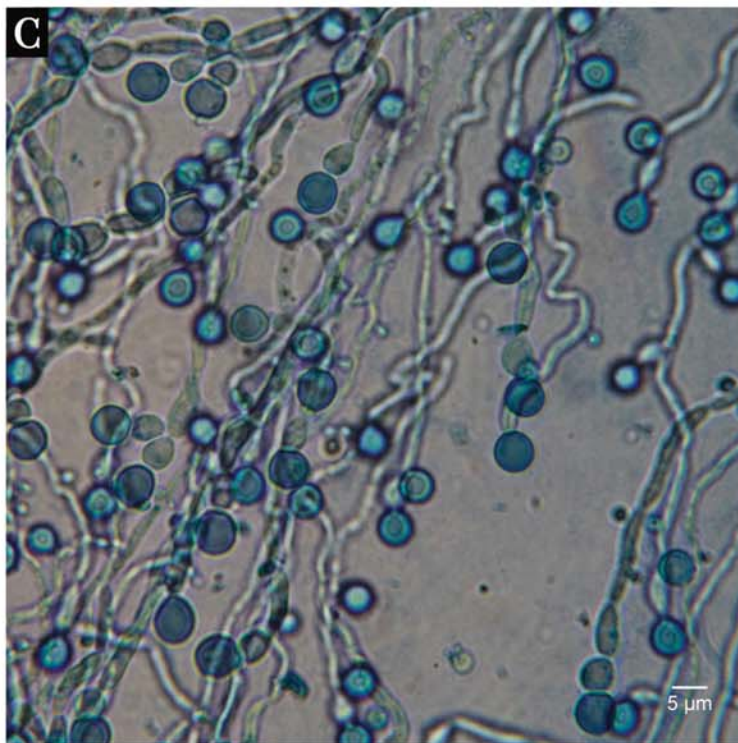
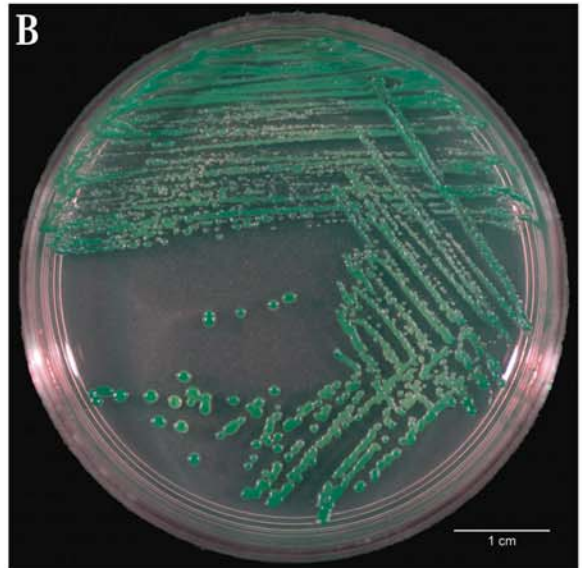
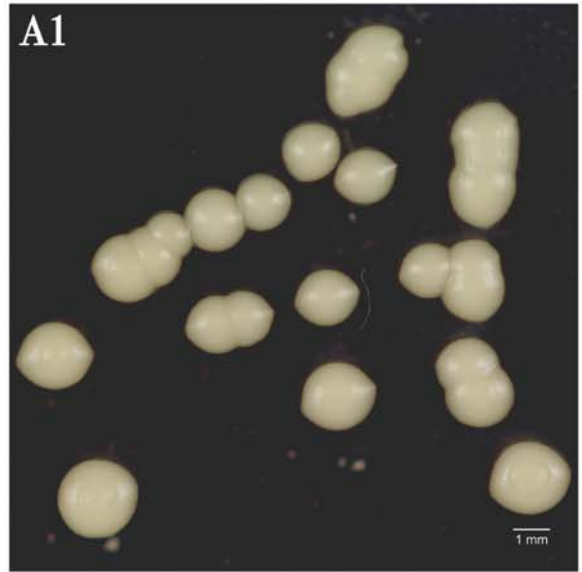
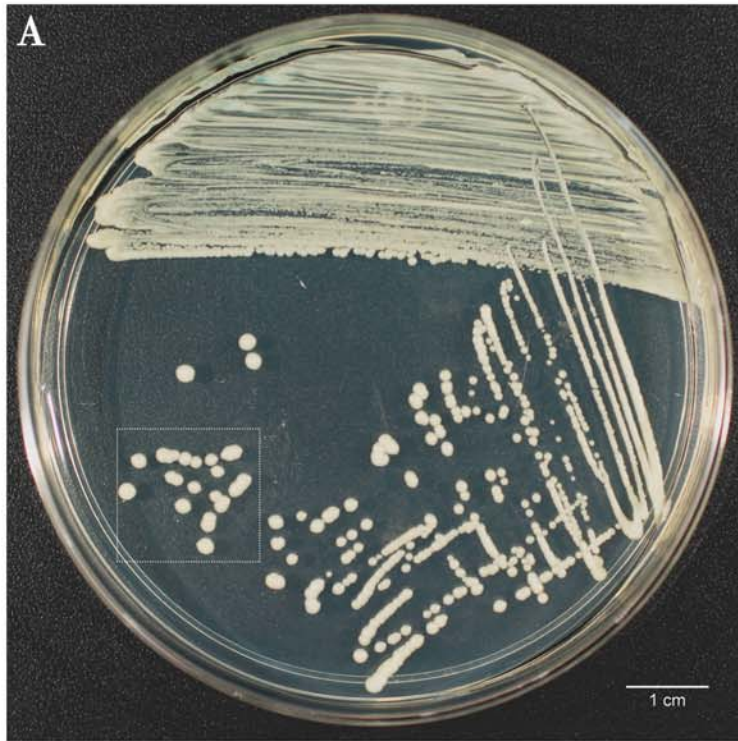


Figura 24. *Candida albicans*

Colonias cremosas, de superficie lisa, color blanco (A); en A1, acercamiento a las colonias de la imagen A (recuadro), células esféricas, ovoides o elongadas, uni o multigemantes (3.5-7 x 4-8 μm), CHROMagar Candida® color verde (B), producción de blastoconidios, pseudohifas, hifas y clamidoconidios (C), formación de tubo germinativo (D).

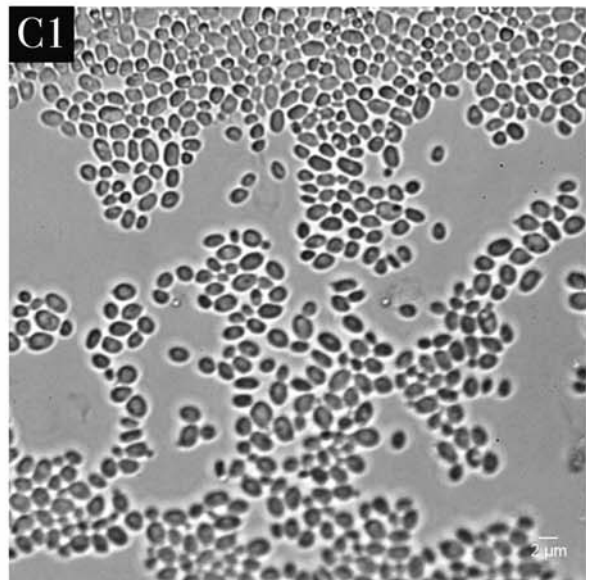
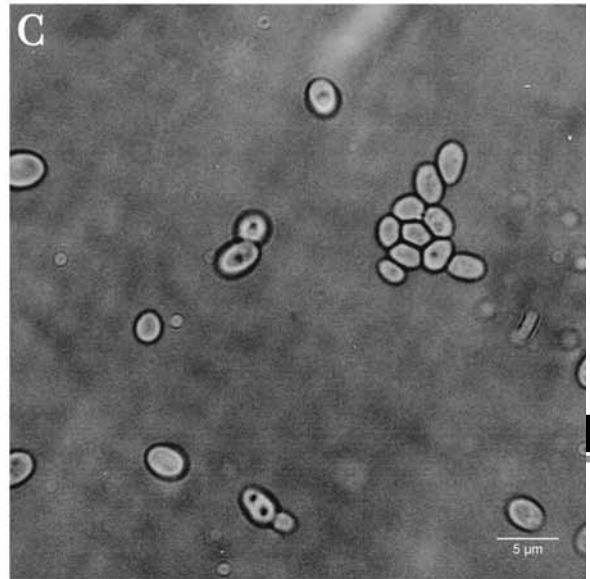
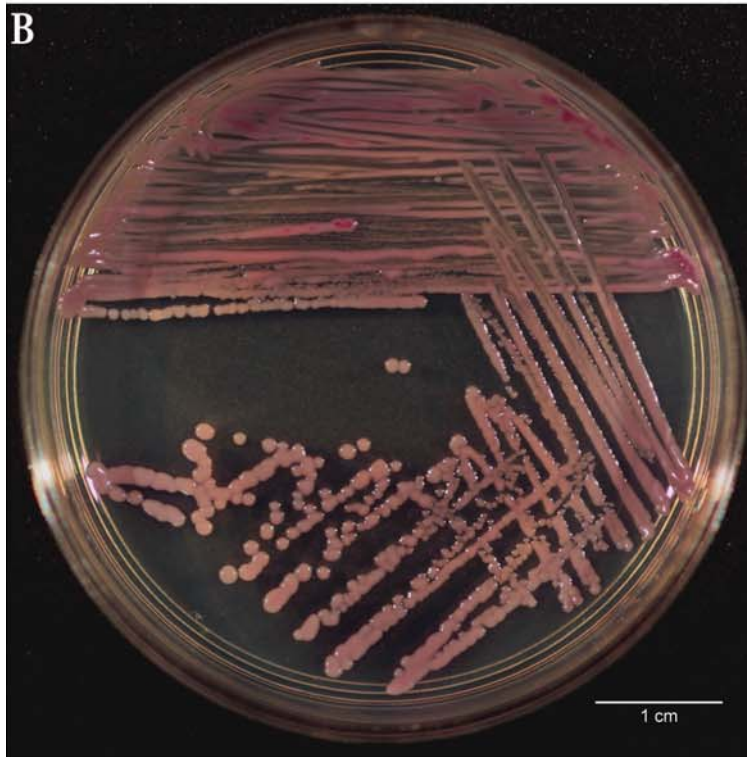
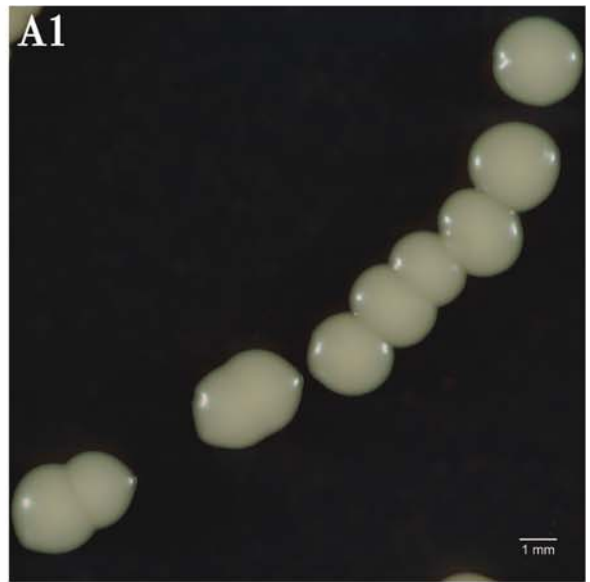
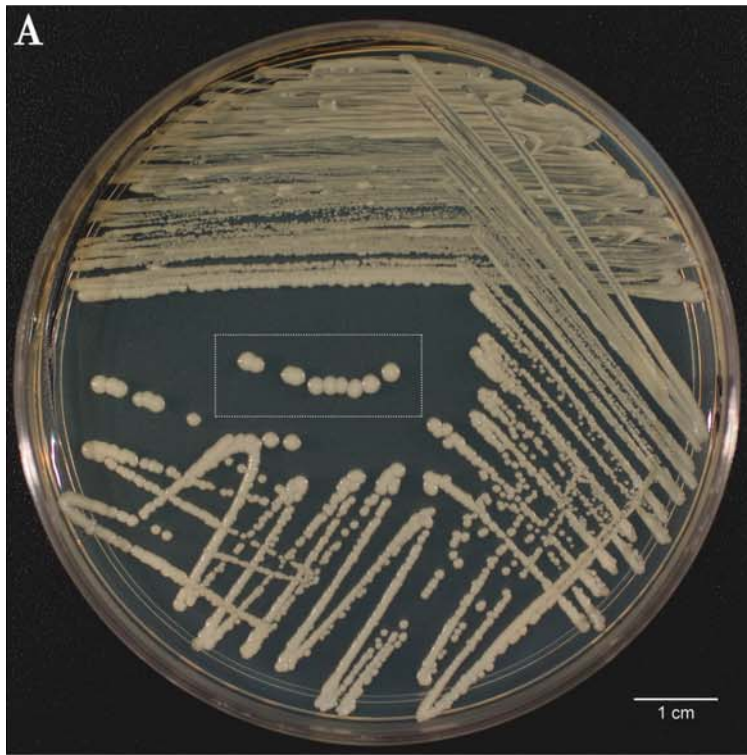


Figura 25. *Candida glabrata*

Colonias cremosas, pequeñas y brillantes; color blanco a crema (A); en A1, acercamiento a las colonias de la imagen A (recuadro); CHROMagar Candida® color púrpura (B); blastoconidios ovoides (2-3 x 3-4 μm) (C y C1).

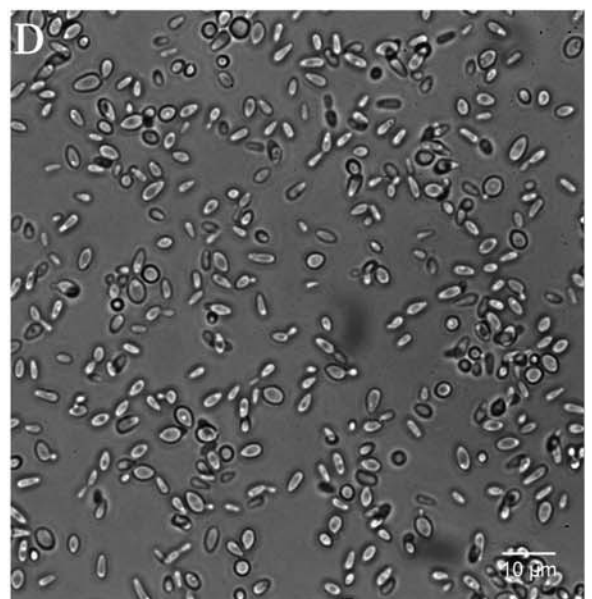
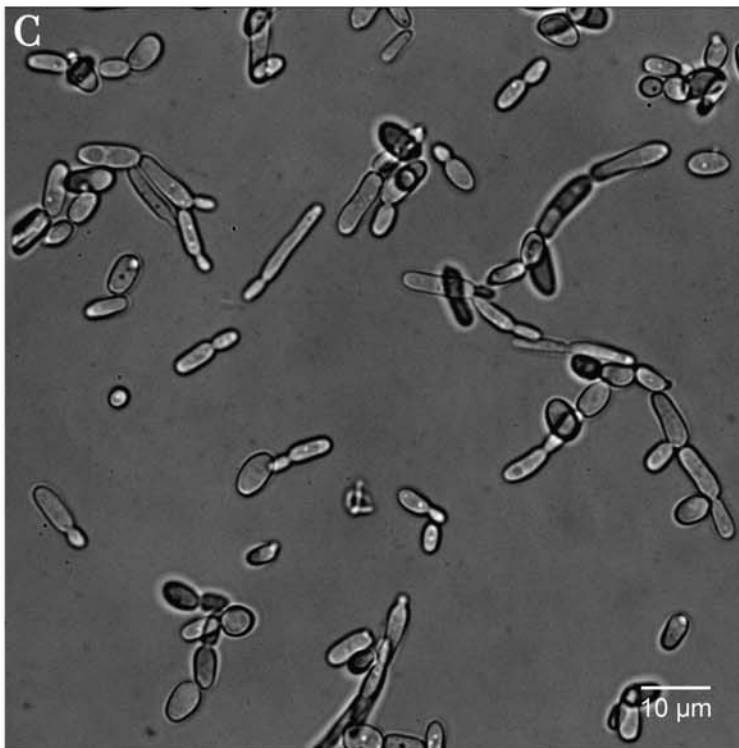
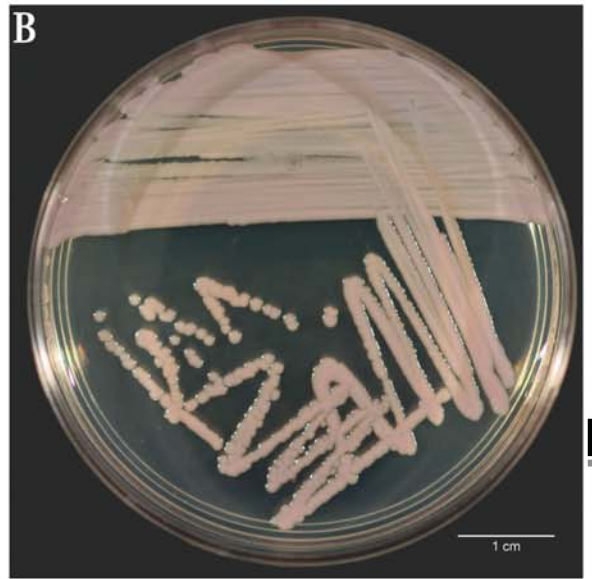
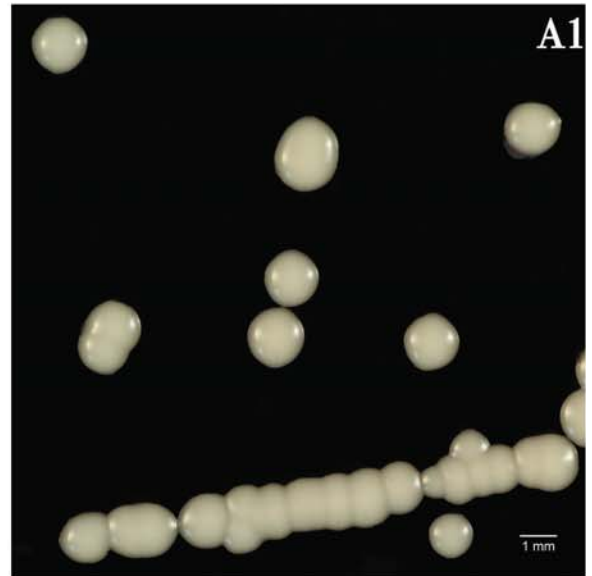
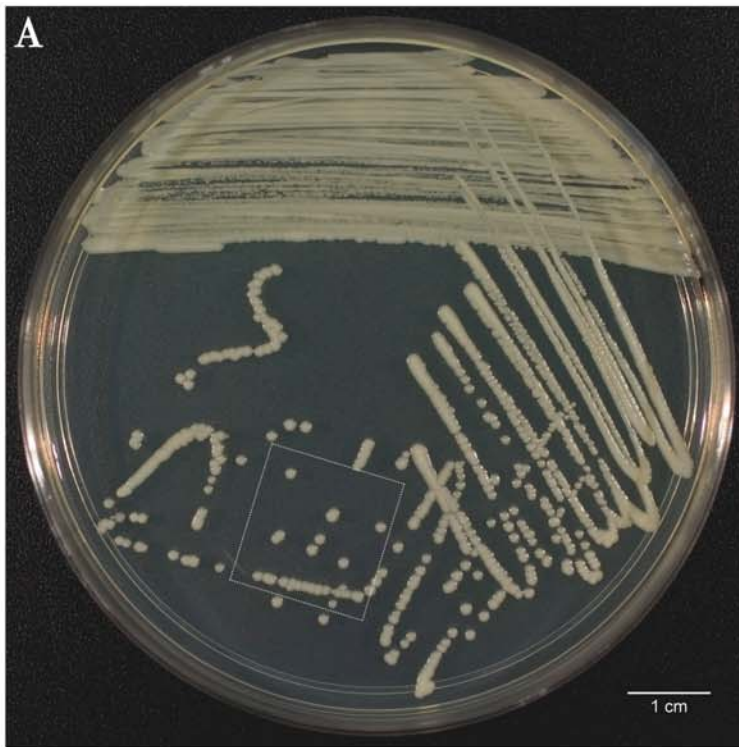


Figura 26. *Candida guilliermondii*

Colonias planas, lisas y brillantes; color blanco (A); en A1, acercamiento a las colonias de la imagen A (recuadro); CHROMagar Candida® colonias rosadas (B); células ovoides o elongadas (2-5 x 3-7 μm); formación de pseudohifas (C) y blastoconidios (D).

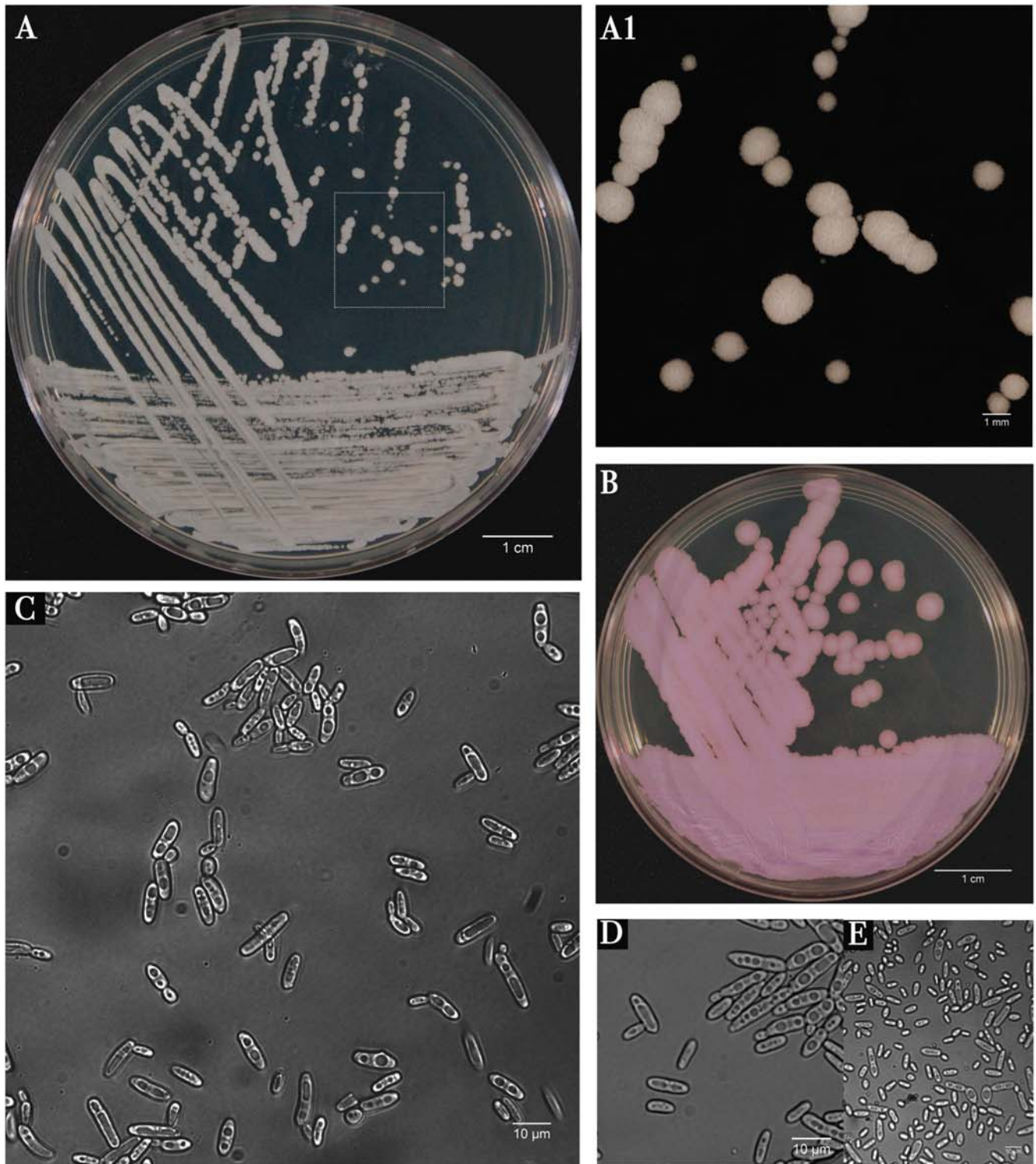


Figura 27. *Candida krusei*

Colonias opacas, planas y secas, con halo de hifas; color crema (A); en A1, acercamiento a las colonias de la imagen A (recuadro); CHROMagar Candida® colonias rosadas con margen blanco y superficie rugosa (B); células rectangulares (2-6 x 4-10 µm), formación de blastoconidios y pseudohifas (C, D y E).

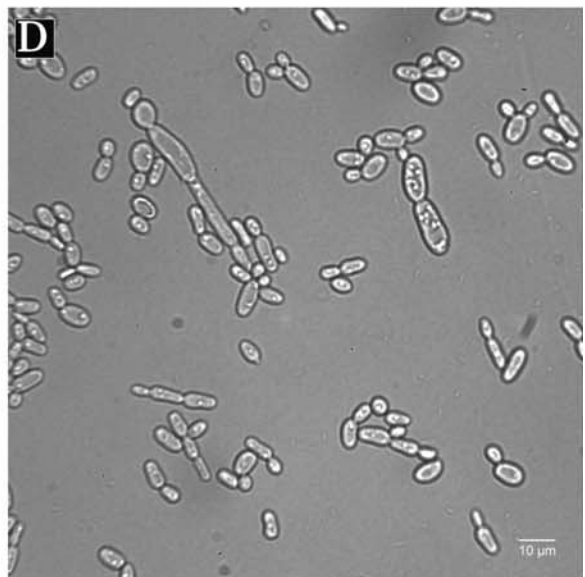
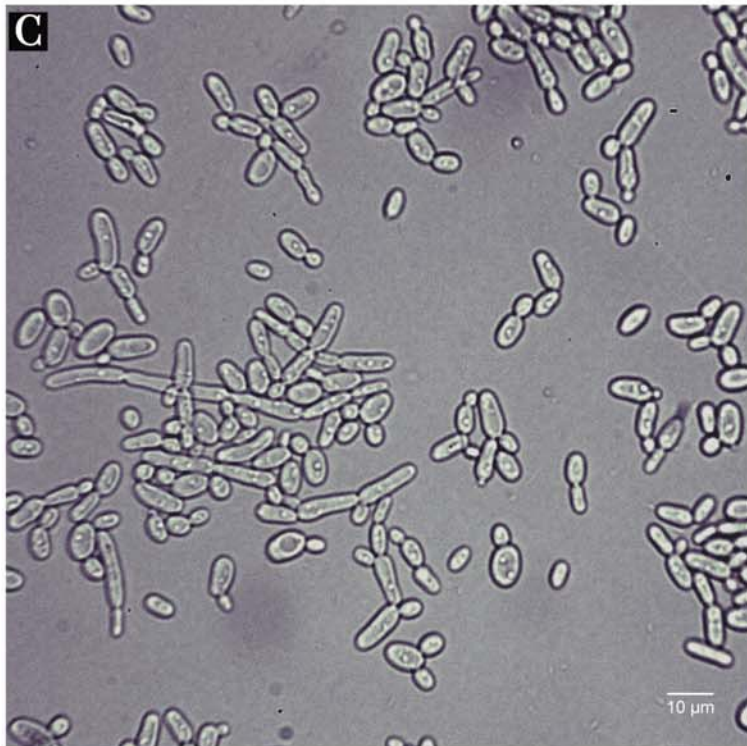
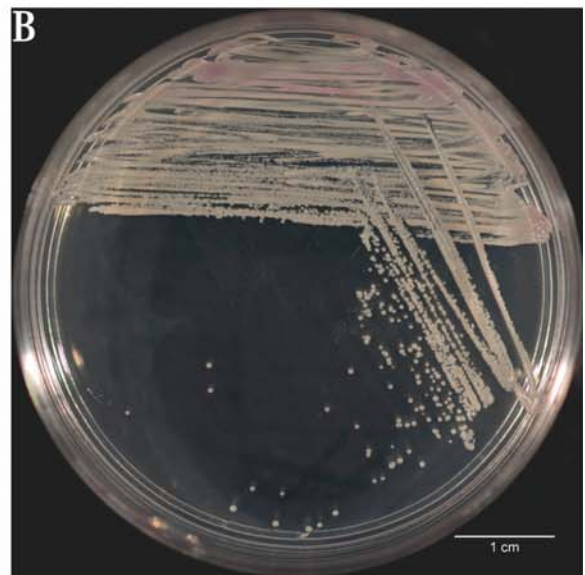
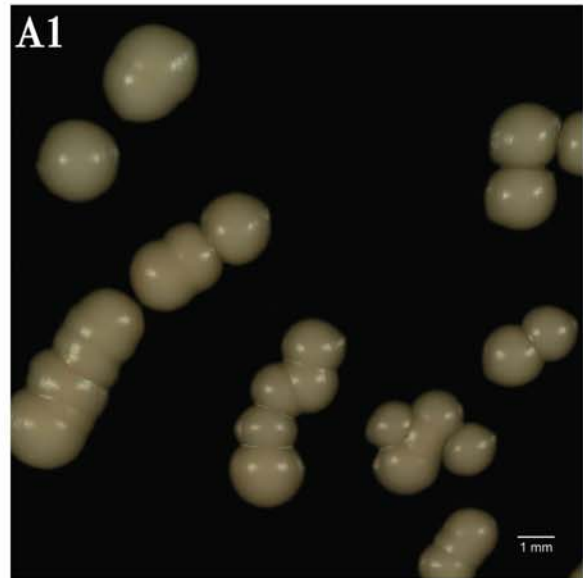
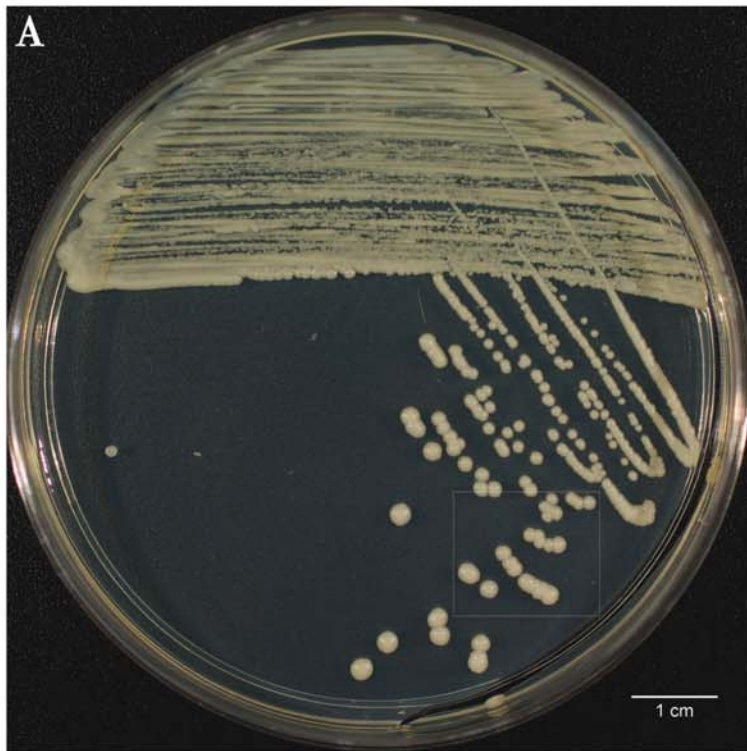


Figura 28. *Candida parapsilosis* complejo

Colonias cremosas, opacas de color blanco (A); en A1, acercamiento a las colonias de la imagen A (recuadro), CHROMagar Candida® rosa pálido (B); células ovoides (2.5-4 x 3-8 μm), formación de blastoconidios, pseudohifas e hifas (C, D).

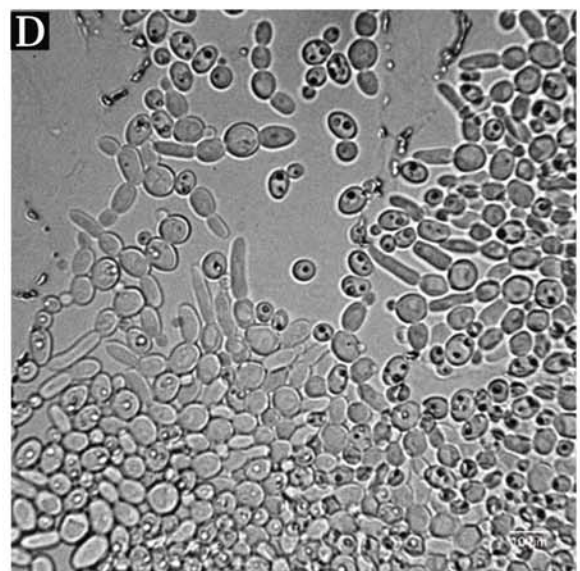
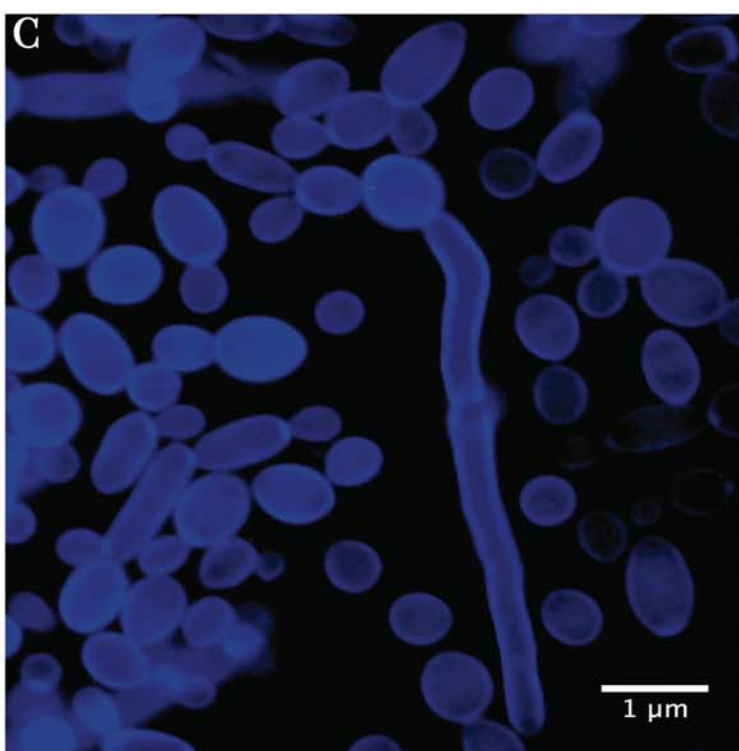
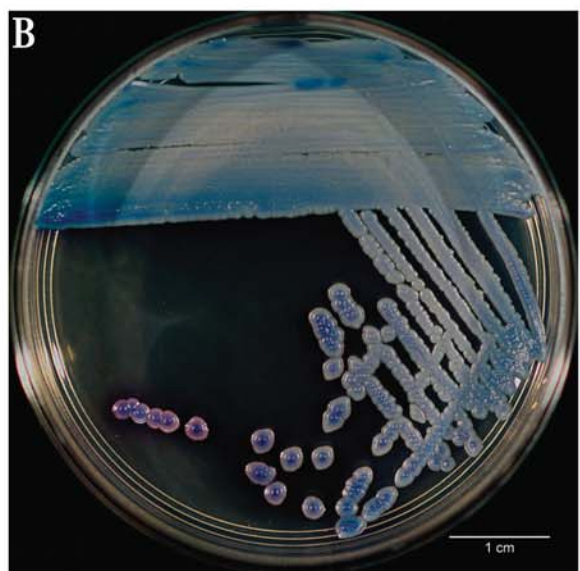
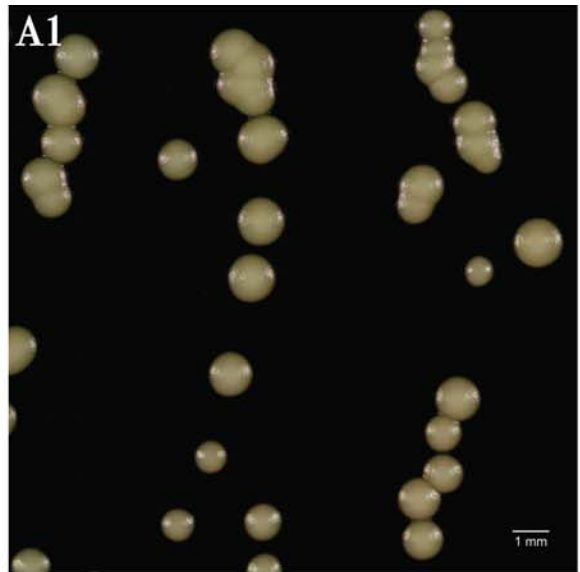
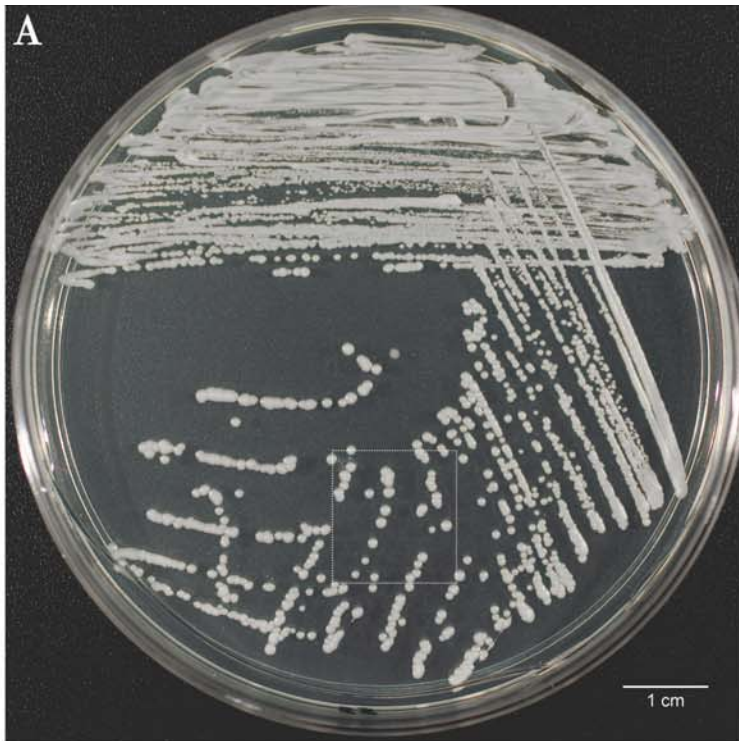


Figura 29. *Candida tropicalis*

Colonias cremosas, lisas, con halo filamentososo, color blanco a crema (A); en A1, acercamiento a las colonias de la imagen A (recuadro); CHROMagar Candida® colonias azul acero (B); células redondas, ovoides o elongadas (3.5-7 x 5.5-10 μm); blastoconidios, pseudohifas e hifas con tinción blanco de calcoflúor (C), blastoconidios y pseudohifas (D).

La identificación por métodos moleculares fue realizada en 48 de 49 aislados de *Candida* por PCR y RFLP. En la Figura 30 se muestra el gel de agarosa de la PCR de la región ITS1-ITS4.

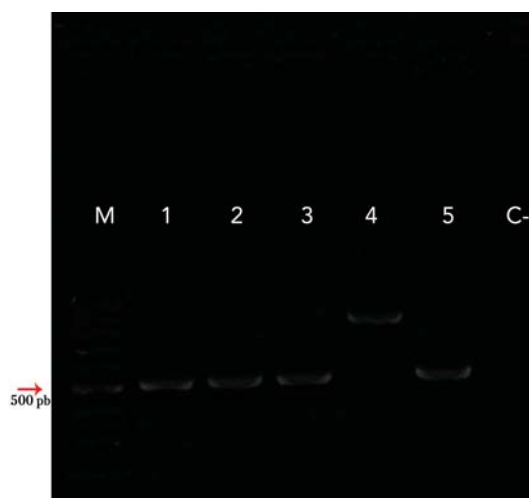


Figura 30. Gel de agarosa al 1.5% teñidos con Saber Safe[®] que muestra el producto amplificado (ITS1-ITS4) de algunos de los aislados. M: marcador de peso molecular 100 pb; carriles 1-3 y 5 se observan bandas de \approx 500 pb; en el carril 4 el fragmento es de \approx 850 pb; el carril C- corresponde al control negativo. La flecha indica la banda de 500 pb.

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación de la región ITS1-ITS4 y digeridos con la enzima de restricción *MspI* (Figura 31), fueron comparados con los patrones de corte (Cuadro 14).

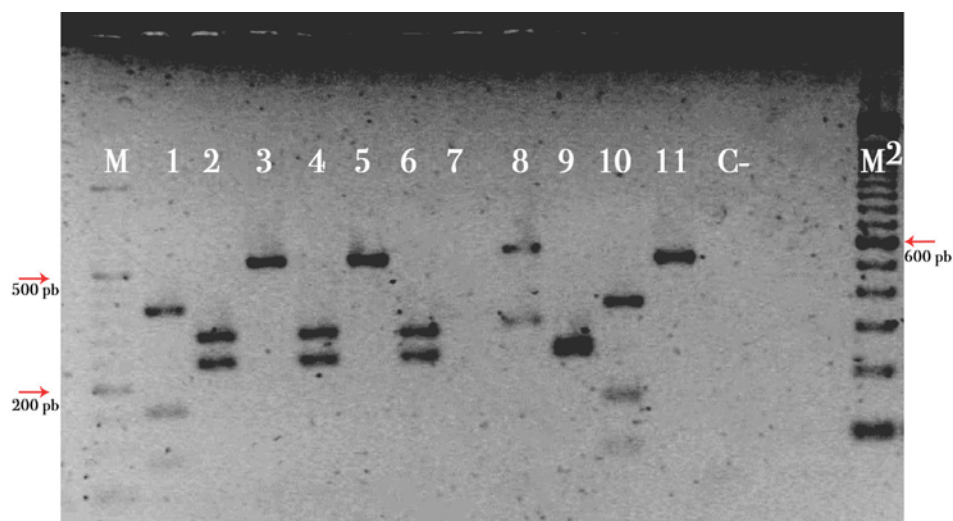


Figura 31. Gel de agarosa al 3% del RFLP con la enzima de restricción *MspI* para la identificación de las especies de *Candida* (Imagen convertida a negativo (Adobe Photoshop, San Jose, CA). M: Marcador de peso molecular de 50 pb; carriles 1 y 10: fragmentos de 80,150,370 de *C. guilliermondii* (aislados CAT14 y 6260); carriles 2 y 4: fragmentos de 239 y 298 de *C. albicans* y/o *C. dubliniensis* (aislados CAT47 y CAT52V); carril 6: fragmentos de 239 y 298 de *C. dubliniensis* (cepa ATCC MYA-577); carriles 3, 5, 11: fragmento de 530 de *C. parapsilosis* (aislados CAT51, 39 y cepa ATCC 90030); carril 8: fragmentos 320 y 561 de *C. glabrata* (cepa ATCC 2001) y carril 9: fragmentos de 250 y 260 de *C. krusei* (cepa ATCC 6258); M2: marcador de peso molecular 100 pb.

Los dos aislados identificados previamente como *C. dubliniensis*, por la técnica de la PCR correspondieron a *C. albicans* (Figura 32), dando un total de 20 aislados de esta especie.

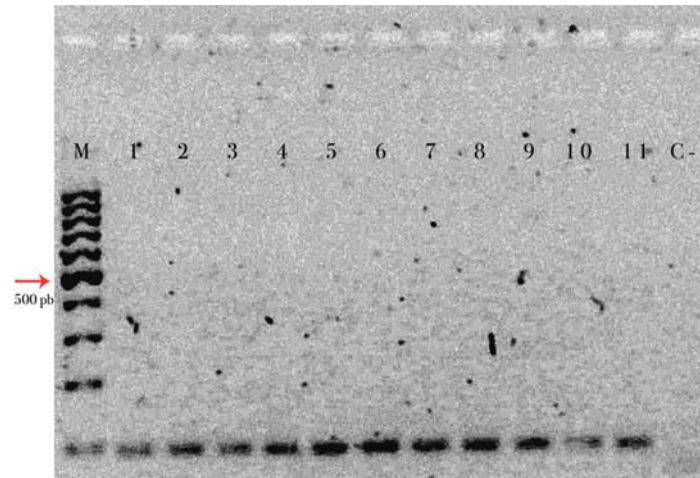


Figura 32. Gel de agarosa al 2 % de la PCR para la diferenciación de *C. dubliniensis* de *C. albicans* (Imagen convertida a negativo (Adobe Photoshop). M: marcador de peso molecular 100 pb. Carriles 1 a 11: fragmentos de 100 pb de *C. albicans* (aislados 54552, 64555V, 67860, 80320B, 83332H, 83332V, 87325, CAT15V, CAT43, CAT47, CAT52V).

Todos los aislados de *C. parapsilosis* fueron identificados como *C. parapsilosis sensu stricto*, después de someterlos a PCR del gen SADH y RFLP con *BanI* (Figura 33), los patrones de corte para esta enzima se muestran en el Cuadro 17. El aislado CAT51 (identificado como *C. krusei* por métodos tradicionales) fue identificado como *C. parapsilosis sensu stricto*, quedando un total de 9 aislados (18.36%).

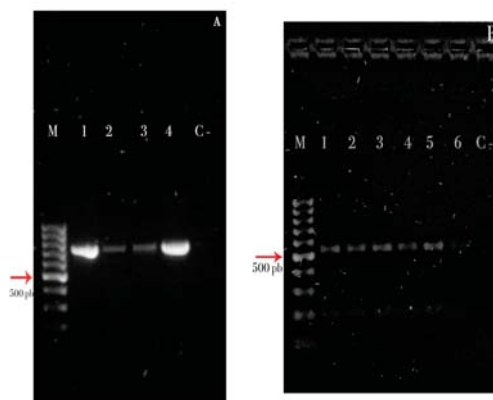


Figura 33. A) Gel de agarosa al 2 % de la amplificación del gen SADH del complejo *C. parapsilosis*. Carril 1, 2, 3, 4 fragmento de 720 pb; carriles: 1- 29019: *C. parapsilosis sensu stricto* ATCC 29019; 2- *C. metapsilosis* ATCC96144; 3- *C. orthopsilosis* ATCC9614; 4- *C. parapsilosis* complejo, aislado CAT11; B) Gel de agarosa al 3% del RFLP con *BanI* para la identificación de *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis sensu stricto*. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 1-6: *C. parapsilosis sensu stricto* (Aislados 81, 100, 45786, CAT33, CAT37, CAT51).

La identificación de los aislados por métodos moleculares re-ubicó a nivel de especie el 6% de los aislados (Figura 34), principalmente los aislados identificados previamente como *C. dubliniensis* a *C. albicans* (40.81%).

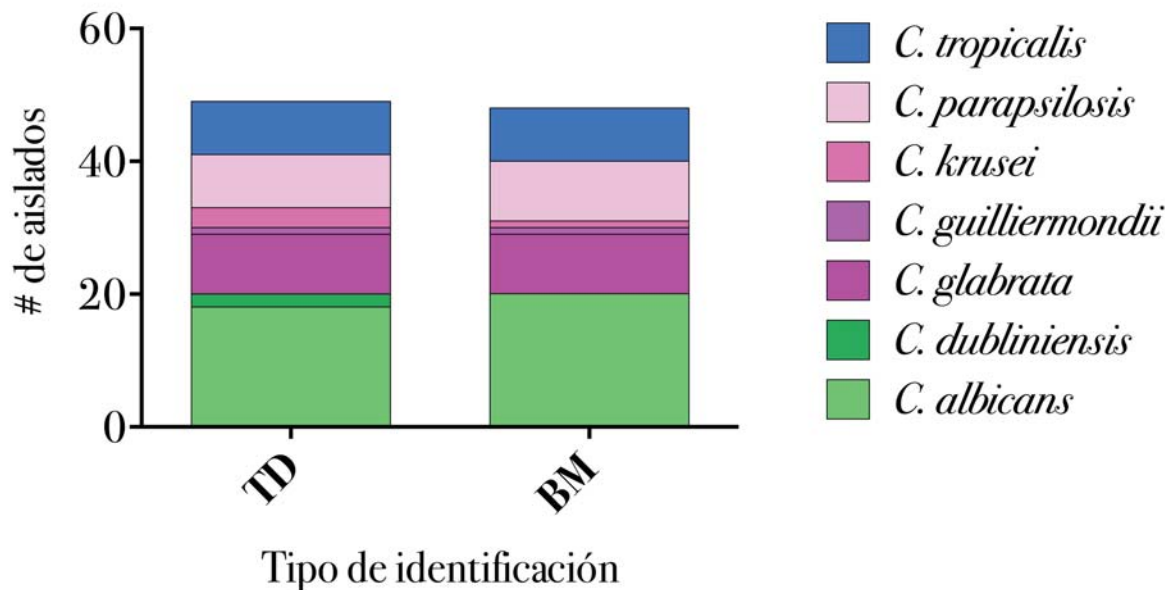


Figura 34. Comparación de la identificación de las especies por técnicas tradicional (TD) y por técnicas moleculares (BM). *Candida albicans* (40.81%), *C. glabrata* (18.36%), *C. guilliermondii* (2.04%), *C. krusei* (2.04%), *C. parapsilosis* (18.36%) y *C. tropicalis* (16.33%)

Las especies más frecuentes relacionadas con la mortalidad de los pacientes fueron *C. albicans* (50%), seguido por *C. glabrata* (6.12%), *C. tropicalis* (6.12%) y *C. parapsilosis sensu stricto* (2.00%). Los factores de riesgo presentes en este grupo fue el uso de catéter (14 pacientes); en 9 de ellos con más de un catéter colocado. El 85% presentaron algún tipo de infección y la administración de antimicrobianos.

En siete de los 36 pacientes se aisló más de una especie de las diferentes muestras procesadas: seis con dos especies (*C. albicans* – *C. glabrata* (5) y *C. glabrata* – *C. tropicalis* (1)) y una con tres especies (*C. albicans* – *C. glabrata* – *C. krusei*). Por otro lado, de dos pacientes se obtuvieron diferentes especies de distintas muestras: en el primer caso se aisló la asociación de *C. albicans* y *C. glabrata* de sangre y *C. tropicalis* de orina; en el segundo caso se aisló *C. albicans* de sangre y CVC (intraluminal), y *C. glabrata* en CVC (extraluminal).

7.2 Características físicas de las superficies estudiadas

Los cuatro materiales plásticos incluidos como superficies para el desarrollo de las biopelículas, fueron los catéteres de uso común en hospitales (CVC, FLY, MHK y TKF). Para cada superficie los valores de rugosidad (Ra) obtenidos por MFA, los cuales variaron dependiendo de la escala de observación. En la Figura 35 se muestra la gráfica con los valores de rugosidad a las distintas escalas. La superficie que presentó un mayor Ra fue FLY a las diferentes escalas y TKF fue en el que se observó la menor.

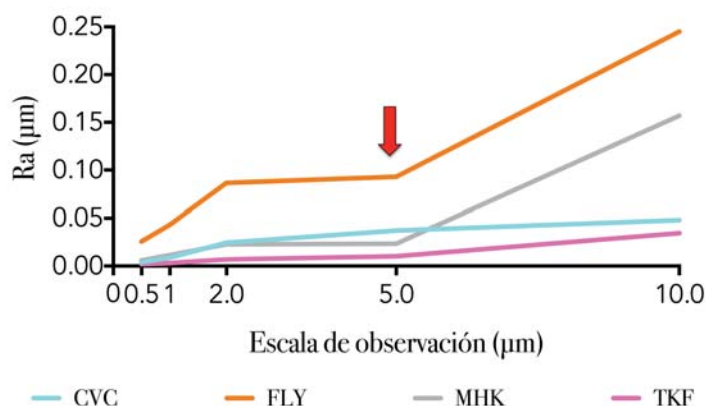


Figura 35. Grado de rugosidad (Ra) determinada para cada una de las superficies (CVC, FLY, MHK y TKF) probadas a distintas escalas de observación. La flecha roja indica la escala base para este trabajo.

Los valores obtenidos para los parámetros de rugosidad se presentan en el Cuadro 19. La superficie del catéter FLY mostró un mayor grado de rugosidad con 67 nm, mientras que TKF el menor (7 nm).

Cuadro 19. Valores de Ra y r obtenidos para cada una de las superficies a una escala de 5 µm.

Superficie	Ra (nm) ± DS	Rz (nm) ± DS	Rzjis (nm) ± DS	Índice de área (r)	Área nominal (mm ²) ± DS	Área real (mm ²) ± DS
CVC	40.9±15.8	305.2±124.4	167.5±90.3	1.04	19.05±2.6	19.8±2.6
FLY	78.6±22.9	506.6 ± 219.1	265.3±129.1	1.13	28.9±9.4	32.7±10.6
MHK	18.1±5.3	140.2 ± 51.1	86.9±38.7	1.03	28.1±1.2	29.0±1.3
TKF	7.3±1.6	51.4 ± 18.1	25±10.3	1.00	26.5±1.6	26.5±1.6

Ra: rugosidad; Rz: pico más alto; Rzjis: promedio de los 10 picos más altos; Área nominal: el total del área susceptible a ser colonizado por las células; Área real: el área nominal multiplicado por r.

En la Figura 36 se muestran los perfiles topográficos de cada una de las superficies utilizadas.

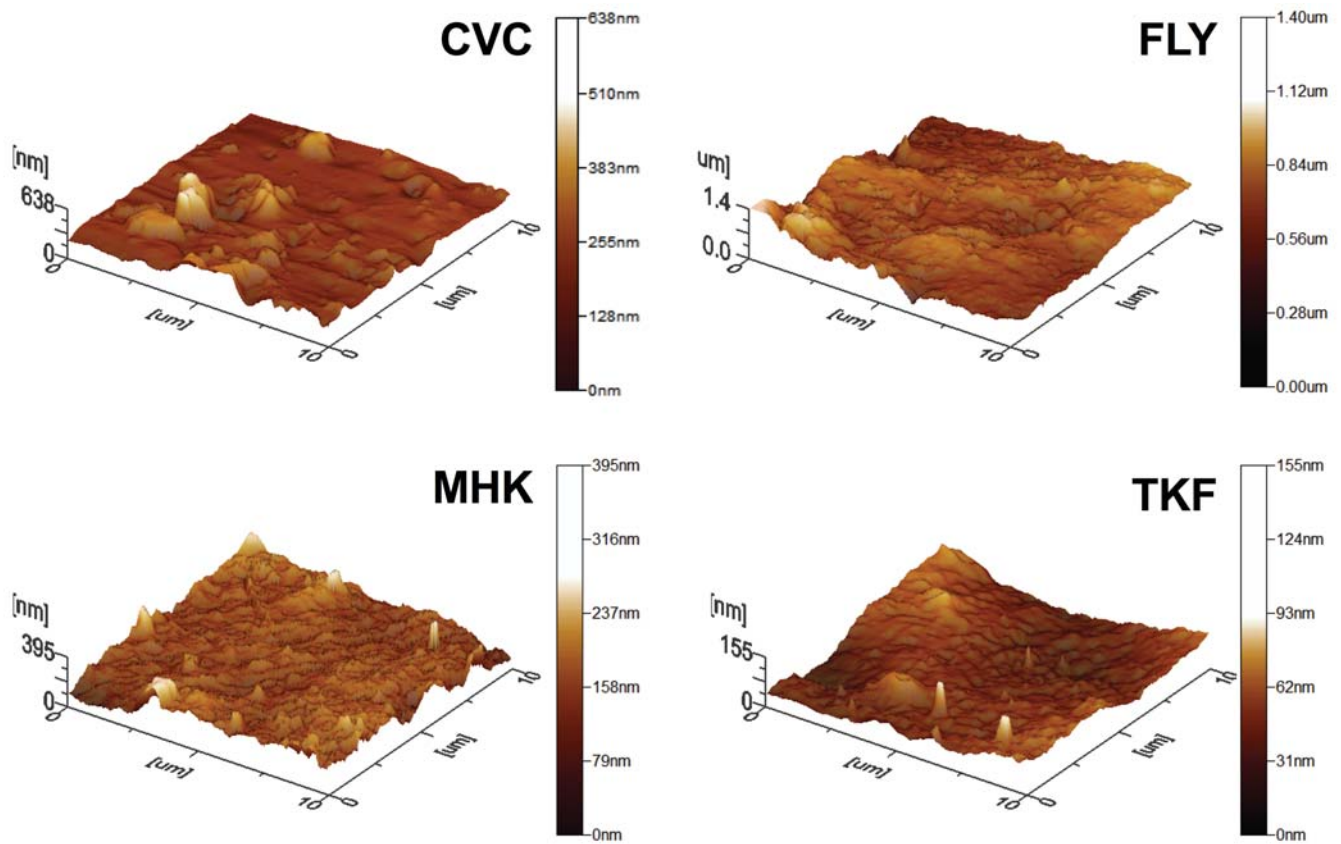


Figura 36. Imágenes de MFA de las superficies plásticas de los cuatro distintos catéteres utilizados para la formación de biopelículas. Fragmento de 10x10 μm analizados, la escala en Z muestra el rango de Ra de cada uno de ellos (CVC, MHK y TKF en nm y FLY en μm).

Para evaluar la mojabilidad de las superficies se obtuvieron imágenes de los ángulos de contacto con tres diferentes líquidos. El ángulo de contacto obtenido con el agua para todas las muestras fue $<90^\circ$, por lo que se determinó que los materiales fueron hidrofílicos y por lo tanto, la mojabilidad, adhesividad y energía de superficie fueron bajas. En la Figura 37 se ejemplifica la morfología de las gotas de formamida, agua MQ y glicerol en CVC.

A los ángulos de contacto aparentes obtenidos se les aplicó la corrección por el efecto de la rugosidad (Ecuación de Wenzel) y se presentan en el Cuadro 20. De acuerdo a los ángulos de contacto obtenidos con el agua las superficies mostraron una tendencia a ser hidrofílicas, siendo el CVC el que mostró mayor hidrofilia ($p < 0.05$).

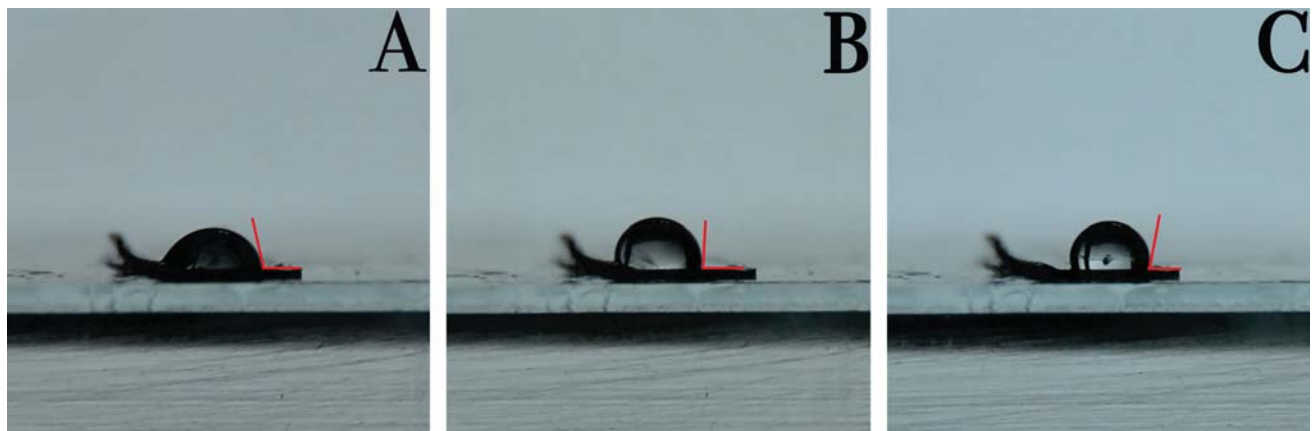


Figura 37. Ángulos de contacto obtenidos sobre CVC con formamida (A), agua MQ[®] (B) y glicerol (C).

Cuadro 20. Ángulos de contacto obtenidos y ajustados con la corrección de Wenzel para cada una de las superficies probadas con tres líquidos.

Superficie	Agua (°)± DS	Formamida (°)± DS	Glicerina (°)± DS
CVC	73.2 ± 3.7	72.1 ± 1.4	87.8 ± 1.5
FLY	86.2 ± 0.6	117.3 ± 1.4	105.9 ± 3.0
MHK	85.4 ± 1.0	84.7 ± 0.7	58.2 ± 4.8
TKF	86.5 ± 1.0	102.9 ± 2.1	86.4 ± 0.6

En el Cuadro 21 se presentan los valores de energía de superficie (ES), los valores de los componentes polar y disperso de acuerdo con la ecuación de OWRK. En este grupo de superficies se realizó una regresión logística entre las dos características valoradas (Ra y ES). El catéter FLY mostró los valores más altos de ES y Ra (Figura 38).

Cuadro 21. Valores de la energía de superficie, su componente polar y disperso para cada una de las superficies. (media ±DS).

Superficie	Energía de superficie (mJ/m ²)	Componente polar σ_l^p (mJ/m ²)	Componente disperso σ_l^d (mJ/m ²)
CVC	0.046 ± 0.011	0.019 ± 0.004	0.026 ± 0.02
FLY	0.33 ± 0.026*	0.015 ± 0.001	0.31 ± 0.04
MHK	0.073 ± 0.045	0.03 ± 0.01	0.042 ± 0.04
TKF	0.05 ± 0.016	0.029 ± 0.003	0.021 ± 0.01

Valores medios y DS *indican diferencia significativa $p < 0.05$ entre los grupos de superficies

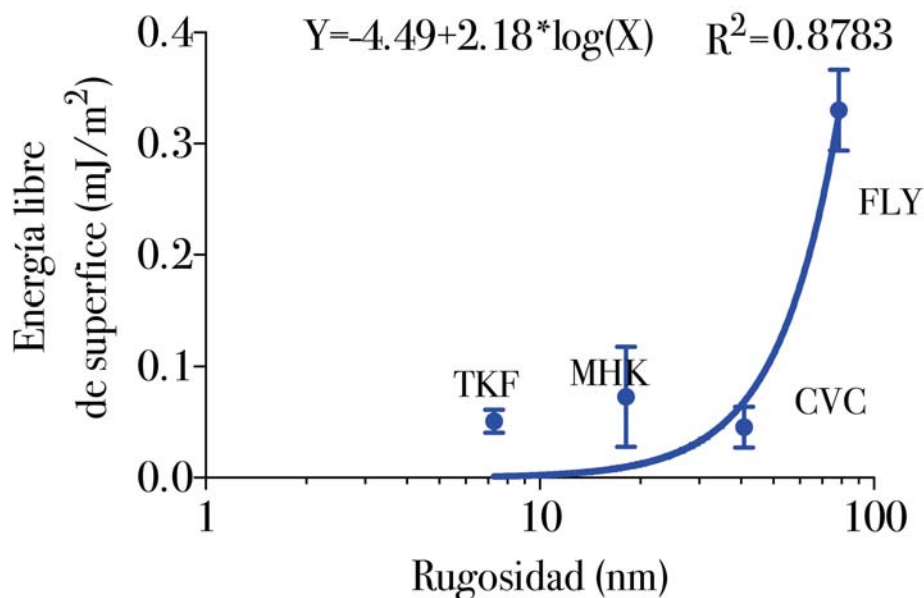


Figura 38. Gráfica de la rugosidad vs energía de superficie (media \pm DS) de cada una de las superficies probadas (CVC, FLY, MHK, TKF). Se observa un aumento de la rugosidad de manera logarítmica a la ES. Con una R^2 de 0.87.

7.3 Formación de biopelícula

7.3.1 Cuantificación de la biopelícula

Fase de adhesión. La adhesión de las levaduras sobre las superficies se comparó contra la rugosidad y el área real disponible. Las levaduras no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las superficie probadas (Figura 39-A); cuando el área real de cada superficie se contempló se observó diferencia significativa dependiendo de la especie (Figura 39-B). *Candida albicans* mostró diferencia significativa entre la superficies CVC y FLY ($p < 0.001$).

Cabe destacar que las especies que mostraron la mejor capacidad de adhesión determinada por la actividad metabólica fueron *C. albicans* y *C. glabrata* sobre las cuatro superficies probadas.

Los diferentes parámetros que conforman la topografía de la superficie como la Ra y la Rz (Cuadro 19) no mostraron un efecto directo en la adhesión, ya que el catéter FLY mostró la superficie con los valores más altos de estas variables y fue la superficie que reveló la menor adhesión de levaduras, mientras que el CVC presentó valores intermedios de Ra (40.9 nm) y Rz (305.2 nm) y la mayor adhesión (Figura 40).

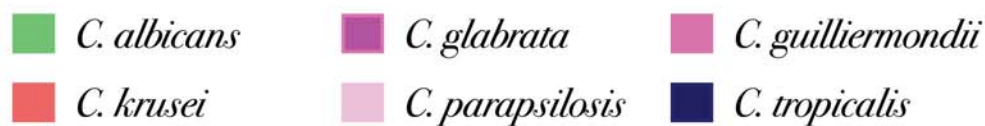
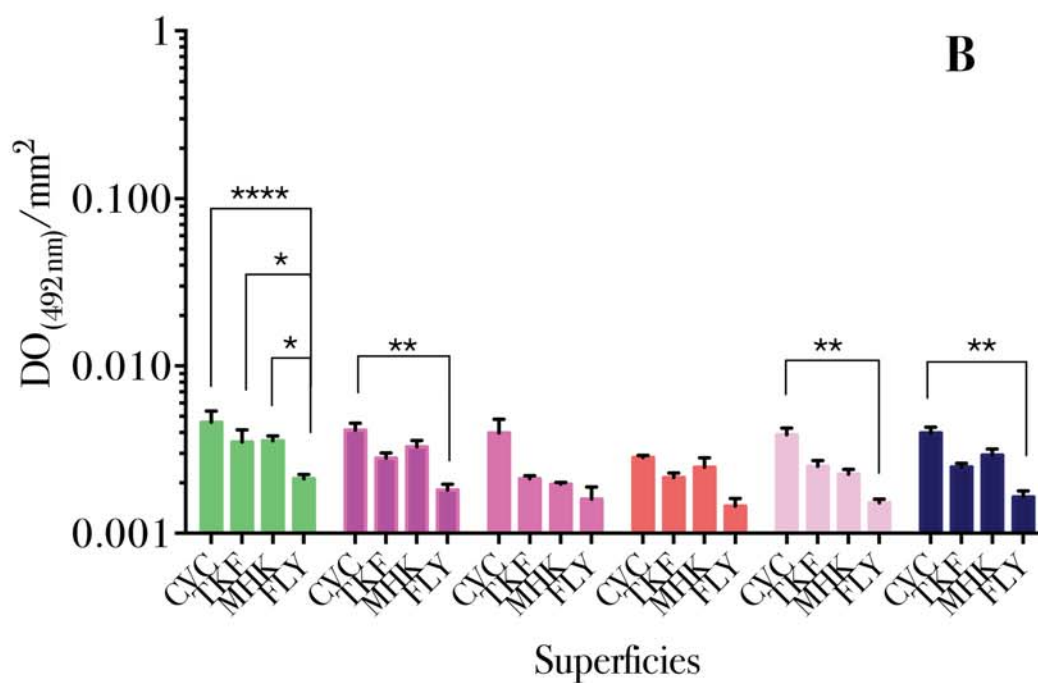
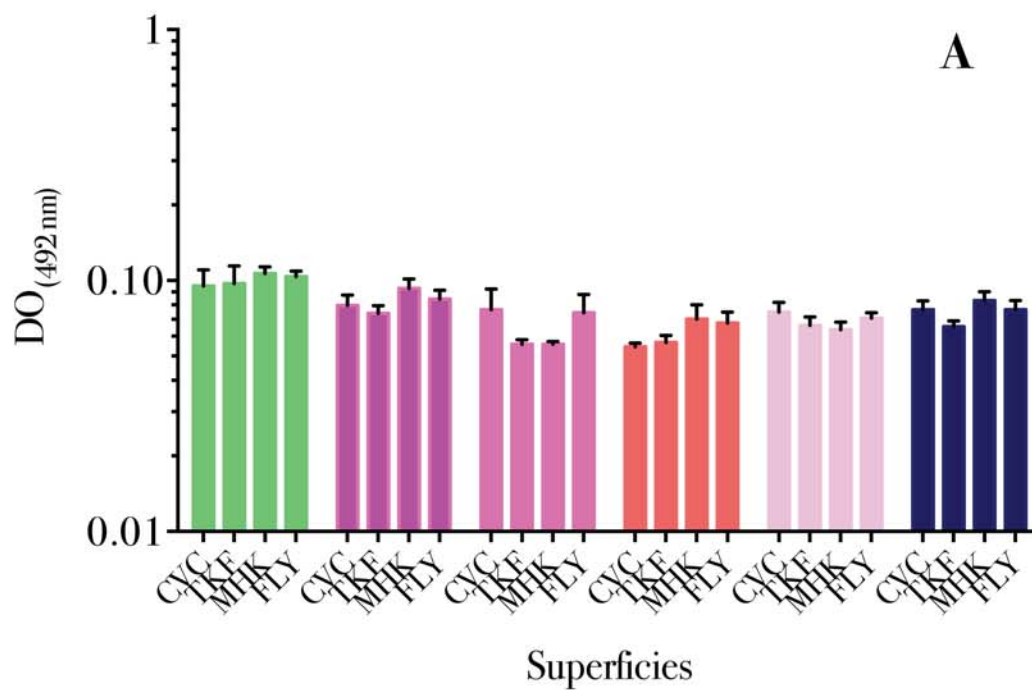


Figura 39. Comparación de la fase de adhesión entre las seis diferentes especies, en cada una de las superficies. A) DO₄₉₂ de la fase de adhesión. B) DO₄₉₂ estandarizadas con el área real disponible en la fase de adhesión. Asterisco: diferencia significativa **** $p < 0.001$, * $p < 0.01$.

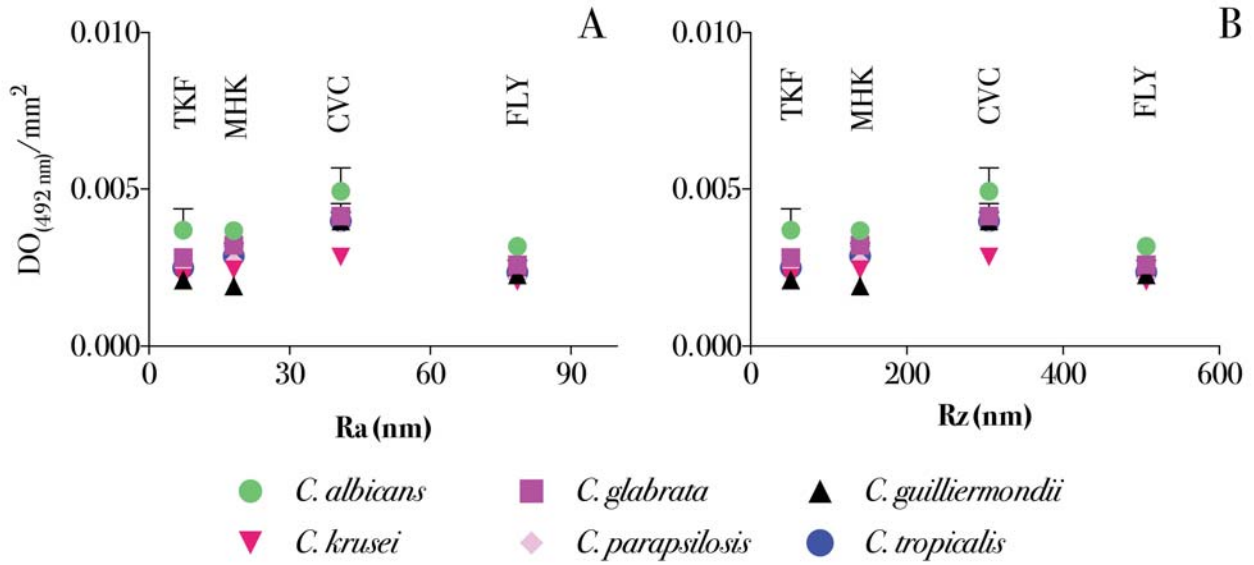


Figura 40. Efecto de la Ra (A) y Rz (B) sobre la adhesión de las levaduras de las diferentes especies de *Candida* en cada una de las superficies. *Candida albicans* y *C. glabrata* fueron las especies que presentaron mayor adhesión independientemente de la superficie.

Otra de las características de las superficies valoradas en este trabajo fue la ES, la cual mostró un efecto directo sobre la adhesión de las levaduras, ya que las superficies con valores entre 0.05 y 0.07 mJ/m² fueron las que presentaron una mayor adhesión (Figura 41-A). El componente disperso fue la principal energía involucrada en esta etapa (CVC, MHK y TKF) (Figura 41-B), mientras que el componente polar no mostró influencia durante esta fase (Figura 41-C).

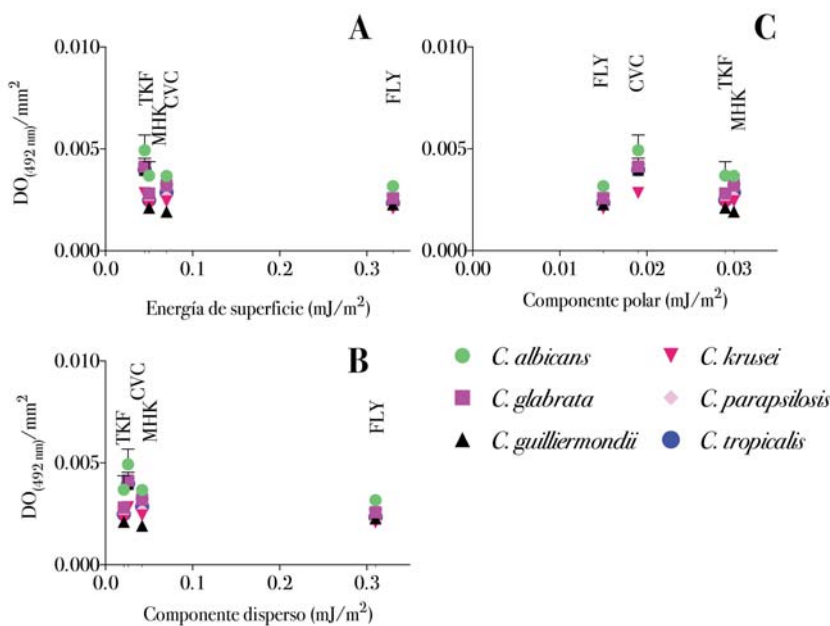


Figura 41. Efecto de la energía de superficie sobre la adhesión de las levaduras en la fase de adhesión en la formación de la biopelícula: (A) energía de superficie; (B) componentes polar, (C) componente disperso.

En el anexo 1 se presenta de la Figura 54 a la correspondientes a las gráficas comparativas de la formación de biopelícula en todos los tiempos analizados contra las características topográficas y de energía de superficie, en las cuales se observan los patrones de crecimiento durante la adhesión y las fases de maduración, dependientes de las características físicas y químicas del material.

Fase de maduración: Después de los 90 min del contacto inicial (fase de adhesión) se obtuvieron imágenes por MEB, en las cuales se observaron diversas estructuras fúngicas. En la Figura 42 se muestran estructuras de *C. albicans*, algunas levaduras gemantes y tubos germinativos adheridos a la superficie de CVC, MHK y TKF (A-C-D), mientras que en FLY (B) solo pseudohifas e hifas. Además en estas imágenes se aprecian las características de rugosidad, de cada una de las superficies, donde destaca la rugosidad de FLY (Figura 42-B).

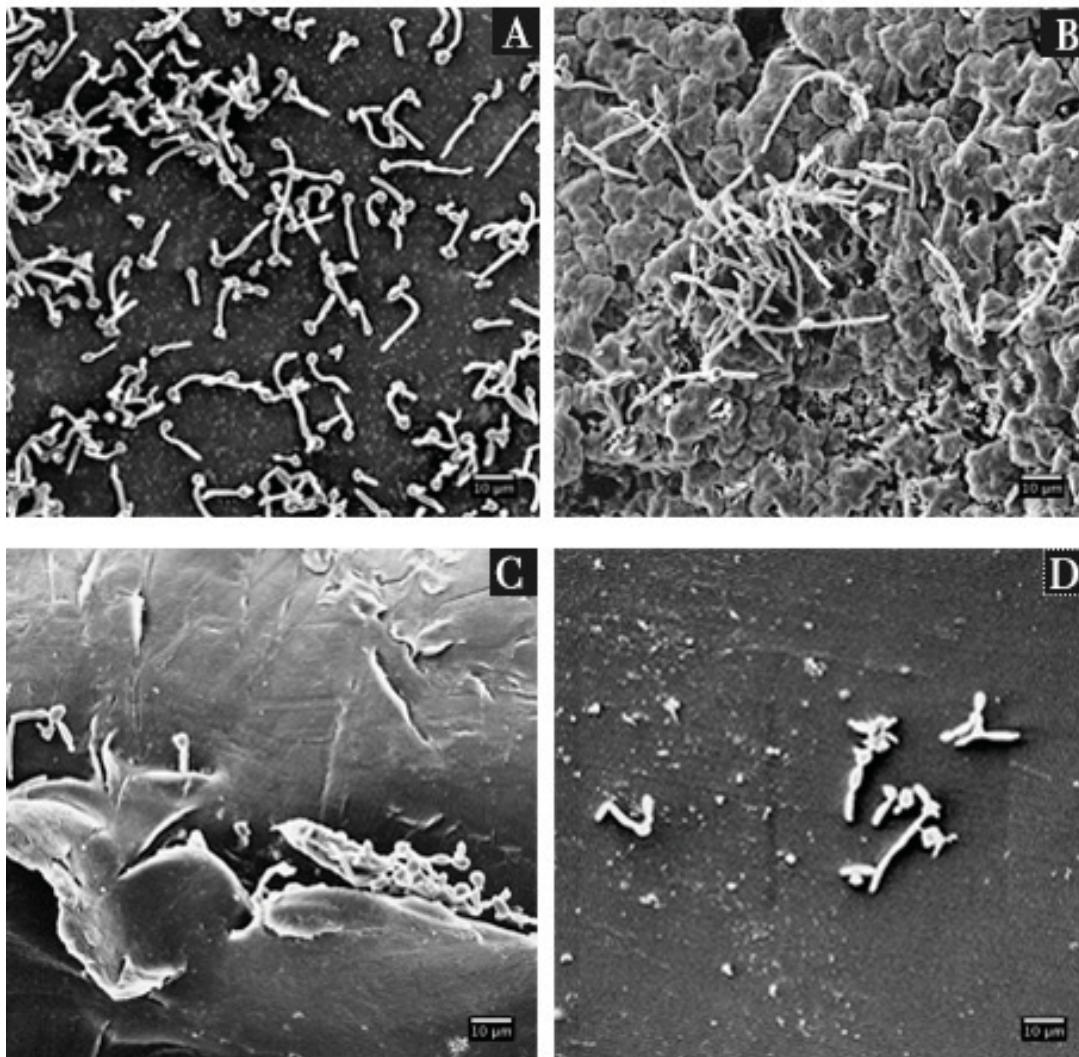


Figura 42. Imágenes obtenidas por MEB de *Candida albicans* después de 90 min de incubación (fase de adhesión) en las cuatro superficies. En A) superficie CVC, abundantes tubos germinativos; B) FLY, pseudohifas y blastoconidios; en C) MHK crecimiento en el pliegue del catéter; y D) TKF pseudohifas.

Fase inicial y de maduración. En la Figura 43 se presentan las gráficas de las curvas de formación de la biopelícula (0 a 72 h), para cada una de las especies, en las cuatro superficies. En su fase inicial el desarrollo de la biopelícula se observó a las 12 h en todas las especies; la superficie que mostró la mayor formación de biopelícula fue en CVC con todas las especies; en *C. albicans* (A), *C. glabrata* (B) y *C. parapsilosis* (E) fue significativamente mayor que en FLY ($p < 0.05$). Por otro lado, *C. tropicalis* (F) mostró un crecimiento continuo y sostenido sobre las cuatro superficies, desde la fase de adhesión (90 min), mostrando los valores más altos de $DO_{(492nm)}/mm^2$ a las 72 h (0.013 ± 0.0019), seguida por *C. albicans* con un valor de 0.011 ± 0.0007 $DO_{(492nm)}/mm^2$ a las 72 h (A), en esta especie se observó una caída en la formación de la biopelícula a las 48 h. Las curvas de crecimiento de las biopelículas de *Candida guilliermondii* (C) y *C. krusei* (D) fueron similares en las cuatro superficies, con un promedio general de $DO_{(492nm)}/mm^2$ de 0.006 ± 0.0010 y 0.007 ± 0.0004 , respectivamente.

La capacidad de formación de biopelículas por las especies estudiadas se comparó en cada una de las superficies en los tiempos probados, en la Figura 44 se muestran las gráficas, donde *C. albicans* y *C. tropicalis* fueron las que presentaron la mayor capacidad para desarrollar biopelícula. En CVC (A), *Candida albicans* mostró la mayor formación de biopelícula a las 24 h (0.012 ± 0.0010 $DO_{(492nm)}/mm^2$), en comparación con las otras especies; a las 48 h hubo un decremento (0.011 ± 0.0007 $DO_{(492nm)}/mm^2$). *Candida tropicalis* mantuvo un crecimiento sostenido de la formación de biopelícula significativamente mayor ($p < 0.05$) que el resto de las especies a las 72 h (0.013 ± 0.0019 $DO_{(492nm)}/mm^2$). En FLY (B), *C. albicans* fue la especie con mayor formación de biopelícula ($p < 0.05$) a las 24 h. En MHK (C), *C. albicans* y *C. tropicalis* tuvieron la mayor capacidad de formación de biopelícula a partir de la 12 h, en comparación con *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. *Candida albicans* presentó una capacidad superior de desarrollar esta estructura en comparación de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* ($p < 0.05$) hasta el final del experimento (72 h); este comportamiento fue similar en TKF (D), ya que *C. albicans* fue la especie con mayor formación de biopelícula a partir de las 12 hasta las 48 h, sin embargo *C. tropicalis* tuvo una producción mayor a las 72 h.

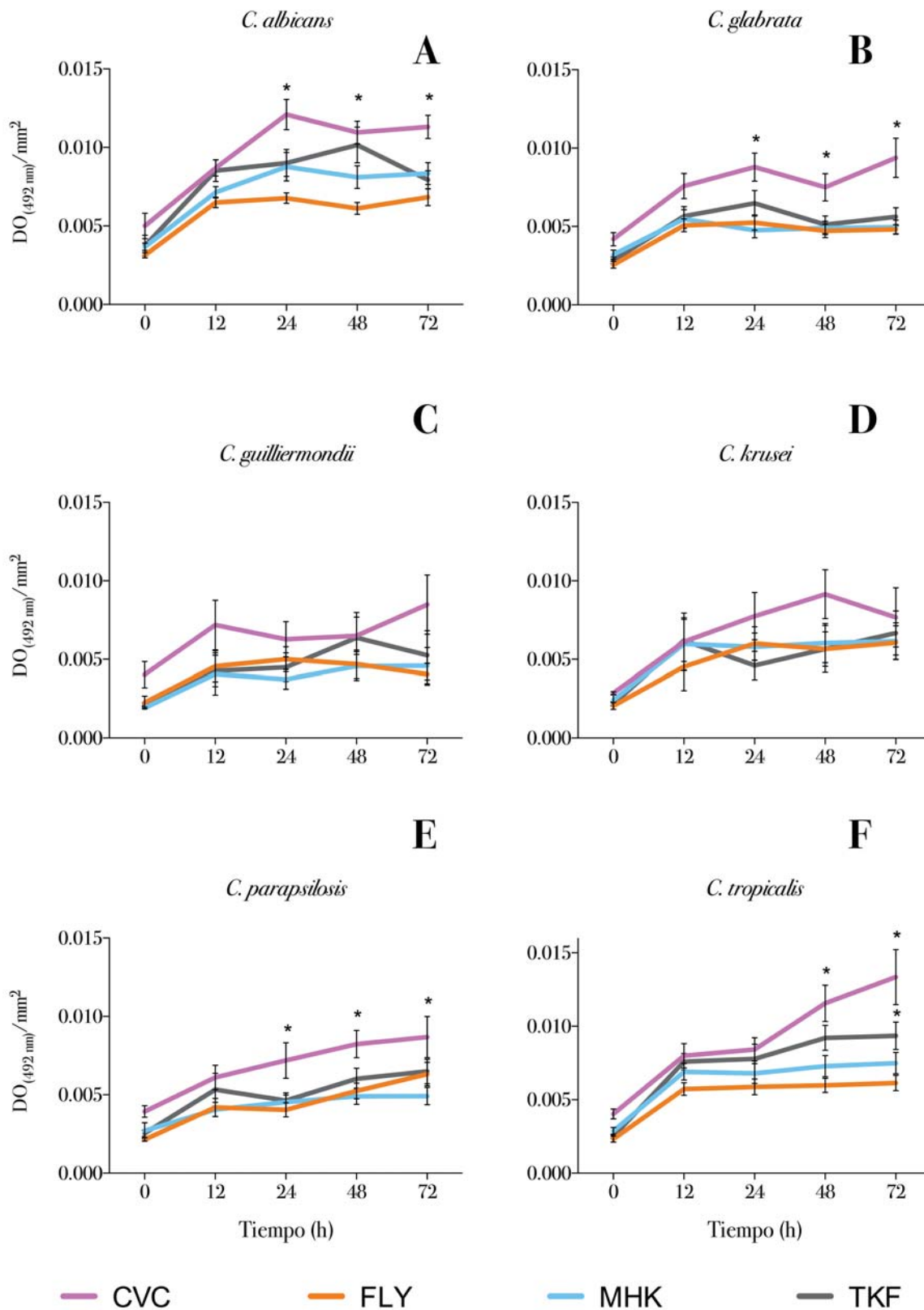


Figura 43. Curvas de formación de biopelícula de *C. albicans* (N=20) (A), *C. glabrata* (N=10) (B), *C. guilliermondii* (N=2) (C), *C. krusei* (N=2) (D), *C. parapsilosis* (N=10) (E), *C. tropicalis* (N=9) (F) sobre CVC, FLY, MHK y TKF. El asterisco indica diferencia significativa $p < 0.05$ en la formación de biopelícula y las superficies.

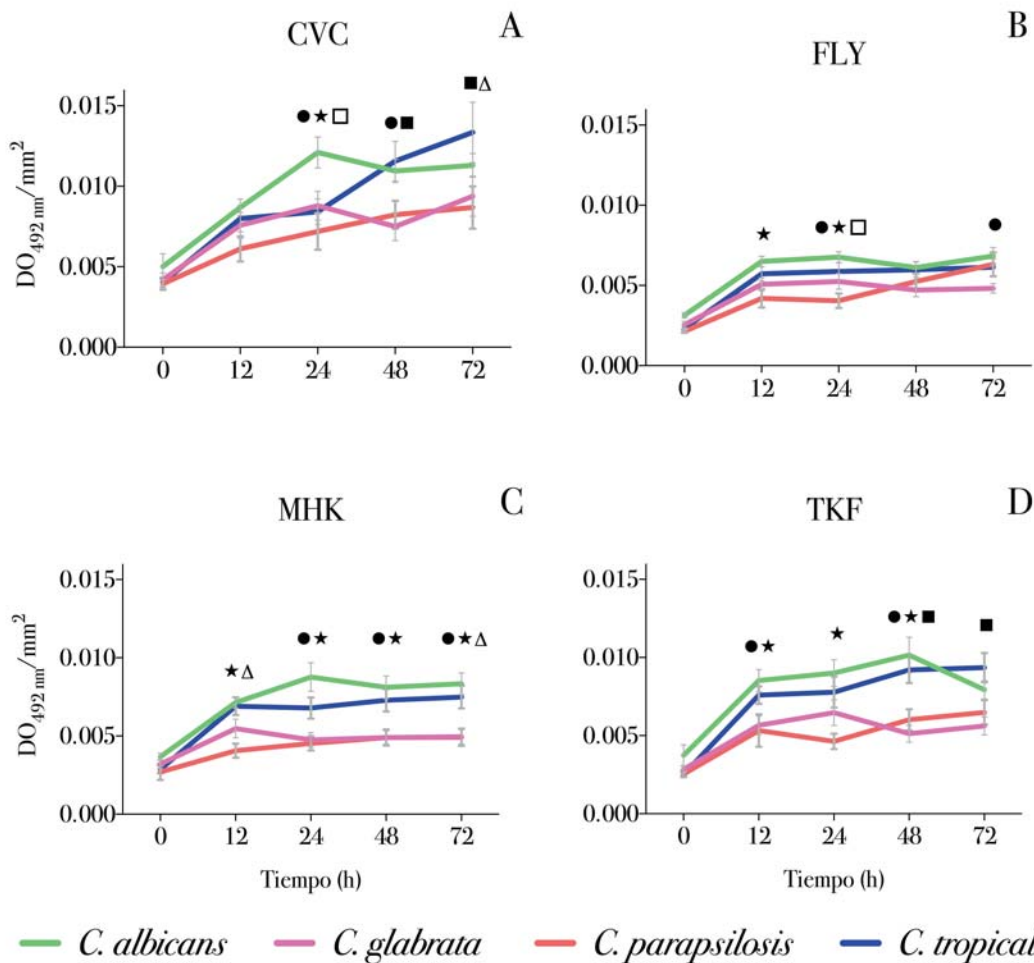


Figura 44. Gráficas de crecimiento comparativo entre especies y las superficies probadas. A) CVC; B) FLY; C) MHK; D) TKF. Los símbolos indican diferencia estadística entre grupos ($p < 0.05$); *C. albicans* vs *C. glabrata* (□), *C. albicans* vs *C. parapsilosis* (★), *C. albicans* vs *C. tropicalis* (□), *C. tropicalis* vs *C. glabrata* (■), *C. tropicalis* vs *C. parapsilosis* (Δ).

7.3.2 Morfología de las biopelículas formadas por *Candida* spp.

Las biopelículas observadas por microscopía de fluorescencia (MF) se muestran en la Figura 45 y Figura 46. De la Figura 47 a Figura 50 por MEB. En la etapa inicial con MF, *C. albicans* presentó abundantes tubos germinativos y durante el desarrollo de la misma se evidenciaron otras estructuras fúngicas como hifas (T12) y pseudohifas (T24) y abundantes blastoconidios en todo el proceso. Estos hallazgos se repitieron en las diferentes superficies. Por otro lado, en las etapas primarias de crecimiento de *C. tropicalis* sobre todas las superficies se observaron escasas estructuras fúngicas, principalmente pseudohifas e hifas, las cuales proliferaron hasta obtener una masa altamente densa; en la etapa de maduración se apreciaron blastoconidios terminales. Esta especie mostró un crecimiento constante a través del tiempo.

Candida albicans

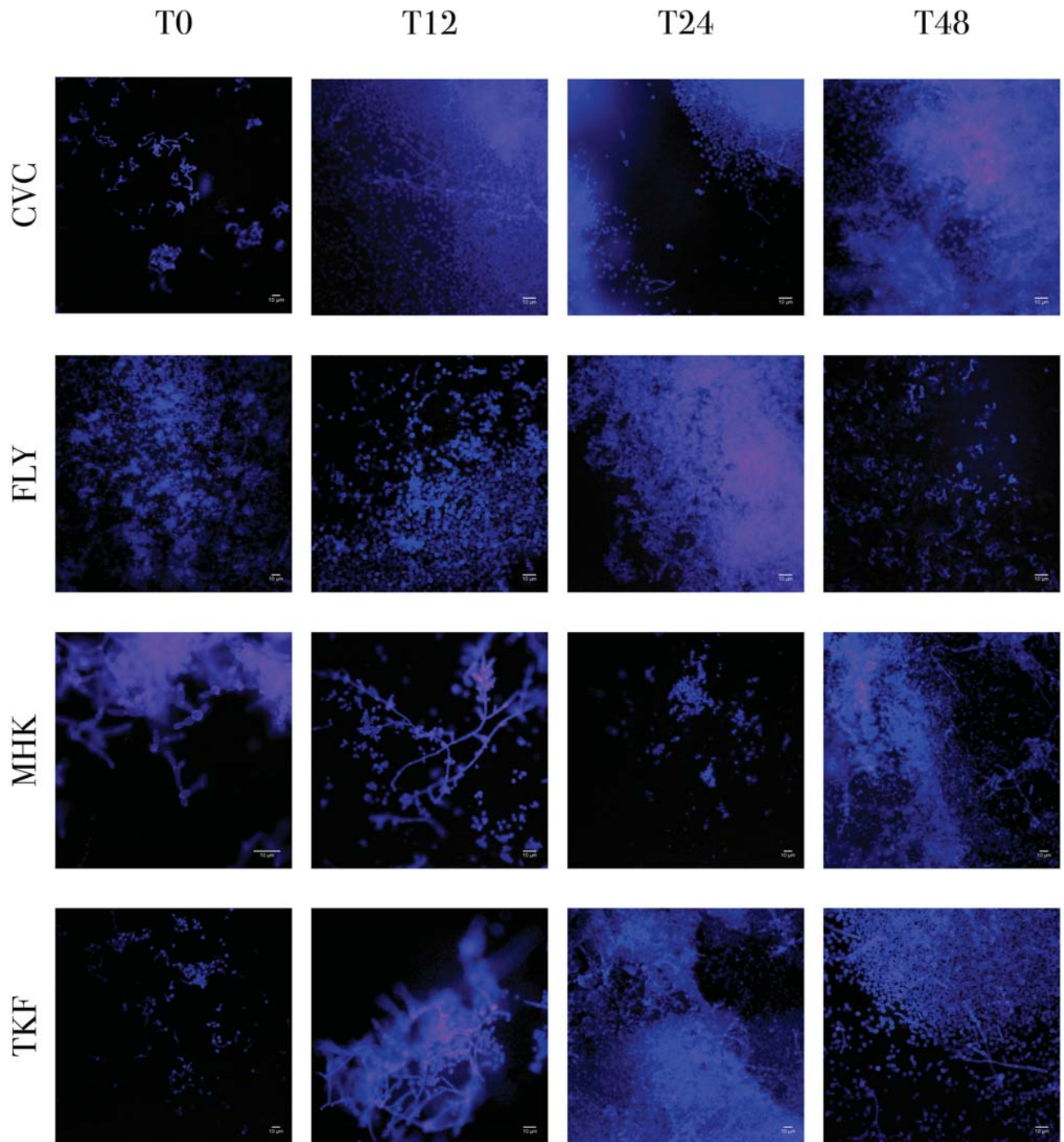


Figura 45. Biopelículas formadas por *C. albicans* desarrolladas sobre cuatro superficies a distintos tiempos (90 min (T0), 12 (T12), 24 (T24), 48 h (T48)), observadas por microscopía de fluorescencia con blanco de calcoflúor .

Candida tropicalis

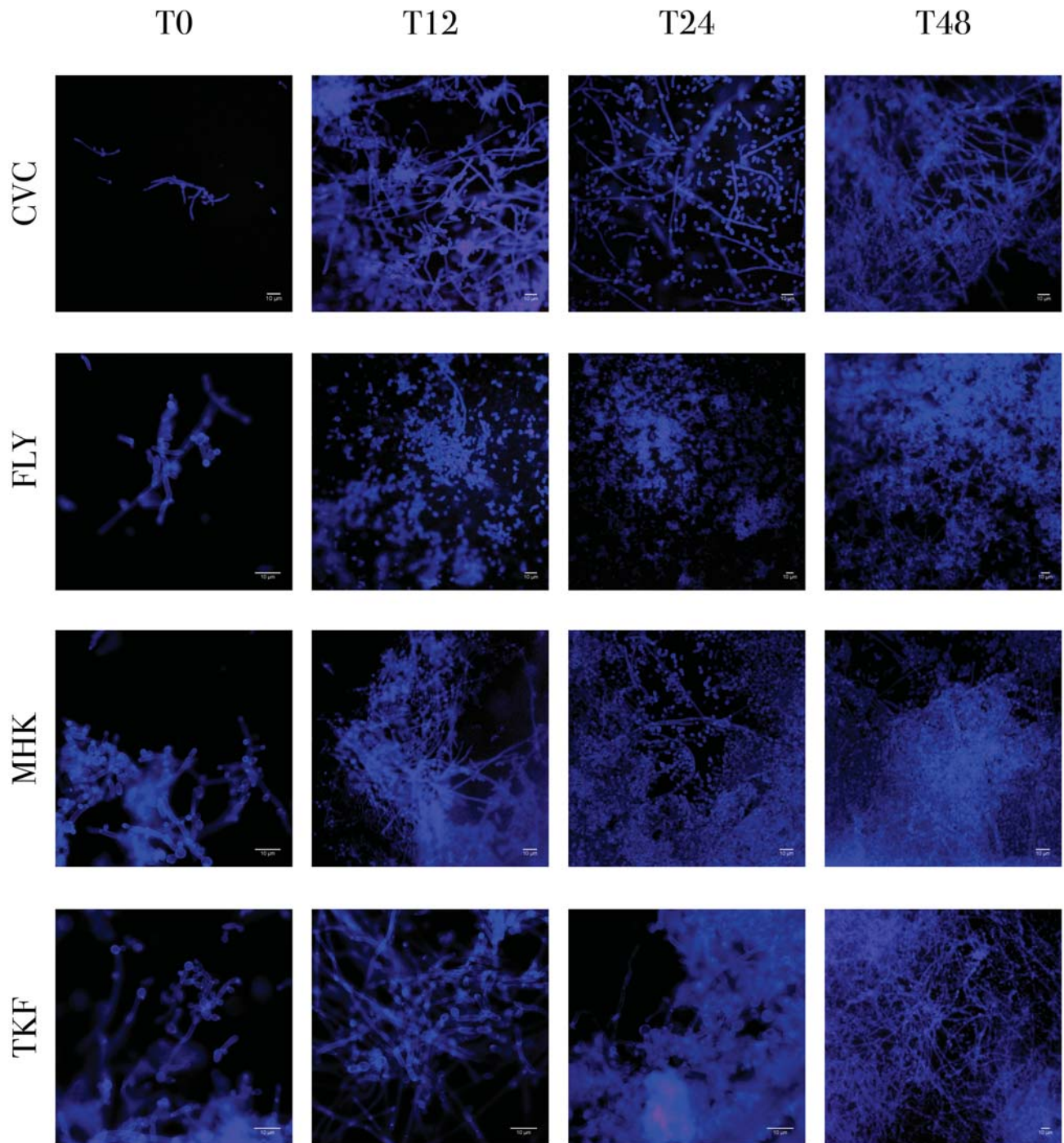


Figura 46. Biopelículas formadas por *C. tropicalis* desarrolladas sobre cuatro superficies a distintos tiempos 90 min (T0), 12 (T12), 24 (T24), 48 h (T48)), observadas por microscopía de fluorescencia con blanco de calcoflúor.

La estructura de la biopelícula fue afectada por diversos factores como la especie que la forma y la superficie donde se desarrolla. En la Figura 47 se muestran imágenes de MEB de las biopelículas formadas por *C. albicans* (A) y *C. tropicalis* (B) en FLY (1), MHK (2) y TKF (3); en las cuales podemos observar que *C. tropicalis* presentó una biopelícula formada con abundantes blastoconidios y algunas hifas. *Candida albicans* desarrolló biopelículas constituidas principalmente por hifas. También destaca la densidad de la biopelícula de *C. albicans* en FLY (A1) en comparación con *C. tropicalis* (B1) en la misma superficie; y de manera contraria, *C. tropicalis* desarrolló una mayor densidad fúngica sobre TKF (B3) que *C. albicans* (A3).

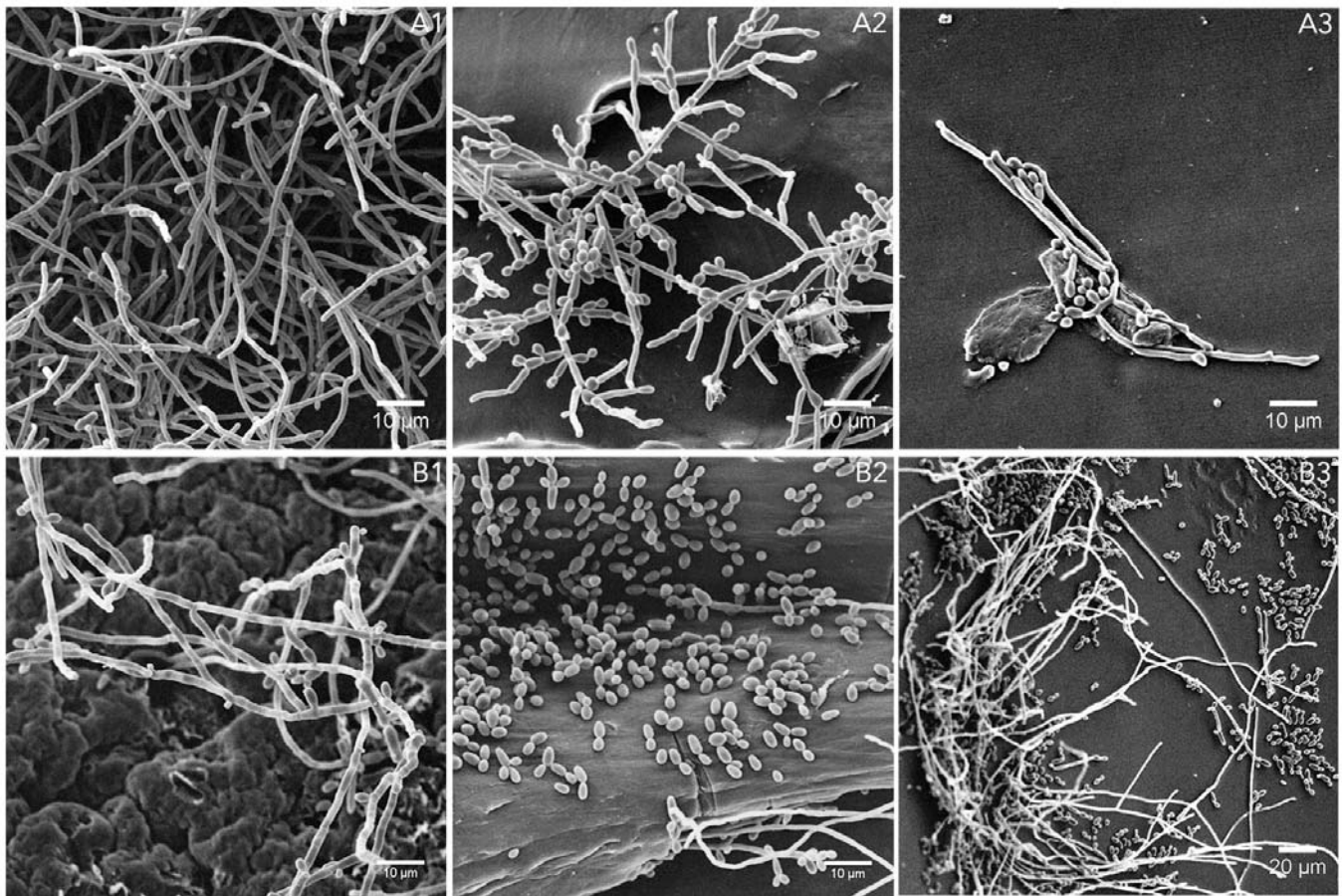


Figura 47. Imágenes obtenidas por MEB de la biopelícula formada por *C. albicans* (A) y *C. tropicalis* (B). En A1 abundantes hifas sobre FLY; A2 pseudohifas sobre MHK y A3, escasas hifas y blastoconidios sobre TKF. En B1 hifas sobre FLY, en B2 blastoconidios y escasas hifas sobre MHK y B3 abundantes hifas y blastoconidios sobre TKF.

En la Figura 48 se observa la biopelícula formada por *C. albicans* sobre FLY a las 24 h, en A caracterizada por una masas fúngicas adheridas a la superficie del catéter y en un acercamiento se ve abundante producción de hifas (B), con presencia de blastoconidios terminales (C).

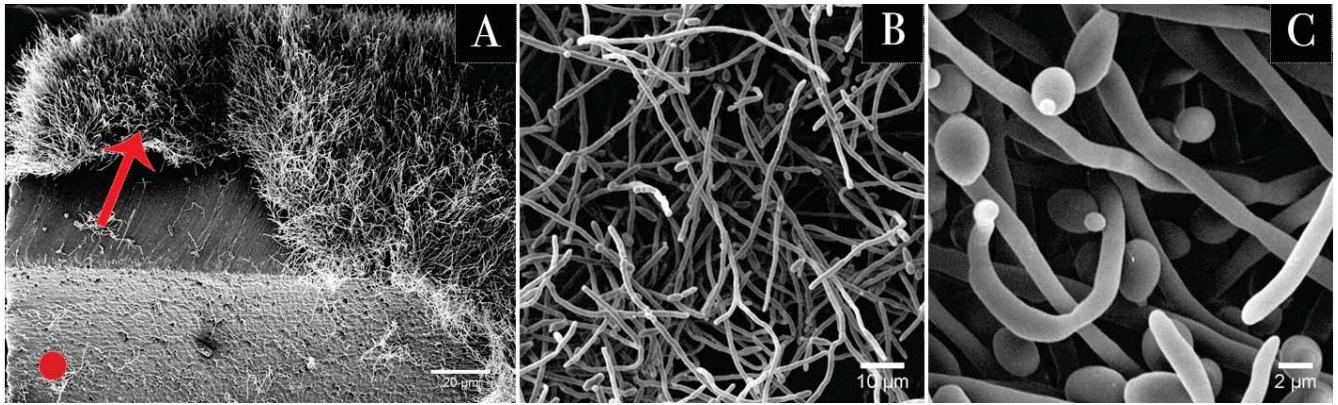


Figura 48. Biopelícula desarrollada por *C. albicans*. (A) imagen panorámica de la biopelícula (↑), catéter tipo Foley (•); (B) red de hifas; (C) acercamiento de hifas y blastoconidios terminales.

La biopelícula madura de *C. albicans* se observó a las 48 h en CVC (Figura 49) y FLY (Figura 50); la biopelícula en CVC mostró un crecimiento homogéneo sobre una porción del catéter y con abundantes hifas aéreas, fue evidente la presencia de blastoconidios, pseudohifas e hifas empezando a colonizar nuevas zonas del catéter. La biopelícula desarrollada en FLY presenta un crecimiento más heterogéneo y con una distribución en la totalidad del catéter, en B se puede apreciar hifas cercanas a la superficie con presencia de algunos blastoconidios .

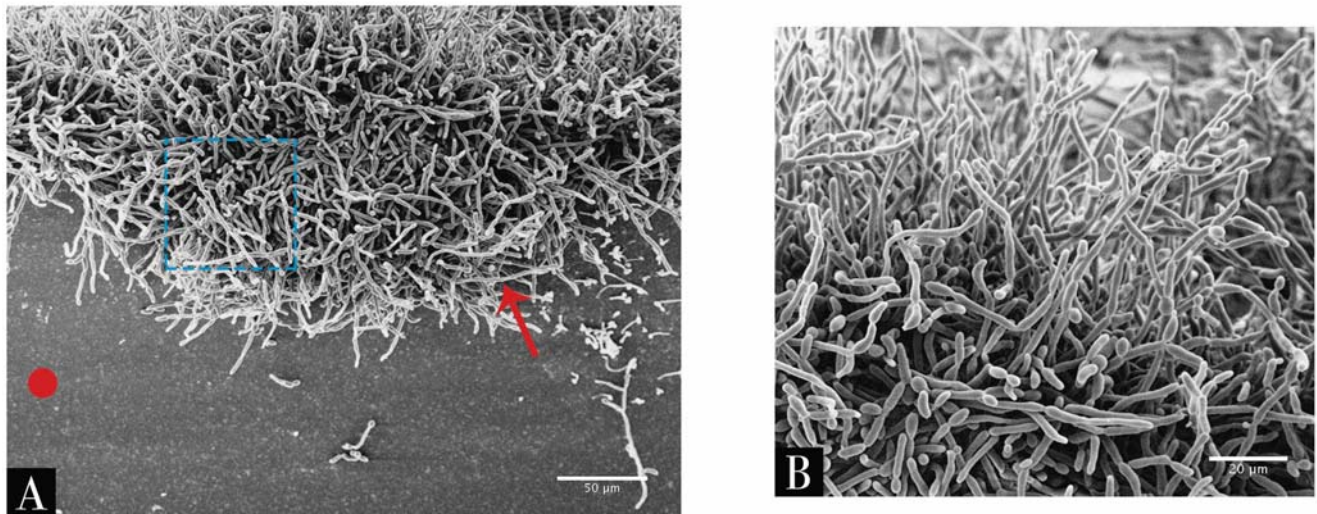


Figura 49. En A) Biopelícula madura (T48) de *C. albicans* (↑) formada sobre CVC (•) recuadro acercamiento que se muestra en B) abundantes hifas aéreas.

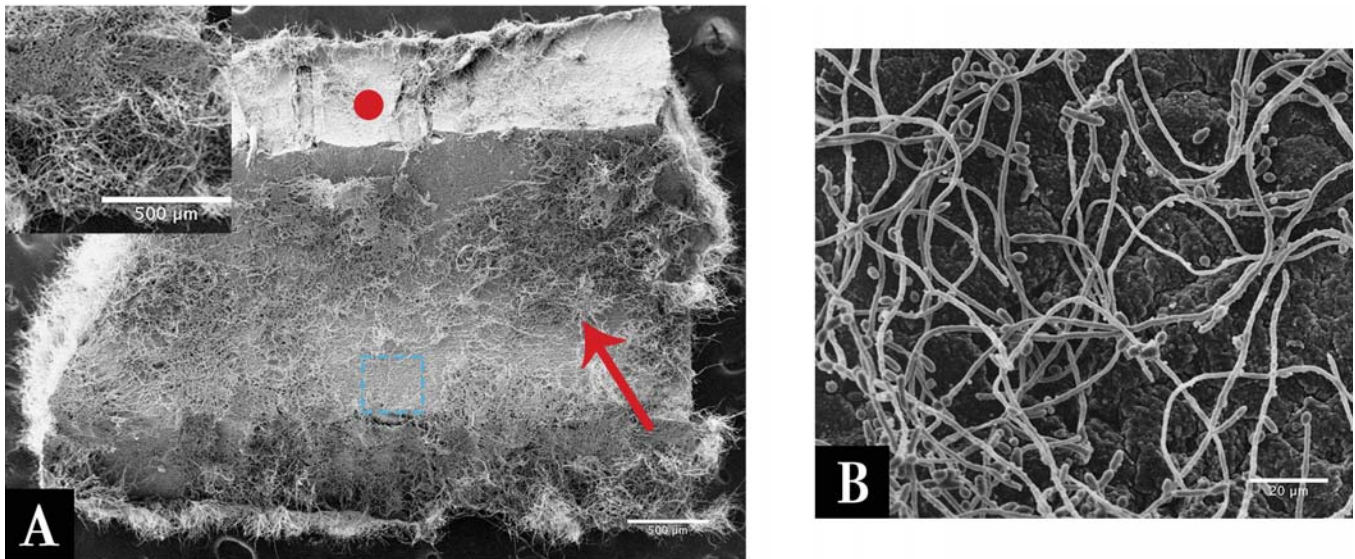


Figura 50. En A) Biopelícula madura (T48) de *C. albicans* (↑) formada sobre FLY (•), imagen lado izquierdo superior acercamiento de la red de hifas, en recuadro azul acercamiento de (B) hifas alargadas formando red, escasos blastoconidios.

7.3.3 Clasificación de los aislados por la cantidad de biopelícula desarrollada

Los aislados se clasificaron por su capacidad de producir biopelícula bajo los dos criterios establecidos previamente. Al analizar los resultados bajo el primer criterio de clasificación (NFB < 0.05, BFB 0.051 - 0.25 y AFB > 0.25) se encontró que de los 48 aislados y 5 cepas de referencia, el 83.5% de éstos se comportó como BFB a las 48 h y el 21% fueron AFB, a las 72 h; la superficie FLY fue la que presentó el mayor porcentaje de aislados AFB (24.5%), mientras que sobre MHK el menor número de aislados fueron AFB (18.8%). A las 72 h el 30% de los aislados de *C. albicans* se clasificaron como AFB en las cuatro superficies, por el contrario el 10% de los aislados de *C. glabrata* fueron AFB en CVC y en TKF. El 40% de los aislados de *C. parapsilosis* se clasificó como AFB en FLY; finalmente, el 33.3% de los aislados de *C. tropicalis* fueron AFB en CVC, FLY y MHK, y el 44% en TKF.

En el segundo criterio de clasificación, los puntos de corte se calcularon bajo la siguiente premisa: no formadores (NF), $OD \leq OD_c$; débil formador (DF), $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$; moderado formador (MF), $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$; y fuerte formador (FF), $4 \times OD_c < OD$ de biopelícula (Cuadro 22). Los valores OD_c se calculó tres veces la desviación estándar sobre la media de los valores obtenidos del control negativo en cada repetición.

Cuadro 22. Criterios establecidos con los valores de DO obtenidos, con base en la capacidad de formación de biopelícula:

Clasificación	Valores DO₄₉₂
NF	<0.08
DF	0.081 – 0.162
MF	0.163 – 0.320
FF	>0.320

En general el 6.6% de los aislados se comportó como FF. En la Figura 51 se muestra la gráfica según esta clasificación, en cada una de las superficies probadas durante todo el desarrollo de la biopelícula. Es importante destacar que los aislados de *C. albicans* y *C. tropicalis* se clasificaron como MF y FF, en comparación con *C. glabrata* y *C. parapsilosis* que fueron DF y MF.

De manera general, 5 aislados fueron los que presentaron la mayor formación de biopelícula (0.4 – 0.56 DO_{492nm}) a las 72 h, de los cuales podemos destacar al aislado 12420 de *C. albicans*; este aislado mostró alta formación de biopelícula sobre dos tipos de superficies (FLY y MHK); el cual fue recuperado de sangre y el paciente presentaba varios factores asociados como la colocación de diversos catéteres como cánula, CVC y FLY; además de septicemia bacteriana, neumonía y finalmente falleció. En este mismo grupo, tres aislados de *C. tropicalis* presentaron alta formación de biopelícula sobre CVC, dos de estos aislados (16926 y 21466) provenían de un mismo paciente y obtenidos de sangre y de catéter venoso central, el paciente falleció.

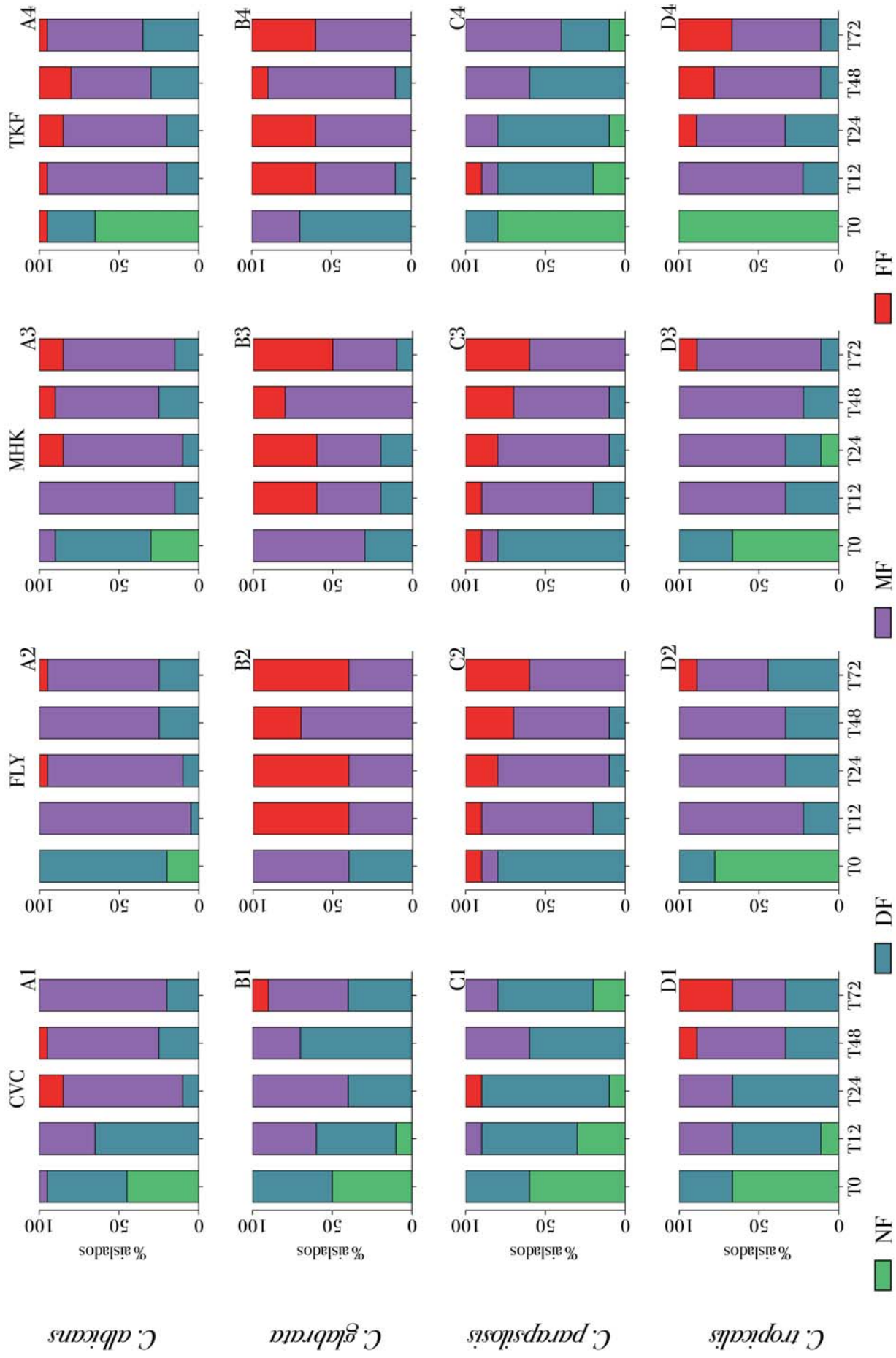


Figura 51. Clasificación de los aislados de *Candida* spp. bajo los puntos de corte establecidos, para los 5 tiempos estudiados. (NF: Nulos formadores de biopelículas; DF: débil formador de biopelícula; MF: moderado formador de biopelícula; AF: alto formador de biopelícula).

7.4 Pruebas de sensibilidad antifúngica en las biopelículas formadas por *Candida* spp.

La sensibilidad antifúngica a anfotericina B (AMB), caspofungina (CSF) y posaconazol (PSZ) sobre las biopelículas formadas por *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* en las cuatro superficies probadas fue determinada por microdilución en caldo. Los aislados de *C. albicans* mostraron los valores más altos de la concentración mínima inhibitoria a 50% (CMI₅₀) de reducción en el crecimiento de la biopelícula en FLY frente a AMB ($7.2 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$), mientras que *C. glabrata* los menores valores de CMI sobre la biopelícula desarrollada en MHK ($0.05 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$). Por otro lado, el PSZ fue el antifúngico que presentó la menor actividad sobre las biopelículas de *C. albicans* y *C. tropicalis* en CVC, FLY y MHK (Cuadro 23).

Cuadro 23. Valores de CMI₅₀ obtenidos para las biopelículas formadas por cada una de las especies en las superficies probadas.

CVC	AMB [$\mu\text{g/mL}$]	CSF [$\mu\text{g/mL}$]	PSZ [$\mu\text{g/mL}$]
<i>C. albicans</i>	2.3 ± 1.2	1.4 ± 1.3	5.3 ± 3.3
<i>C. glabrata</i>	3.0 ± 2.6	0.14 ± 0.03	0.5 ± 0.2
<i>C. tropicalis</i>	2.7 ± 1.6	0.7 ± 0.01	8 ± 3.5
FLY			
<i>C. albicans</i>	7.2 ± 2.9	4.0 ± 2.7	8.6 ± 2.6
<i>C. glabrata</i>	0.11 ± 0.03	0.34 ± 0.07	1.3 ± 1.3
<i>C. tropicalis</i>	2.0 ± 1.4	0.2 ± 0.07	6.0 ± 3.2
MHK			
<i>C. albicans</i>	1.08 ± 0.6	2.8 ± 2.6	10.7 ± 3.3
<i>C. glabrata</i>	0.05 ± 0.01	0.1 ± 0.07	0.1 ± 0.09
<i>C. tropicalis</i>	0.4 ± 0.3	0.9 ± 0.7	2.6 ± 2.6
TKF			
<i>C. albicans</i>	2.7 ± 2.6	0.1 ± 0.07	0.05 ± 0.01
<i>C. glabrata</i>	0.1 ± 0.07	0.07 ± 0.04	0.04 ± 0.01
<i>C. tropicalis</i>	0.09 ± 0.03	1.5 ± 1.2	3.3 ± 2.6

En la Figura 52 se muestran las gráficas de la actividad antifúngica sobre las biopelículas desarrolladas, destacando que *C. albicans* y *C. tropicalis* fueron las especies que mostraron mayor resistencia a AMB sobre CVC, FLY y TKF y las de *C. tropicalis* frente a este mismo antifúngico en CVC y FLY. Todos los antifúngicos

presentaron buena actividad frente a las biopelículas de *C. glabrata*, con excepción de AMB en CVC y PSZ en FLY.

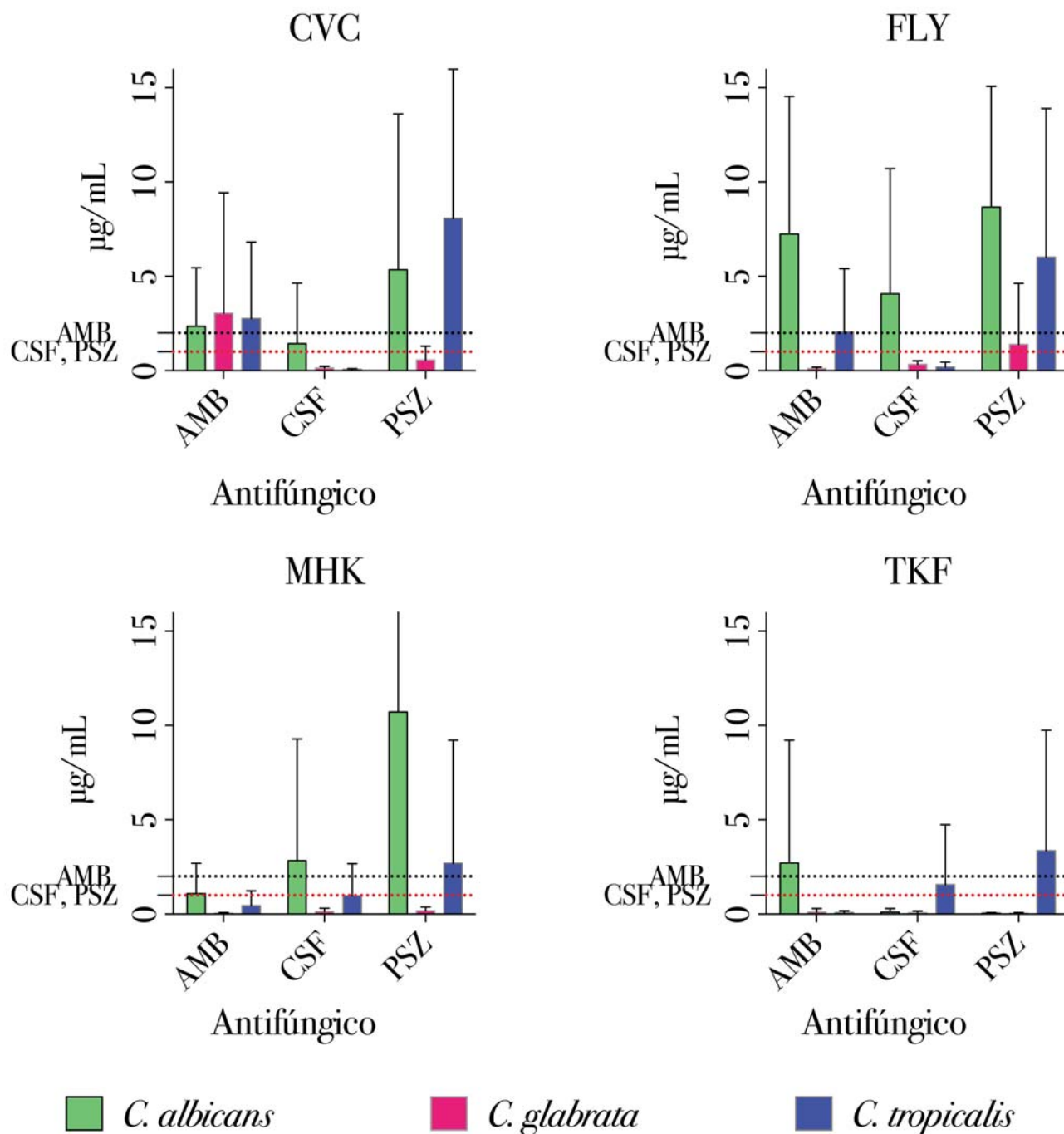


Figura 52. CMI₅₀ de las biopelículas desarrolladas por *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* en CVC; FLY, MHK y TKF. Puntos de corte están marcados para AMB de 2 µg/mL (línea negra), CSF y PSZ de 1 µg/mL (línea roja).

Por otro lado, la evaluación del daño fúngico ocasionado por los antifúngicos sobre las biopelículas se muestra en la Figura 53. Las biopelículas formadas por *C. glabrata* presentaron un daño fúngico mayor a concentraciones menores a 1 µg/mL frente a CSF y PSZ, por otro lado, las biopelículas de *C. albicans* formadas sobre CVC requieren concentraciones mayores del antifúngico para ocasionar un daño mayor al 50% (CSF (4 – 16 µg/mL)), mientras que frente a PSZ la misma concentración ocasionó un daño entre el 30 y el 50%. Los antifúngicos probados sobre las biopelículas de *C. tropicalis* causaron un daño fúngico mayor al 50% a concentraciones menores de 1 µg/mL, exceptuando PSZ en CVC y CSF en TKF (8 y 4 µg/mL, respectivamente).

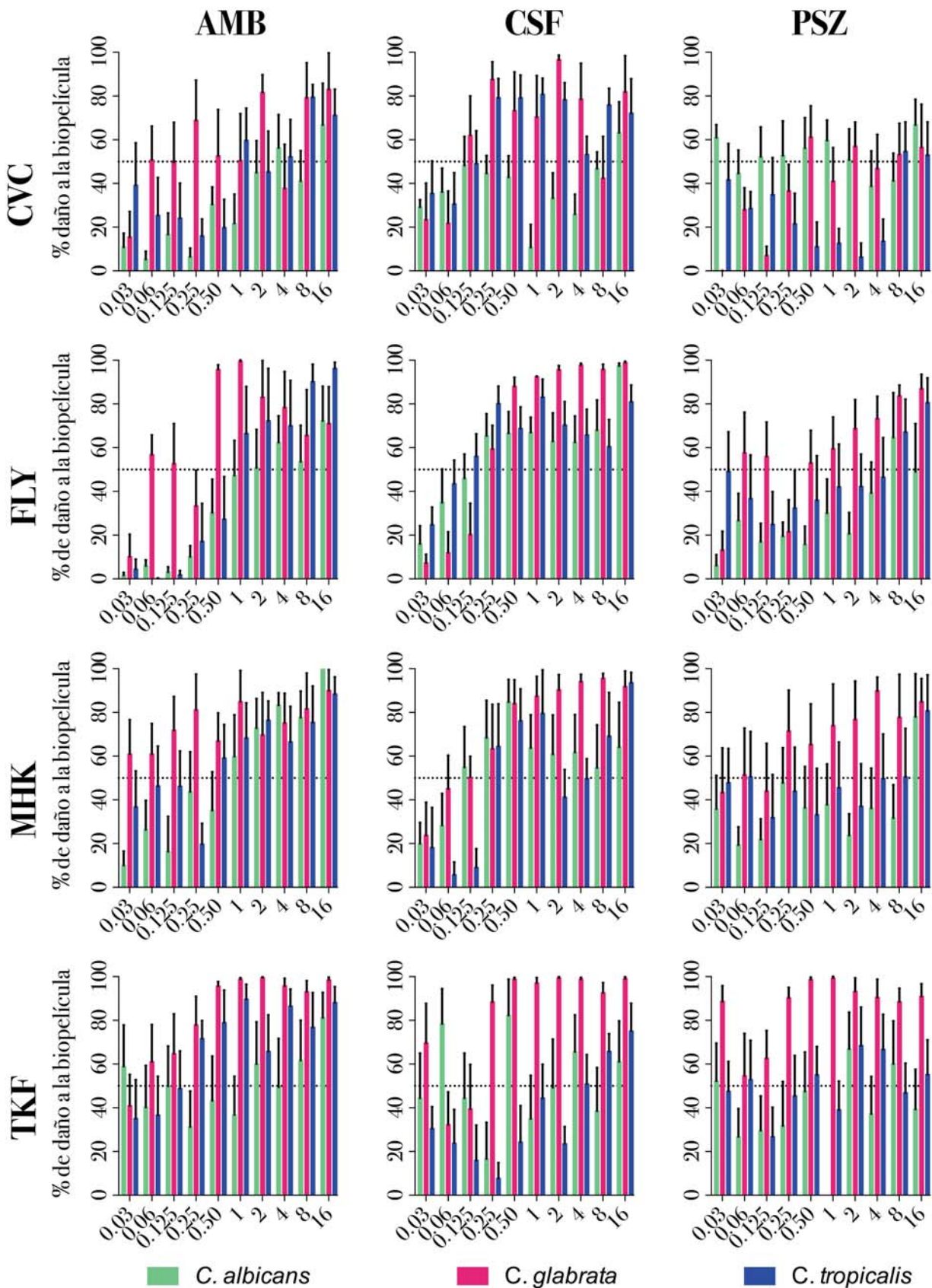


Figura 53. Daño fúngico ocasionado por AMB, CSF, PSZ sobre las biopelículas formadas por *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* en las diferentes superficies (CVC, FLY, MHK, TKF).

8. DISCUSIÓN

El estudio de las biopelículas formadas por hongos es un fenómeno que en los últimos 10 años ha despertado gran interés en la medicina para explicar la habilidad de estos organismos para colonizar el epitelio y superficies abióticas como los dispositivos médicos. A nivel mundial se calcula que cerca de 1×10^9 individuos padecen alguna infección por hongos, de los cuales 25 millones están en riesgo de morir como consecuencia de infecciones por *Candida* spp., de éstas las fungemias son las más comunes (Cornely *et al.* 2017) (Pfaller *et al.* 2012). En EUA *Candida* spp. son de los agentes infecciosos más importantes causantes de micosis oportunistas con una incidencia anual de 72 casos/año y una mortalidad asociada del 33.9% (Pfaller y Diekema, 2010). En el presente estudio se observaron 68 casos/año y una mortalidad del 27.7%. La población principalmente afectada fue el género femenino (61%), con un promedio de edad de 62 años. En otros estudios similares, el 75% de los casos se han presentado en pacientes del género masculino con un rango de edad variable, en EUA de 50 a 70 años (40%) (Pfaller *et al.* 2014), y en la Cd. de México de 20 a 60 años (61%) (Gaona-Flores *et al.* 2016).

De acuerdo con diversos reportes, *C. albicans* es la especie que se sigue aislando con mayor frecuencia (40-70%) (Barchiesi *et al.* 2017) (Pfaller *et al.* 2012), aunque las especies del grupo no-*C. albicans* como *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* han emergido como un grupo predominante (Pfaller *et al.* 2014). En otros estudio realizados en algunos países de América, la frecuencia de estas especies fue similar (58 al 72%) (Gaona-Flores *et al.* 2016) (Pfaller *et al.* 2012) (Rodriguez *et al.* 2017). En el presente trabajo, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* se recuperaron en el 63.27% de los casos, el orden de frecuencia estuvo relacionado con los especímenes procesados y los factores de riesgo asociados, similar al reporte de otros autores (Cornistein *et al.* 2013).

La identificación de las especies de *Candida* es fundamental, con el uso de las técnicas moleculares que actualmente son consideradas herramientas indispensables para una correcta identificación, principalmente para la diferenciación de *C. dubliniensis* de *C. albicans* y de las especies que conforman el complejo *C. parapsilosis* (Mohammadi *et al.* 2017) (Tadec *et al.* 2016). Clark-Ordóñez y cols (Clark-Ordóñez *et al.* 2017) reportaron a *Candida dubliniensis* como agente causal en el 2% de las infecciones a nivel mundial; situación similar se ha presentado con *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*, las cuales se han reportado en México en el 1 y 8% de los casos, respectivamente (Treviño-Rangel *et al.* 2012). En el presente estudio después de someter los

aislados de *C. albicans* a las identificación molecular, ninguna correspondió a *C. dubliniensis* y los de *C. parapsilosis* todos fueron *C. parapsilosis* sensu stricto.

Un hallazgo de interés fue la obtención de la asociación de más de una especie en el 19% de los pacientes incluidos en este estudio; la más común fue *C. albicans* y *C. glabrata*. Esto ha sido descrito previamente por otros autores, quienes detectaron el 5.7 y 16% de asociaciones de dos especies (Clark-Ordóñez *et al.* 2017) (Pfaller *et al.* 2014). Aparentemente las infecciones por una sola especie de *Candida* fueron más severas que si se encontraban en asociación de dos especies, ya que causaron 7 y 3 fallecimientos, respectivamente. Algunos autores han realizado estudios de co-infección *in vitro* de *C. albicans* y *C. glabrata* obteniendo el mayor daño celular cuando se encuentran en asociación (Rossoni *et al.* 2015).

Para la colonización y desarrollo de las infecciones por *Candida* es fundamental que los pacientes presenten diversos factores de riesgo. Diferentes reportes a nivel mundial muestran que éstas infecciones están relacionadas con el tratamiento que reciben los pacientes hospitalizados, o con las complicaciones que llegan a presentar como la asociación de infecciones bacterianas y la exposición a diversos fármacos inmunosupresores y antimicrobianos de amplio espectro (Pfaller *et al.* 2014). En el estudio de Tavec y cols (Tavec *et al.* 2016) detectaron que el uso de CVC (75.9%) y la aplicación de antibióticos (73.3%) fueron los principales factores de riesgo, aunque la mayoría presentó la asociación de múltiples factores (86.2%). El grupo de pacientes incluido en el presente trabajo tuvieron diversos factores, similar a la descripción previa como el uso de catéteres, CVC (50%), FLY (47.2%) y la aplicación de terapia antimicrobiana (83.3%).

El uso de diversos dispositivos médicos en los pacientes es una práctica común, principalmente en los pacientes de las UCI's, estos son de gran utilidad para la administración de soluciones glucosadas, fisiológicas, antibióticos o para tratamientos como diálisis (Abebe *et al.* 2014). El incremento en el uso de estos dispositivos han tenido un efecto directo en las infecciones (Chandra *et al.* 2005), algunos autores los han considerado como la fuente de diseminación de las levaduras (Cornistein *et al.* 2013), debido a que los microorganismos utilizan estas superficies para el establecimiento de las biopelículas. La formación de estas estructuras es un proceso sumamente complejo e influyen gran número factores como son: ambientales, características de las superficies (la rugosidad y la energía de superficie) (Almaguer-Flores *et al.* 2012). Diversos estudios han relacionado estas características con la adhesión de los microorganismos (Jackson *et al.* 2014) (McCormick *et al.* 2005) (Almaguer-Flores *et al.* 2012). Los cuatro tipos de superficies de catéteres incluidos en el presente trabajo, mostraron diferentes grados de rugosidad, siendo FLY la que presentó el mayor grado de Ra y ES,

aunque la menor capacidad de adhesión, esto en proporción con la superficie real disponible y comparada con las otras superficies estudiadas. En el trabajo realizado por Rodríguez-Hernández y cols (Rodríguez-Hernández *et al.* 2011) relacionaron la adhesión de los microorganismos con el área real disponible; por otro lado, otros autores atribuyeron la adhesión de las leledaduras únicamente a la rugosidad de la superficie, ya que ésta característica le proporciona anclaje y nichos de protección a los microorganismos (Bürgers *et al.* 2010) (Dantas *et al.* 2016). En el presente trabajo la rugosidad no fue una variable determinante en la adhesión de las levaduras, ni en la formación de las biopelículas, ya que la superficie que presentó la mayor Ra no fue la que desarrolló la mayor formación de biopelícula. Por otra parte, algunos investigadores como Hawthorn L y Reid G (Hawthorn y Reid, 1990), Rodríguez-Hernández y cols (Rodríguez-Hernández *et al.* 2011) y Schmitt y cols (Schmitt *et al.* 1986) han relacionado la energía de superficie como un componente indispensable en la adhesión de las células, siendo las superficies con mayor ES las más favorables para la adhesión de los microorganismo (Bürgers *et al.* 2010) (Teughels *et al.* 2006). En el presente estudio se observó un comportamiento contrario, ya que en las superficies con menor ES se registró una mayor adhesión y también mayor formación de biopelícula. Posiblemente estas variaciones observadas estén relacionadas con múltiples factores como ES, topografía y la química del material.

El desarrollo de la biopelícula es uno de los muchos factores de virulencia que posee *Candida* spp. para la colonización e invasión de las superficies bióticas y abióticas, además de proporcionarle protección frente a un ambiente inhóspito (Alnuaimi *et al.* 2013). En los últimos años, las biopelículas de *C. albicans* son de los modelos más estudiados. En este estudio se realizó una comparación entre la cantidad de biopelícula desarrollada por seis especies de *Candida*, en cuatro tipos de superficies; los hallazgos obtenidos determinaron que todas las especies presentaron la capacidad de desarrollar una biopelícula, independientemente del tipo de superficie; pero las especies que mostraron la mayor capacidad fueron *C. albicans* seguida de *C. tropicalis*, datos que concuerdan con otros reportes (Guembe *et al.* 2017) (Kuhn *et al.* 2002). Por otro lado, en este trabajo especies como *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis* fueron las especies que mostraron la menor capacidad para formar biopelícula, lo cual concuerda con lo publicado por Guembe M y cols (Guembe *et al.* 2017), aunque Kuhn y cols (Kuhn *et al.* 2002) obtuvieron una buena formación de biopelícula por *C. glabrata*. La formación de biopelículas observada por microscopía de fluorescencia con blanco de calcoflúor y MEB, fue puesta en evidencia desde su etapa inicial; la microscopía de fluorescencia nos permitió observar tanto las estructuras fúngicas como la SPE, la cual se presentó como un aspecto nebuloso, como lo demostraron Chandra J y cols (Chandra *et al.* 2001a). Por otra parte, con MEB se obtuvieron imágenes de la morfología de la

biopelícula desde su etapa inicial. En *C. albicans* se evidenció el desarrollo de estas estructuras constituidas por hifas y blastoconidios terminales, así como la topografía de las superficies.

Las biopelículas son estructuras de resistencia, confiriéndole a los microorganismos una barrera de defensa contra el ambiente donde se desarrollan; es común que se formen sobre la superficie de los catéteres, lo que podría explicar la alta resistencia contra los antifúngicos. Diversos estudios han demostrado que las biopelículas de *Candida* son resistentes a diferentes antifúngicos utilizados en la clínica como anfotericina B y fluconazol. Kuhn y cols (Kuhn *et al.* 2002) demostraron que las biopelículas formadas por *C. albicans* presentaron resistencia a fluconazol a las 6 h de formación, en comparación con la fase planctónica la cual fue sensible a este fármaco. Existen reportes en los que se ha demostrado que antifúngicos diferentes a los azoles como la caspofungina, presentan una buena actividad contra las biopelículas *in vitro* (Al-Fattani y Douglas, 2004). En este estudio la prueba de sensibilidad a anfotericina B, posaconazol y caspofungina mostró que las biopelículas de *C. albicans* fueron las que presentaron los valores más altos de resistencia, principalmente desarrolladas sobre CVC, FLY y MHK. Katragkou A y cols (Katragkou *et al.* 2008) demostraron que las biopelículas de *C. albicans* requieren concentraciones de 64 µg/mL de PSZ para ocasionar el 50% de daño fúngico, similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo. Por otro lado, Choi HW y cols (Choi *et al.* 2007) publicaron que la AMB tiene actividad moderada (2 – 32 µg/mL) contra las biopelículas desarrolladas por *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, mientras que la CSF tuvo una buena actividad contra las biopelículas desarrolladas por *C. albicans* (0.06 - 0.5 µg/mL), *C. glabrata* (>1 µg/mL) y resistentes sobre *C. tropicalis* (>16 µg/mL). En este estudio las biopelículas formadas por *C. glabrata* mostraron una buena respuesta contra todos los antifúngicos y en tres de las superficies, mientras que en las biopelículas de *C. tropicalis* se detectó resistencia a PSZ en todas las superficies y la mejor actividad de AMB en MHK; y CSF en CVC, FLY y MHK, contrario al reporte de Al-fattani MA y cols (Al-Fattani y Douglas, 2006), quienes evidenciaron resistencia de esta especie frente a AMB.

Es evidente que las biopelículas desarrolladas por las especies de *Candida* sobre la superficie de diversos catéteres son un foco de infección persistente y generan resistencia frente a los antifúngicos, lo cual es un problema de salud que deberá ser tomado en cuenta en los pacientes hospitalizados que cursan con múltiples factores de riesgo, entre los que se encuentra la instalación de uno o más catéteres.

Para reducir las infecciones nosocomiales es fundamental detectar oportunamente las biopelículas, para ello se requiere de sistemas y protocolos estandarizados que puedan realizarse de manera rutinaria en los hospitales. Se requiere la obtención de datos comparables del desarrollo de las biopelículas sobre distintos tipos de

superficie y su perfil de sensibilidad antifúngica para establecer guías terapéuticas y manejo de este tipo de pacientes.

9. CONCLUSIONES

Todos los aislados clínicos mostraron la capacidad para desarrollar biopelículas sobre los cuatro tipos de catéteres probados. *Candida albicans* y *C. tropicalis* fueron las dos especies que mostraron una fuerte formación de biopelícula en CVC, uno de los catéteres más usados en los pacientes atendidos en los hospitales generales. El 10% de los aislados presentaron una fuerte formación de biopelícula.

El catéter FLY fue la superficie con la mayor rugosidad y la menor formación de biopelícula. La energía de superficie fue la característica que influyó en el desarrollo de la biopelícula, las superficies con valores menores fueron las que promovieron la mayor adhesión de las levaduras, siendo el componente disperso el que mostró un patrón en este fenómeno.

El catéter venoso central fue la superficie que favoreció la mayor formación de biopelículas por las seis especies de *Candida*, siendo *C. albicans* la que presentó mayor formación de biopelícula madura a las 24 h y posterior decremento; la biopelícula de *C. tropicalis* mostró un desarrollo lento y sostenido hasta las 72 h.

101

La resistencia de las biopelículas a los antifúngicos va a depender de la especie y de la superficie en donde se desarrolle. Las biopelículas de *C. albicans* y *C. tropicalis* formadas sobre CVC y FLY presentaron resistencia frente a AMB y PSZ. Los tres antifúngicos probados mostraron buena actividad contra las biopelículas de *C. glabrata*, excepto AMB en CVC.

Candida albicans fue la principal especie que se identificó en el 40.81% de los aislados, seguido por *C. glabrata* (18.36%) y *C. parapsilosis* (18.36%).

10. LITERATURA CITADA

Abebe A, Tener M, Waller S, Wissam el A. 2014. Catheter-related bloodstream infections review. *Hosp Med Clin.* 3:e32–e49.

Abed E, Ibensouda SK, Latrache H, Hamadi F. 2012. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Environmental SEM: Suitable Tools for Study of Adhesion Stage and Biofilm Formation. In: V. Kazmiruk, ed. *Scanning Electron Microscopy*. p. 717–730.

Ahmad S, Khan Z, Asadzadeh M, Theyyathel A, Chandy R. 2012. Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *BMC Infect Dis.* 25:230, doi:10.1186/1471-2334-12-230.

Akers K, Cordile A, Wenke J, Murray C. 2015. Biofilm formation by clinical isolates and its relevance to clinical infections. In: G. Donelli, ed. *Biofilm-based healthcare-associated infection*. New York: Springer. p. 1–28.

Al-Fattani MA, Douglas LJ. 2004. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:3291–7.

Al-Fattani MA, Douglas LJ. 2006. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* 55:999–1008.

Alam MZ, Alam Q, Jiman-Fatani A, Kamal MA, Abuzenadah AM, Chaudhary AG, Akram M, Haque A. 2014. *Candida* identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. *World J Microbiol Biotechnol.* 30:1437–1451, doi:10.1007/s11274-013-1574-z.

Alangaden GJ. 2011. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. *Infect Dis Clin North Am.* 25:201–25, doi:10.1016/j.idc.2010.11.003.

Albataineh MT, Sutton DA, Fothergill AW, Wiederhold NP. 2016. Update from the laboratory: clinical identification and susceptibility testing of fungi and trends in antifungal resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 30:13–35, doi:10.1016/j.idc.2015.10.014.

Albuquerque P, Casadevall A. 2012. Quorum sensing in fungi – a review. *Med Mycol.* 50:337–45, doi:10.3109/13693786.2011.652201.

Allegranzi B, Nejad SB, Combescure C, Graafmans W, Attar H, Donaldson L, Pittet D. 2011. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: Systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 15:377:228–41, doi:10.1016/S0140-6736(10)61458-4.

Almaguer-Flores A, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Ximénez-Fyvie L, Schwartz Z, Boyan B. 2012. Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces *in vitro*. *Clin Oral Implants Res.* 23:301–7, doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02184.x.

Alnuaimi AD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, McCullough MJ. 2013. Clinical isolates and laboratory reference *Candida* species and strains have varying abilities to form biofilms. *FEMS Yeast Res.* 13:689–99, doi:10.1111/1567-1364.12068.

Araújo D, Henriques M, Silva S. 2017. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes. Trends Microbiol. 25:62–75, doi:10.1016/j.tim.2016.09.004.

Bachmann SP, VandeWalle K, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR, López-Ribot JL. 2002. *In vitro* activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 46:3591–6.

Baghdadi E, Khodavaisy S, Rezaie S, Abolghasem S, Kiasat N, Salehi Z, Sharifynia S, Aala F. 2016. Antifungal susceptibility patterns of *Candida* species recovered from endotracheal tube in an intensive care unit. Adv Med. 2016:9242031, doi:10.1155/2016/9242031.

Baillie GS, Douglas LJ. 1999. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. Methods Enzym. 310:644–56.

Barchiesi F, Orsetti E, Mazzanti S, Trave F, Salvi A, Nitti C, Manso E. 2017. Candidemia in the elderly : What does it change? PLoS One. 11:e0176576, doi:10.1371/journal.pone.0176576.

Barnett JA. 2000. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. Yeast. 15:755–71.

Barraud N, Kjelleberg S, Rice SA. 2015. Dispersal from microbial biofilms. Microbiol Spectr. 3. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0015-2014.

Battin TJ, Sloan WT, Kjelleberg S, Daims H, Head IM, Curtis TP, Eberl L. 2007. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. Nat Rev Microbiol. 5:76–81.

Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Blevins JS, Smeltzer MS. 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. J Bacteriol. 186:4665–84.

Beheshti MV. 2011. A concise history of central venous access. Tech Vasc Interv Radiol. 14:184–5, doi:10.1053/j.tvir.2011.05.002.

Berdal JE, Haagenen R, Ranheim T, Bjørnholt JV. 2014. Nosocomial candidemia; risk factors and prognosis revisited; 11 years experience from a Norwegian secondary hospital. PLoS One. 31:e103916, doi:10.1371/journal.pone.0103916.

Berlanga M, Guerrero R. 2016. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. Microb Cell Fact. 15:165.

Bjarnsholt T. 2011. Biofilm infection. In: T. Bjarnsholt, C. Moser, Ø.P. Jensen, y N. Høiby, eds. Biofilm Infection. New York: Springer. p. 1–9.

Blankenship JR, Mitchell AP. 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr Opin Microbiol. 9:588–94.

Brandt ME, Lockhart SR. 2012. Recent taxonomic developments with *Candida* and other opportunistic yeasts. Curr Fungal Infect Rep. 6:170–177.

Bryers JD. 2008. Medical biofilms. Biotechnol Bioeng. 1:1–18, doi:10.1002/bit.21838.

Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. 2010. *In vivo* and *in vitro* biofilm formation on two different titanium implant surfaces. Clin Oral Implants Res. 21:156–164, doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01815.x.

Calderone R, Fonzi WA. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 9:327–35.

Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. 2013. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. Biomaterials. 34:8533–54, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.07.089.

Carruthers R. 1991. Catheters. UK: Palgrave Macmillan. p. 3-13.

Carter EJ, Pouch SM, Larson EL. 2014. Common infection control practices in the emergency department: a literature review. Am J Infect Control. 42:957–62, doi:10.1016/j.ajic.2014.01.026.

CDC. 2016. Urinary Tract Infection (Catheter-Associated Urinary Tract Infection [CAUTI] and Non-Catheter-Associated Urinary Tract Infection [UTI]) and Other Urinary System Infection [USI] Events. Atlanta, GA. p. 1-19.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. 2001a. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol. 183:5385–94.

Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. 2008. *In vitro* growth and analysis of *Candida* biofilms. Nat Protoc. 3:1909–24, doi:10.1038/nprot.2008.192.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA. 2001b. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. J Dent Res. 80:903–8.

Chandra J, Patel JD, Li J, Zhou G, Mukherjee PK, McCormick TS, Anderson JM, Ghannoum MA. 2005. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. Appl Env Microbiol. 71:8795–801.

Choi HW, Shin JH, Jung SI, Park KH, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. 2007. Species-specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. Antimicrob Agents Chemother. 51:1520–3.

Chowdhury N, Bagchi A. 2016. Molecular insight into the activity of LasR protein from *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of virulence gene expression by this organism. Gene. 10;580:80–7, doi:10.1016/j.gene.2015.12.067.

Clark-Ordóñez I, Callejas-Negrete OA, Aréchiga-Carvajal ET, Mouriño-Pérez RR. 2017. *Candida* species diversity and antifungal susceptibility patterns in oral samples of HIV/AIDS patients in Baja California, Mexico. Med Mycol. 55:285–294, doi:10.1093/mmy/myw069.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: 3rd informational supplement. (M27-S3). Wayne, PA: CLSI.

Colvin KM, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, Ryder C, Howell PL, Wozniak DJ, Parsek MR. 2012. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. Environ Microbiol. 14:1913–28, doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x.

Cornely OA, Gachot B, Akan H, Bassetti M, Uzun O, Kibbler C, Marchetti O, de Burghgraeve P, Ramadan S, Pylkkänen L, Ameye L, Paesmans M, Donnelly JP, EORTC Infectious Diseases Group. 2015. Epidemiology and outcome of fungemia in a cancer Cohort of the Infectious Diseases Group (IDG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC 65031). Clin Infect Dis. 1:324–31, doi:10.1016/S1001-0742(12)60252-6.

Cornely OA, Lass-Flörl C, Lagrou K, Arsic-Arsenijevic V, Hoenigl M. 2017. Improving outcome of fungal diseases - Guiding experts and patients towards excellence. *Mycoses*. 60:420–425, doi:10.1111/myc.12628.

Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli FJ, del Castillo M. 2013. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 31:380–4, doi:10.1016/j.eimc.2012.09.011.

Cortes-Gabaudan F, Ureña-Bracero J. 2011. Diccionario Medico-biologico, historico y etimológico.

Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. 1978. How bacteria stick. *Sci Am*. 238:86–95.

Costerton JW. 2007. *The Biofilm Primer*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. VIII. p.199.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 49:711–45.

Criseo G, Scordino F, Romeo O. 2015. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *J Microbiol Methods*. 111:50–56, doi:10.1016/j.mimet.2015.02.004.

Daef E, Moharram A, Eldin SS, Elsherbiny N, Mohammed M. 2014. Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. *Braz J Microbiol*. 45:255–62, doi:10.1590/S1517-83822014005000040.

Daniels KJ, Srikantha T, Lockhart SR, Pujol C, Soll DR. 2006. Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*. *EMBO J*. 25:2240–52.

Dantas LC, da Silva-Neto JP, Dantas TS, Naves LZ, das Neves FD, da Mota A. 2016. Bacterial adhesion and surface roughness for different clinical techniques for acrylic polymethyl methacrylate. *Int J Dent*. 2016:8685796, doi:10.1155/2016/8685796.

Davey ME, O'toole GA. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64:847–67.

de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng*. 43:1131–8.

Donlan RM. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 8:881–90.

Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 15:167–93.

Donné J, Dewilde S. 2015. The challenging world of biofilm physiology. *Adv Microb Physiol*. 67:235–92, doi:10.1016/bs.ampbs.2015.09.003

Duszyńska W, Rosenthal VD, Szczęsny A, Woźnica E, Ulfik K, Ostrowska E, Litwin A, Kübler A. 2016. Urinary tract infections in intensive care unit patients - a single-centre, 3-year observational study according to the INICC project. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 48:1–6, doi:10.5603/AIT.2016.0001.

Ellepola AN, Morrison CJ. 2005. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol*. 43:65–84.

Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, Micallef C. 2017. The changing epidemiology of invasive fungal infections. In: T. Lion, ed. *Human fungal pathogen identification*. Springer Protocols. p. 17–65.

Feneley RC, Hopley IB, Wells PN. 2015. Urinary catheters: history, current status, adverse events and research agenda. *J Med Eng Technol.* 39:459–70, doi:10.3109/03091902.2015.1085600.

Fernández-Barat L, Torres A. 2016. Biofilms in ventilator-associated pneumonia. *Future Microbiol.* 11:1599–1610.

Finkel JS, Mitchell AP. 2011. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 9:109–18, doi:10.1038/nrmicro2475.

Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, Butler G. 2006. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol.* 22:99.

Flemming HC. 2016. EPS—Then and Now. *Microorganisms.* 18.

Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *J Bacteriol.* 189:7945–7.

Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 13:34–40.

Gaona-Flores VA, Campos-Navarro LA, Cervantes-Tovar RM, Alcalá-Martínez E. 2016. The epidemiology of fungemia in an infectious diseases hospital in Mexico city: A 10-year retrospective review. *Med Mycol.* 54:600–4.

García P, Payá E, Olivares R, Cotera A, Rodríguez J, Sanz M. 2003. Diagnóstico de las infecciones asociadas a catéteres vasculares centrales Diagnosis of catheter related infection. *Rev Chil Infectol.* 20:41–50, doi:10.4067/S0716-10182003000100006.

Georgopapadakou NH. 1998. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol.* 1:547–57.

Channoum MA, Rice LB. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 12:501–17.

González GM, Elizondo M, Ayala J. 2008. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol.* 46:2902–5, doi:10.1128/JCM.00937-08.

Guembe M, Cruces R, Peláez T, Muñoz P, Bouza E, GEIDI study group. 2017. Assessment of biofilm production in *Candida* isolates according to species and origin of infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 35:37–40, doi:10.1016/j.eimc.2016.04.003.

Gupta S, Sharma AK, Jaiswal SK, Sharma VK. 2016. Prediction of biofilm inhibiting peptides: an *in silico* approach. *Front Microbiol.* 16:949, doi:10.3389/fmicb.2016.00949.

Hahnel S, Wieser A, Lang R, Rosentritt M. 2015. Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials. *Clin Oral Implant Res.* 26:1297–301, doi:10.1111/clr.12454.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2:95–108.

Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Høiby N, Moser C, Costerton JW, Møter A, Bjarnsholt T. 2012. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 65:127–45, doi:10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x.

Han SS, Yim JJ, Yoo CG, Kim YW, Han SK, Shim YS, Lee SM. 2010. Clinical characteristics and risk factors for nosocomial candidemia in medical intensive care units: experience in a single hospital in Korea for 6.6 years. *J Korean Med Sci.* 25:671–6, doi:10.3346/jkms.2010.25.5.671.

Hawser SP, Douglas LJ. 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect Immun.* 62:915–21.

Hawthorn L, Reid G. 1990. The effect of protein and urine on uropathogen adhesion to polymer substrata. *J Biomed Mater Res.* 24:1325–32.

Henrici AT. 1933. Studies of freshwater bacteria: I. A direct microscopic technique. *J Bacteriol.* 25:277–87.

Hermansson M. 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 14:105–119, doi:10.1016/S0927-7765(99)00029-6.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, *et al.* 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res.* 111:509–47.

Høiby N. 2014. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathog Dis.* 70:205–11, doi:10.1111/2049-632X.12165.

Hori K, Matsumoto S. 2010. Bacterial adhesion: from mechanism to control. *Biochem Eng J.* 48:424–434, doi:10.1016/j.bej.2009.11.014.

Hoyer LL, Cota E. 2016. *Candida albicans* Agglutinin-Like sequence (Als) family vignettes: a review of Als protein structure and function. *Front Microbiol.* 15:280, doi:10.3389/fmicb.2016.00280.

Huang FW, Abrahm JL. 2013. Indwelling access devices. In: R. Hoffman, E. Benz, L. Silberstein, H. Hesolp, H. Weitz, y J. Anastasi, eds. *Hematology: Basic principles and practice*. Philadelphia, PA: Elsevier. p. 1391–1404.

Hunter TB. 1995. Tubes, lines, catheters, and other interesting devices. *Curr Probl Diagn Radiol.* 24:54–108.

Jackson S, Coulthwaite L, Loewy Z, Scallan A, Verran J. 2014. Biofilm development by blastospores and hyphae of *Candida albicans* on abraded denture acrylic resin surfaces. *J Prosthet Dent.* 112:988–93, doi:10.1016/j.prosdent.2014.02.003.

Karátson A, Rácz L, Buzogány I. 1992. Catheter types and their abdominal implantation in peritoneal dialysis. *Int Urol Nephrol.* 24:327–33.

Katragkou A, Chatzimoschou A, Simitopoulou M, Dalakiouridou M, Diza-Mataftsi E, Tsantali C, Roilides E. 2008. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:357–60.

Kim T, Lee J, Kim KS. 2013. *Escherichia coli* YmdB regulates biofilm formation independently of its role as an RNase III modulator. *BMC Microbiol.* 24:266, doi:10.1186/1471-2180-13-266.

Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol.* 48:1511–24.

Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun.* 70:878–88.

Kumamoto CA, Vines MD. 2005a. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 59:113–33.

Kumamoto CA, Vines MD. 2005b. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol.* 7:1546–54.

Larone DH. 2011. Medically important fungi: a guide to identification. Washington DC: ASM press. p. 485.

Lattif AA, K. Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart SR, Diekema DJ, Pfaller MA, Ghannoum MA. 2010. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol.* 300:265–70, doi:10.1016/j.ijmm.2009.09.001.

Lewandowski Z, Beyena H. 2007. Fundamentals of biofilm research. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 480 .

Maksimova YG. 2014. Microbial biofilms in biotechnological processes. *Appl Biochem Microbiol.* 50:750–60, doi:10.1134/S0003683814080043.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 15:119–28, doi:10.4161/viru.22913.

McCarty S, Woods E, Percival SL. 2014. Biofilms: from concept to reality. In: S.L. Percival, D.W. Williams, J. Randle, y T. Cooper, eds. *Biofilms in infection prevention and control*. San Diego, USA: Elsevier Inc. p. 143–63.

McLean RJC, Lam JS, Graham LL. 2012. Training the Biofilm Generation—a tribute to J. W. Costerton. *J Bacteriol.* 194:6706–11, doi:10.1128/JB.01252-12.

Méndez-Tovar LJ, Mejía-Mercado JA, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Silva González I. 2016. Frecuencia de micosis invasivas en un hospital mexicano de alta especialidad. Experiencia de 21 años. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 54:581–7.

Mirhendi H, Bruun B, Schønheyder HC, Christensen JJ, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Johansen HK, Nielsen L, Knudsen JD, Arendrup MC. 2010. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. *J Medi Microbiol.* 59:414–20, doi:10.1099/jmm.0.017293-0.

Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. 2016. The Extracellular Matrix of Fungal Biofilm. *Adv Exp Med Biol.* 931:21–35, doi:10.1007/5584_2016_6.

Mohammadi A, Hashemi SM, Abtahi SH, Lajevardi SM, Kianipour S, Mohammadi R. 2017. An investigation on non-invasive fungal sinusitis; Molecular identification of etiologic agents. *J Res Med Sci.* 22:67, doi:10.4103/jrms.JRMS_166_17.

Mohammadi R, Mirhendi H, Rezaei-Matchkolaei A, Ghahri M, Shidfar MR, Jalalizand N, Makimura K. 2013. Molecular identification and distribution profile of *Candida* species isolated from Iranian patients. *Med Mycol.* 51:657–63, doi:10.3109/13693786.2013.770603.

Moran G, Coleman D, Sullivan D. 2012. An introduction to the medically important *Candida* species. In: R.A. Calderone, y C.J. Clancy, eds. *Candida* and candidiasis. Washington DC: ASM press. p. 11–25.

Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. 2005. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:3640–5.

Muadcheingka T, Tantivitayakul P. 2015. Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Arch Oral Biol.* 60:894–901, doi:10.1016/j.archoralbio.2015.03.002.

Nakazato G, Tsuchiya H, Sato M, M Y. 1989. *In vivo* plaque formation on implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 4:321–6.

Nazar JC. 2007. Biofilms bacterianos. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello.* 67:61–72, doi:10.4067/S0718-48162007000100011.

Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, VanHandel M, Andes D. 2007. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:510–20, doi:10.1128/AAC.01056-06.

Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. 1985. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother.* 27:619–24.

Nobile CJ, Nett JE, Andes DR, Mitchell AP. 2006. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell.* 5:1604–10.

Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. 2017. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol.* 15:96–108, doi:10.1038/nrmicro.2016.157.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, Guzman-Blanco M, Santolaya ME, Thompson L, Sifuentes-Osornio J, Echevarria JI, Colombo AL. 2013. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One.* 8:e59373, doi:10.1371/journal.pone.0059373.

Nweze EI, Ghannoum A, Chandra J, Ghannoum MA, Mukherjee PK. 2012. Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 67:149–53, doi:10.1093/jac/dkr429.

O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 54:49–79.

Osuna-Huerta A, Carrasco-Castellanos JA, Borbolla-Sala ME, Diaz-Gómez JM, Pacheco-Gil L. 2009. Factores que influyen en el desarrollo de infección relacionada a catéter venoso central y gérmenes relacionados Antonio. *Salud en Tabasco.* 15:871–77.

Pais P, Costa C, Cavalheiro M, Romão D, Teixeira MC. 2016. Transcriptional control of drug resistance, virulence and immune system evasion in pathogenic fungi: a cross-species comparison. *Front Cell Infect Microbiol.* 20:131.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. 2016. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*. 62:e1-50, doi:10.1093/cid/civ933.

Parsek MR, Fuqua C. 2004. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J Bacteriol*. 186:4427-40.

Percival SL, Suleman L, Donelli G. 2015. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol*. 64:323-34, doi:10.1099/jmm.0.000032.

Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, Franks B, Azie NE. 2014. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS One*. 3:e101510, doi:10.1371/journal.pone.0101510.

Pfaller MA, Diekema DJ. 2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. 36:1-53.

Pfaller MA, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. 2012. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 74:323-31, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.003.

Quindós G. 2014. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol*. 31:42-8, doi:10.1016/j.riam.2013.10.001.

Quirynen M, Bollen CM. 1995. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol*. 22:1-14.

Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. 2012. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol*. 2012:528521, doi:10.1155/2012/528521.

Ramage G, Robertson SN, Williams C. 2014. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 43:114-20, doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.10.023.

Ramage G, Williams C. 2013. The clinical importance of fungal biofilms. *Adv Appl Microbiol*. 84:27-83, doi:10.1016/B978-0-12-407673-0.00002-3.

Ramirez Barba EJ, Rosenthal VD, Higuera F, Oropeza MS, Hernández HT, López MS, Lona EL, Duarte P, Ruiz J, Hernandez RR, Chavez A, Cerrato IP, Ramirez GE, Safdar N. 2006. Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units in four Mexican public hospitals. *Am J Infect Control*. 34:244-7.

Reinhart AA, Oglesby-Sherrouse AG. 2016. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by distinct iron sources. *Genes (Basel)*. 14:E126.

Reséndiz-Sánchez J, Morales-Aguirre JJ. 2007. Factores asociados a mortalidad por fungemias causadas por *Candida* sp. en niños. *Biol Med Hosp Infant Mex*. 64:91-98.

Rodríguez-Hernández AG, Juárez A, Engel E, Gil FJ. 2011. *Streptococcus sanguinis* adhesion on titanium rough surfaces: effect of shot-blasting particles. *J Mater Sci Mater Med*. 22:1913-22, doi:10.1007/s10856-011-4366-8.

Rodríguez L, Bustamante B, Huaroto L, Agurto C, Illescas R, Ramirez R, Diaz A, Hidalgo J. 2017. A multi-centric Study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. *PLoS One*. 18:e0175172, doi:10.1371/journal.pone.0175172.

Rosenthal VD, Guzmán S, Crnich C. 2004. Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units of Argentina. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 25:251–5.

Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SF, dos Santos JD, de Barros PP, Prata MC, Anbinder AL, Fuchs BB, Jorge OA, Mylonakis E, Junqueira JC. 2015. Competitive interactions between *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* during biofilm formation and development of experimental candidiasis. *PLoS One.* 6:e0131700, doi:10.1371/journal.pone.0131700.

Salomao R, Rosenthal VD, Grimberg G, Nouer S, Blecher S, Buchner-Ferreira S, Vianna R, Maretti-da-Silva MA. 2008. Device-associated infection rates in intensive care units of Brazilian hospitals: findings of the international nosocomial infection control consortium. *Rev Panam Salud Publica.* 24:195–202.

Sampaio J, Machado D, Gomes AM, Machado I, Santos C, Lima N, Carvalho MJ, Cabrita A, Rodrigues A, Martins M. 2016. Deciphering the contribution of biofilm to the pathogenesis of peritoneal dialysis infections: characterization and microbial behaviour on dialysis fluids. *PLoS One.* 23:e0157870, doi:10.1371/journal.pone.0157870.

Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI. 1993. *Mechanisms of microbial disease.* Baltimore, Maryland USA: Williams & Wilkins. p. 68-69.

Schaller M, Bein M, Korting HC, Baur S, Hamm G, Monod M, Beinhauer S, Hube B. 2003. The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun.* 71:3227–34.

Schmitt D, Branyk D, Pequet A, Towne J. 1986. Bacterial adherence to vascular prostheses. A determinant of graft infectivity. *J Vasc Surg.* 3:732–40.

Schuur JD, Chambers JG, Hou PC. 2014. Urinary catheter use and appropriateness in U.S. emergency departments, 1995-2010. *Acad Emerg Med.* 21:292–300, doi:10.1111/acem.12334.

Secretaría de Salud. 2011. Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud. México, D. F. p.1-67.

Secretaría de Salud. 2012. NOM-022-SSA3-2012; Administración de la terapia de infusión en los Estados Unidos Mexicanos. México, D. F. p.1-11.

Sharma PK, Rao KH. 2002. Analysis of different approaches for evaluation of surface energy of microbial cells by contact angle goniometry. *Adv Colloid Interface Sci.* 5:341–463.

Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, Filler SG, Zhang M, Waring AJ, Edwards JE Jr. 2004. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 16:30480–9.

Singh AV, Vyas V, Patil R, Sharma V, Scopelliti PE, Bongiorno G, Podestà A, Lenardi C, Gade WN, Milani P. 2011. Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation. *PLoS One.* 6:e25029, doi:10.1371/journal.pone.0025029.

Soll DR, Daniels KJ. 2016. Plasticity of *Candida albicans* biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1:565–95, doi:10.1128/MMBR.00068-15.

Spellberg B, Marr KA, Filler SG. 2012. *Candida* and Candidiasis. In: R.A. Calderone, y C.J. Clancy, eds. *Candida* and Candidiasis. Washington DC: ASM press. p. 1–8.

Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science*. 5:1535–8, doi:10.1126/science.283.5407.1535.

Stacy A, McNally L, Darch SE, Brown SP, Whiteley M. 2016. The biogeography of polymicrobial infection. *Nat Rev Microbiol*. 14:93–105, doi:10.1038/nrmicro.2015.8.

Stamm WE, Norrby SR. 2001. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis*. 1:Suppl 1:S1–4.

Stepanović S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 40:175–9.

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes K A, Bennett DE, Coleman DC. 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*. 141:1507–21.

Sundstrom P. 1999. Adhesion in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2:353–7.

Tadec L, Talarmin JP, Gastinne T, Bretonnière C, Miegerville M, Pape P Le, Morio F. 2016. Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of candidemia at a single French hospital: a 7-year study. *Mycoses*. 59:296–303, doi:10.1111/myc.12470.

Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. 2013. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol*. 8:1325–37, doi:10.2217/fmb.13.101.

Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*. 43:284–92.

Teughels W, Assche N Van, Sliepen I, Quirynen M. 2006. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implant Res*. 17:68–81.

Tournu H, Dijk P Van. 2012. *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. *Int J Microbiol*. 2012:845352, doi:10.1155/2012/845352.

Tragiannidis A, Fegeler W, Rellensmann G, Debus V, Müller V, Hoernig-Franz I, Siam K, Pana ZD, Jürgens H, Groll AH. 2012. Candidaemia in a European Paediatric University Hospital: a 10-year observational study. *Clin Microbiol Infect*. 18:E27–30, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03720.x.

Treviño-Rangel R de J, Garza-González E, González JG, Bocanegra-García V, Llaca JM, González GM. 2012. Molecular characterization and antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis* species complex of clinical isolates from Monterrey, Mexico. *Med Mycol*. 50:781–4, doi:10.3109/13693786.2012.675526.

Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, de Gaetano Donati K, La Sorda M, Spanu T, Fadda G, Cauda R, Sanguinetti M. 2007. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol*. 45:1843–50.

Turner SA, Butler G. 2014. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2:a019778, doi:10.1101/cshperspect.a019778.

Wang DZ, Kong LF, Li YY, Xie ZX. 2016. Environmental microbial community proteomics: status, challenges and perspectives. *Int J Mol Sci*. 5:pii: E1275, doi:10.3390/ijms17081275.

Wang X, van de Veerdonk FL, Netea MG. 2016. Basic genetics and immunology of *Candida* infections. *Infect Dis Clin North Am.* 30:85–102, doi:10.1016/j.idc.2015.10.010.

Woo K, Rowe VL. 2014. Hemodialysis access : dialysis catheters. In: J.L. Cronenwett, y K.W. Johnston, eds. *Rutherford's vascular surgery*. Toronto, Ontario: Elsevier Inc. p. 1099–1108.e2.

Yang YL. 2003. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect.* 36:223–8.

Yoshida A, Ansai T, Takehara T, Kuramitsu HK. 2005. LuxS-based signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 71:2372–80.

Zakhour R, Chaftari A-M, Raad II. 2016. Catheter-related infections in patients with haematological malignancies: novel preventive and therapeutic strategies. *Lancet Infect Dis.* 16:e241–e250, doi:10.1016/S1473-3099(16)30213-4.

Zobell CE, Allen EC. 1935. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *J Bacteriol.* 29:239–251.

11. ANEXOS

11.1 Datos generales de pacientes

Cuadro 24. Datos demográficos y generales de los pacientes donde se obtuvieron los aislados de *Candida* spp. incluidos en este trabajo.

Paciente	Aislado	Identificación Tradicional	Identificación BM	Muestra	Factores de riesgo								
					Edad	Género	Diabetes	VIH/SIDA	Terapia AB	Insuf renal	Infección	Catéter instalado	Muerte
39	39	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	C-IL	61	M	DM2		✓	✓		CVC	
40	40	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	C-IL	96	F						CVC	
48	48	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	C-IL	68	M			✓	✓		CVC	
89	89	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	C-IL	71	F	DM2		✓	✓		CVC	
100	100	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	C-IL	50	F				✓		CVC	
CAT09	CAT09	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	C-IL	43	F	DM2		✓			FLY	
CAT11	CAT11	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	C-IL	0	M						CVC	
CAT14	CAT14	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	C-IL	76	F	DM2		✓	✓	P	TKF	
CAT15	CAT15M	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	C-IL	69	F	DM2		✓		S/IVU	FLY	✓
CAT15	CAT15V	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i>	C-IL	69	F	DM2		✓		S/IVU	FLY	✓
CAT18	CAT18M	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	C-IL	80	F			✓			FLY	
CAT18	CAT18R	<i>C. krusei</i>		C-IL	80	F			✓			FLY	
CAT18	CAT18V	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i>	C-IL	80	F			✓			FLY	
CAT19	CAT19	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	C-IL	60	F			✓		IVU/S	FLY	✓
CAT33	CAT33	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	C-IL	0	M					S	CVC/FLY	✓
CAT37	CAT37	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	C-IL	67	M	DM2		✓	✓	HB/S	MHK	
CAT43	CAT43	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	C-IL	38	F			✓		Nnos	CVC	
CAT47	CAT47	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	C-IL	64	M	DM2		✓	✓		MHK	✓
CAT51	CAT51	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	C-IL	76	M	DM2		✓	✓	P	TKF	
CAT52	CAT52M	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	C-IL	74	F	DM2		✓		IVU/VRB	FLY	

CAT52	CAT52V	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	C-IL	74	F	DM2		✓		IVU/VRB	FLY	
CAT56	CAT56	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	C-IL	70	M			✓		Nnos /IVU	FLY	
12420	12420	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Sangre	53	F			✓		S/NEU	C/CVC/FLY	✓
16926	16926	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Sangre	73	M			✓		S/IVU/VRB/NEU	CVC/FLY	✓
16926	21466	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	C-IL	73	M						CVC	✓
24948	24948	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Sangre	70	F			✓		S		
27258	27258	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Diálisis	54	F	DM2		✓	✓	P	TKF	
54552	54552	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Diálisis	54	M	DM2		✓	✓	P	TKF	
55288	55288	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	Orina	89	M			✓		IVU		
60804	60804	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Sangre	68	M			✓		S/NEU	CVC/FLY/C	✓
61529	61529	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Orina	47	F	DM2		✓		S/IVU	CVC/FLY	✓
67860	67860	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Hemodiálisis	65	M			✓	✓	S	MHK	
75785	75785	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	Orina	56	F			✓		IVU	C	
14607	14607M	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	C-IL	80	F	DM2		✓		S/NEU	C/CVC/FLY	✓
14607	14607V	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	C-IL	80	F	DM2		✓		S/NEU	C/CVC/FLY	✓
60394	60394A	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Orina	58	F	DM2		✓		IVU	CVC/FLY	
60394	60394M	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	Orina	58	F			✓		IVU	CVC/FLY	
64554	64554M	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	Orina	63	F			✓		IVU	FLY	
64554	64554V	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Orina	63	F			✓		IVU	FLY	
64555	64555M	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	Orina	82	F			✓		IVU	CVC/FLY	
64555	64555V	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Orina	82	F			✓		IVU	CVC/FLY	
80320	80320A	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	Sangre	59	M		P	✓		S/IVU	CVC/C/FLY	✓
80320	80320B	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Sangre	60	M		P	✓		S/IVU	CVC/C/FLY	✓
80320	80320U	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Orina	61	M		P	✓		S/IVU	CVC/C/FLY	
83332	83332H	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Sangre	74	F	DM2		✓		S/Nnos/VRB	CVC/FLY	
83332	83332V	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	C-IL	74	F	DM2		✓		S/Nnos/VRB	CVC/FLY	
83332	83332R	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	C-M	74	F	DM2		✓		S/Nnos/VRB	CVC/FLY	
83254	83254	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	C-IL	86	F	DM2				S/NEU/	CVC/C	
87325	87325	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	Diálisis	57	F			✓	✓	P	TKF	

BM: Biología molecular; AB: antimicrobiana C-IL: catéter por técnica intraluminal; catéter por técnica de Maki; Género, F: femenino, M: masculino; DM2: diabetes melitus tipo 2; Infecciones, P: peritonitis, S: septicemia, IVU: de vías urinarias, HB: hepatitis B, Nnos: Neumonia nosocomial, VRB: vías respiratorias bajas, NEU: neumonia; Catéteres, CVC: catéter venoso central, FLY: tipo Foley, MHK: tipo Mahurkar, TKF: tipo Tenckhoff, C: cánula.

II.2 Formación de biopelícula

Gráficas obtenidas de la formación de biopelícula para cada uno de los parámetros analizados de las superficies probadas.

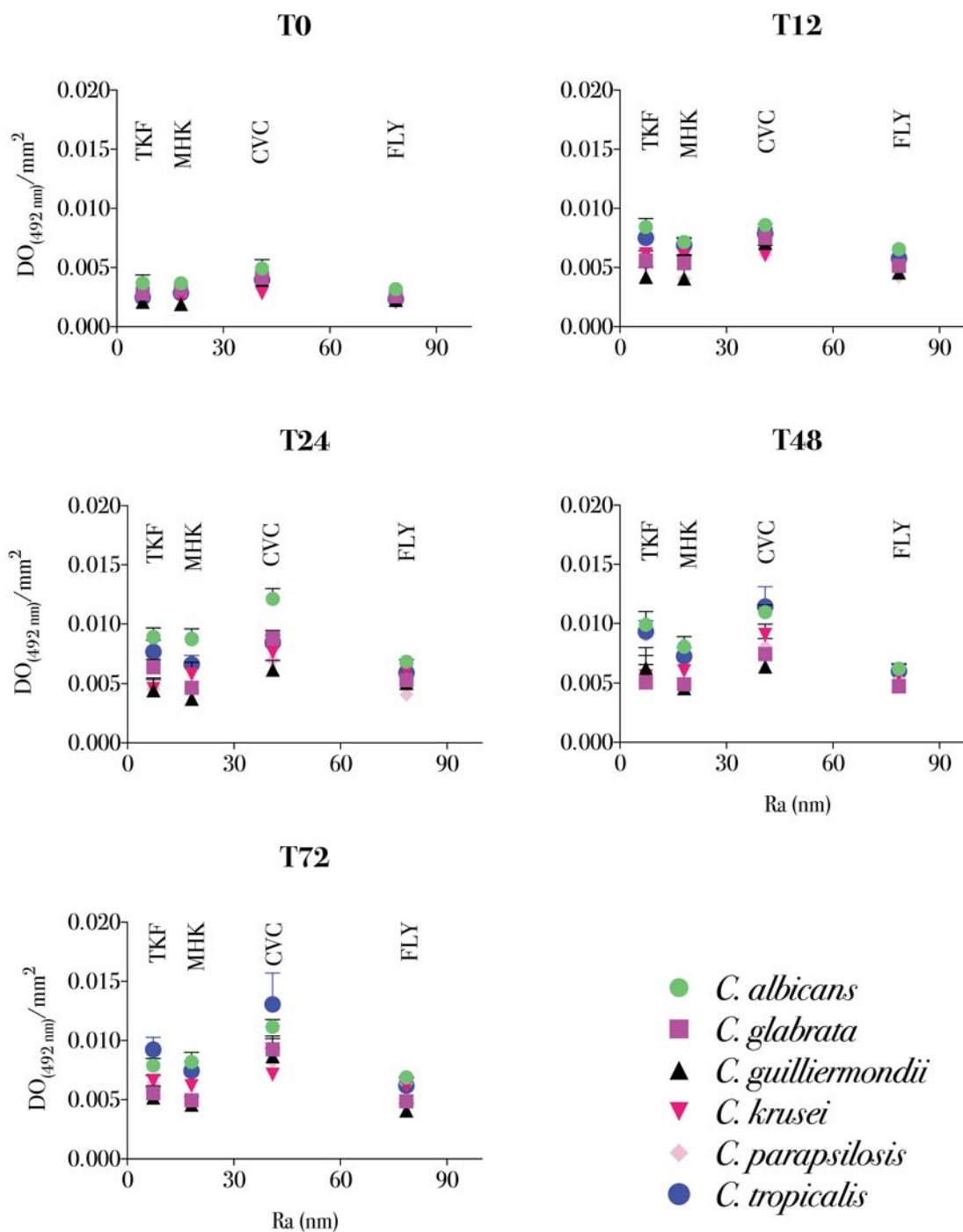


Figura 54. Cuantificación de la formación de biopelícula para cada una de las especies probadas contra la Ra de cada una de las superficies en los cinco tiempos analizados.

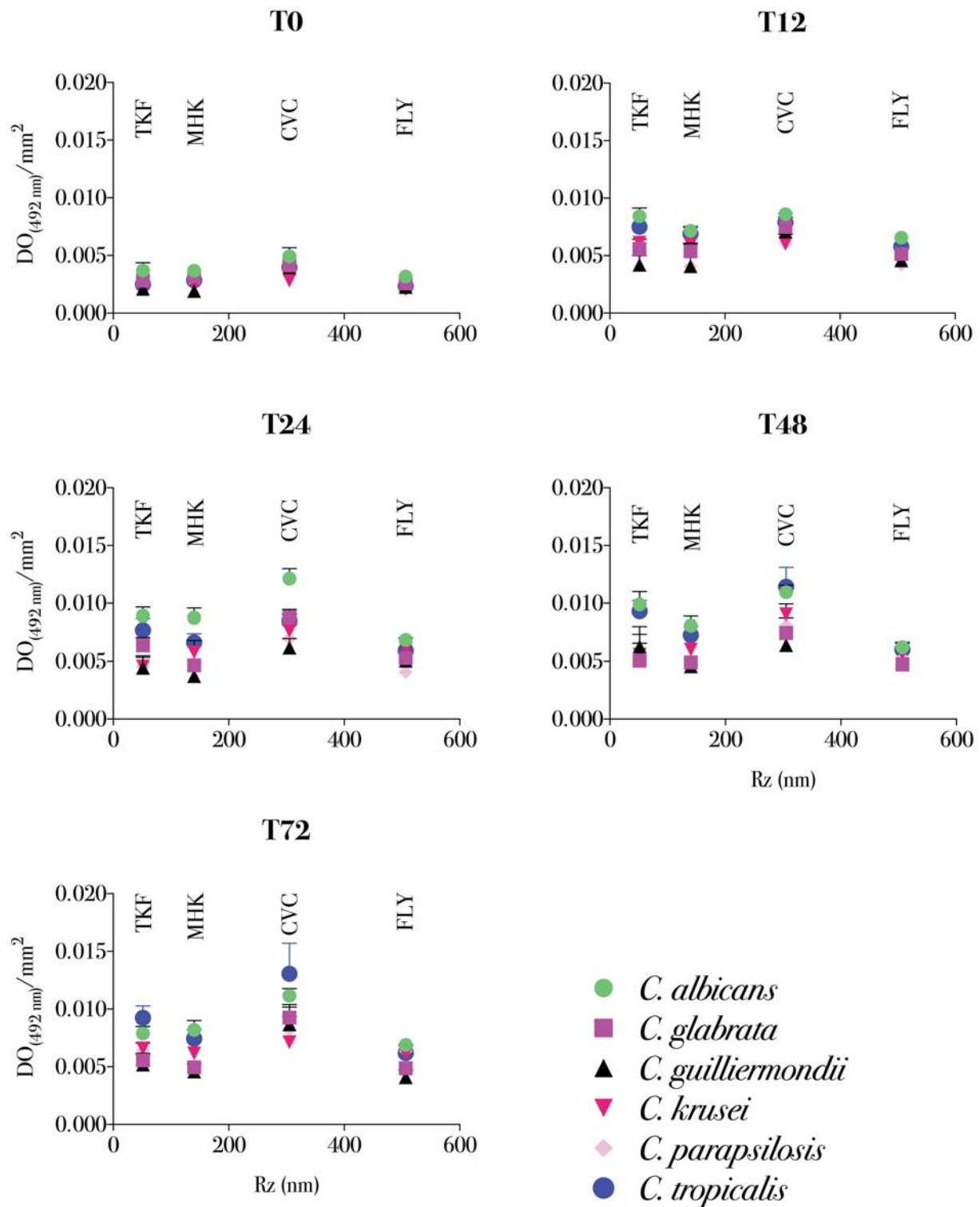


Figura 55. Cuantificación de la formación de biopelícula de las especies probadas contra la Rz en las superficies estudiadas en los cinco tiempos analizados.

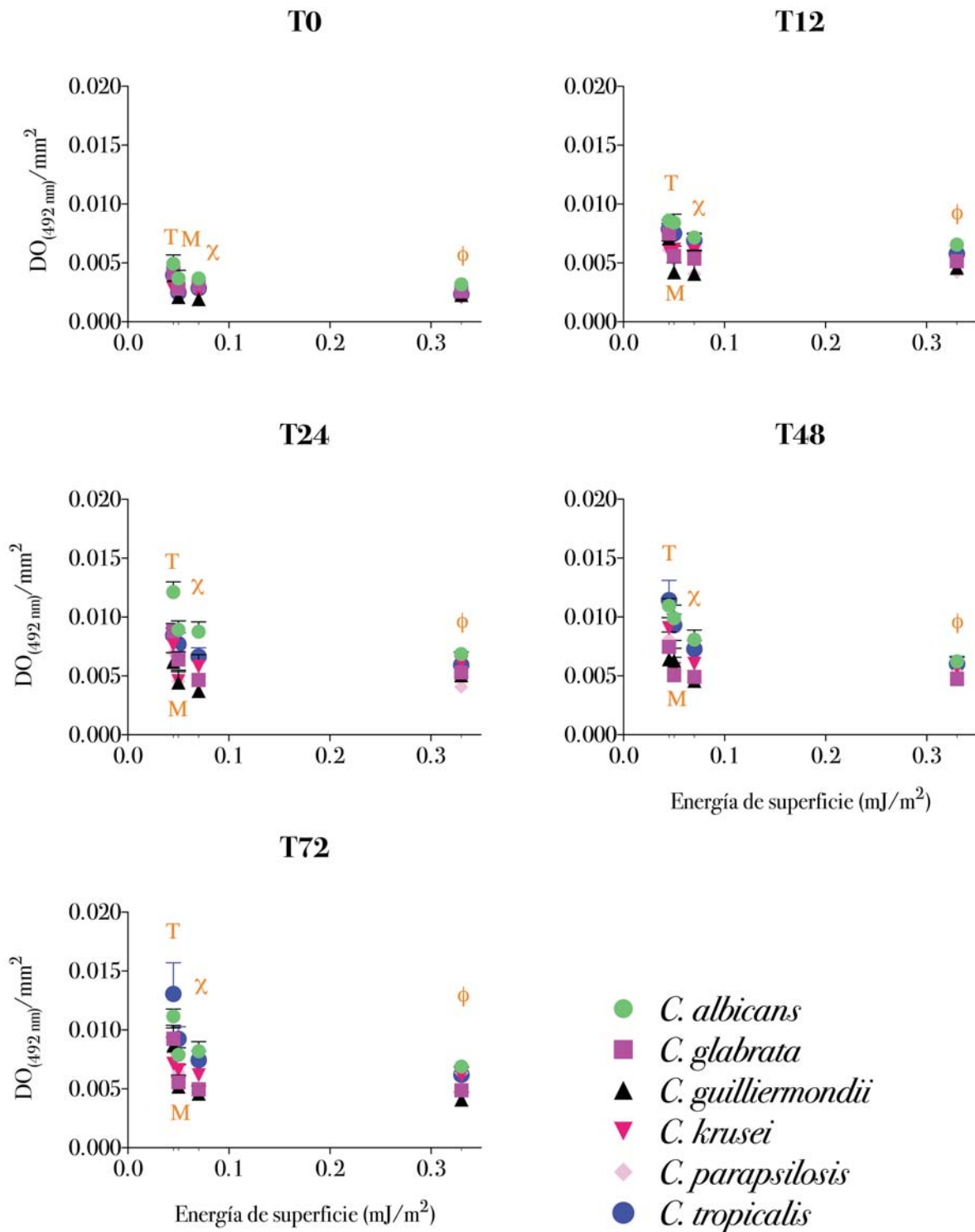


Figura 56. Cuantificación de la formación de biopelícula de las especies probadas contra la energía de superficie de los catéteres estudiados (χ: CVC; φ: FLY; M: MHK y T: TKF) en los tiempos analizados.

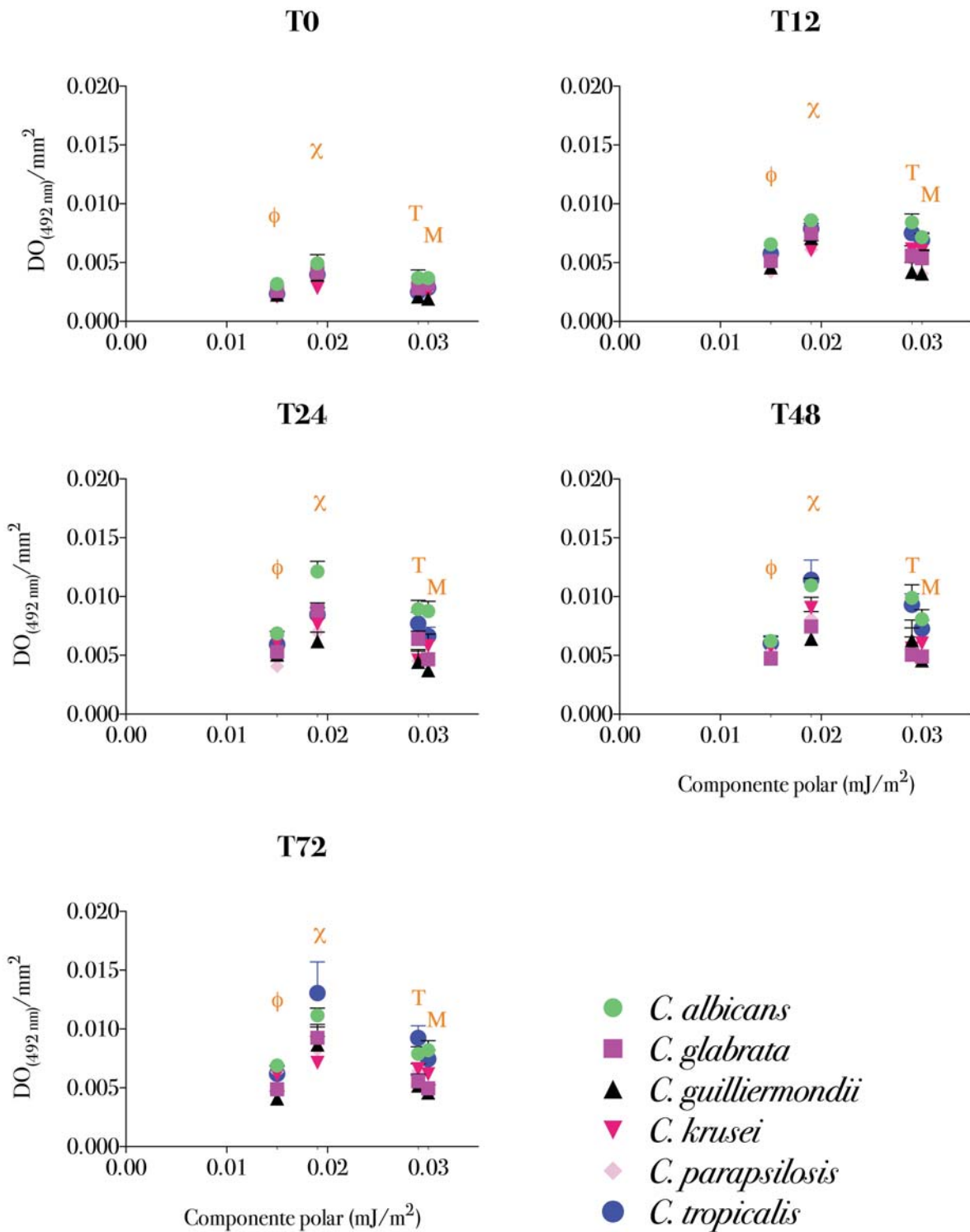


Figura 57. Cuantificación de la formación de biopelícula de las especies probadas contra los valores obtenidos del componente polar de los catéteres estudiados (χ : CVC; ϕ : FLY; M: MHK y T: TKF) en los tiempos analizados.

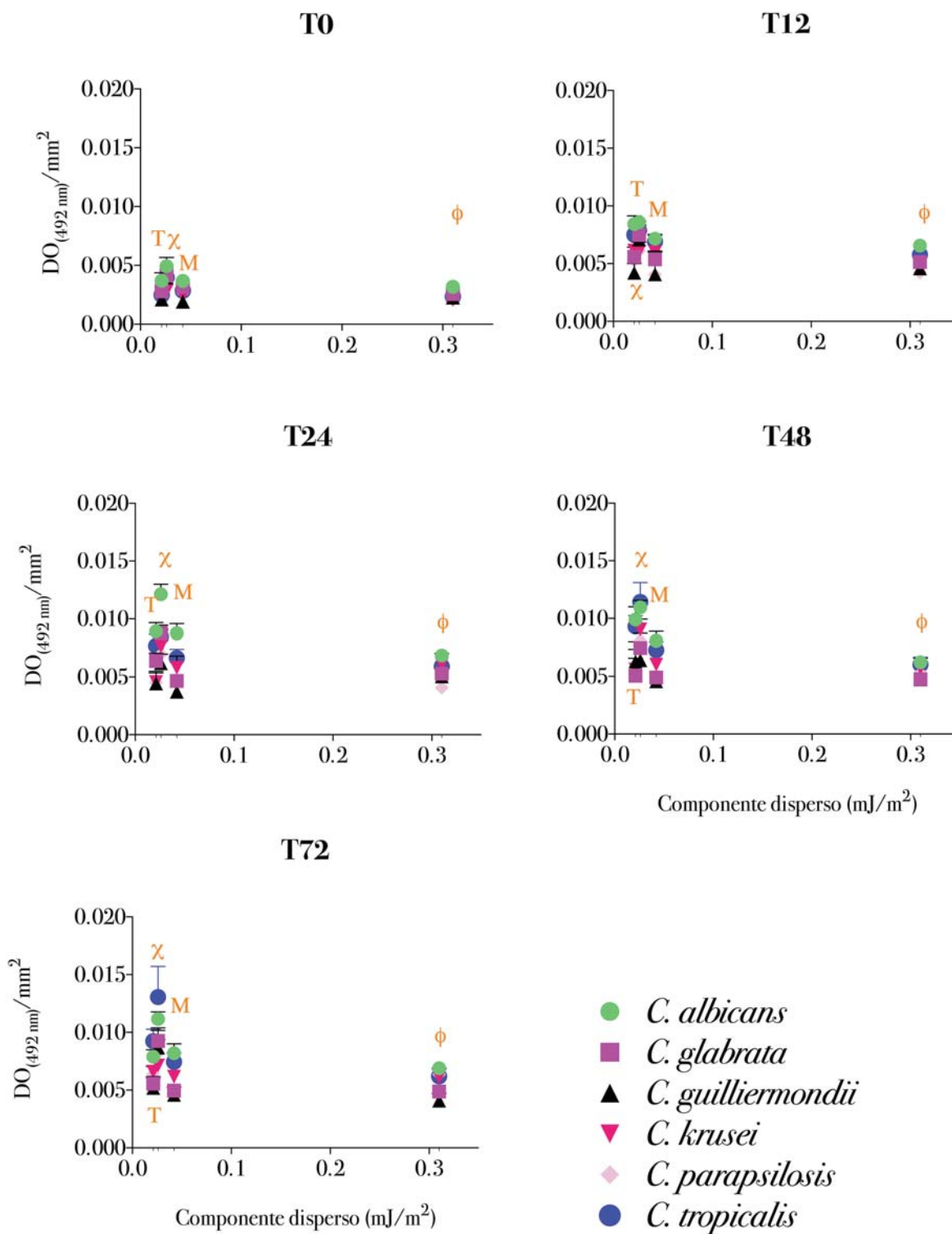


Figura 58. Cuantificación de la formación de biopelícula de las especies probadas contra los valores obtenidos del componente polar de los catéteres estudiados (χ: CVC; φ: FLY; M: MHK y T: TKF) en los tiempos analizados.

II.3 Cuantificación de la biopelícula

Cuadro 25. Valores obtenidos de la cuantificación de la biopelícula desarrollada a las 72 h por el ensayo de actividad metabólica sobre las cuatro superficies de todos los aislados de *Candida* spp.

Aislado	Especie BM	Formación de biopelículas T72 (DO ₄₉₂)											
		CVC			FLY			MHK			TKF		
		DO ₄₉₂	Clasif.		DO ₄₉₂	Clasif.		DO ₄₉₂	Clasif.		DO ₄₉₂	Clasif.	
			MH	SV		MH	SV		MH	SV		MH	SV
39	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	0.177	BFB	MF	0.219	BFB	MF	0.149	BFB	DF	0.178	BFB	MF
40	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	0.178	BFB	MF	0.18	BFB	MF	0.16	BFB	DF	0.175	BFB	MF
48	<i>C. albicans</i>	0.2	BFB	MF	0.227	BFB	MF	0.274	AFB	MF	0.161	BFB	DF
89	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	0.061	BFB	NF	0.264	AFB	MF	0.164	BFB	MF	0.23	BFB	MF
100	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	0.245	BFB	MF	0.191	BFB	MF	0.184	BFB	MF	0.148	BFB	DF
CAT09	<i>C. albicans</i>	0.225	BFB	MF	0.284	AFB	MF	0.264	AFB	MF	0.148	BFB	DF
CAT11	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	0.054	BFB	NF	0.138	BFB	DF	0.106	BFB	DF	0.089	BFB	DF
CAT14	<i>C. guilliermondii</i>	0.138	BFB	DF	0.113	BFB	DF	0.114	BFB	DF	0.114	BFB	DF
CAT15M	<i>C. glabrata</i>	0.122	BFB	DF	0.147	BFB	DF	0.108	BFB	DF	0.88	AFB	FF
CAT15V	<i>C. albicans</i>	0.21	BFB	MF	0.21	BFB	MF	0.232	BFB	MF	0.202	BFB	MF
CAT18M	<i>C. glabrata</i>	0.337	AFB	FF	0.123	BFB	DF	0.082	BFB	DF	0.131	BFB	DF
CAT18R													
CAT18V	<i>C. albicans</i>	0.226	BFB	MF	0.19	BFB	MF	0.137	BFB	DF	0.295	AFB	MF
CAT19	<i>C. tropicalis</i>	0.105	BFB	DF	0.142	BFB	DF	0.128	BFB	DF	0.128	BFB	DF
CAT33	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	0.117	BFB	DF	0.116	BFB	DF	0.094	BFB	DF	0.078	BFB	NF
CAT37	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	0.191	BFB	MF	0.166	BFB	MF	0.089	BFB	DF	0.211	BFB	MF
CAT43	<i>C. albicans</i>	0.16	BFB	DF	0.16	BFB	DF	0.176	BFB	MF	0.235	BFB	MF
CAT47	<i>C. albicans</i>	0.13	BFB	DF	0.224	BFB	MF	0.128	BFB	DF	0.112	BFB	DF
CAT51	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	0.257	AFB	MF	0.275	AFB	MF	0.181	BFB	MF	0.211	BFB	MF
CAT52M	<i>C. glabrata</i>	0.172	BFB	MF	0.164	BFB	MF	0.174	BFB	MF	0.182	BFB	MF
CAT52V	<i>C. albicans</i>	0.3	AFB	MF	0.295	AFB	MF	0.297	AFB	MF	0.257	AFB	MF
CAT56	<i>C. tropicalis</i>	0.17	BFB	MF	0.168	BFB	MF	0.168	BFB	MF	0.229	BFB	MF
12420	<i>C. albicans</i>	0.278	AFB	MF	0.403	AFB	FF	0.432	AFB	FF	0.299	AFB	MF
16926	<i>C. tropicalis</i>	0.53	AFB	FF	0.268	AFB	MF	0.221	BFB	MF	0.343	AFB	FF
21466	<i>C. tropicalis</i>	0.407	AFB	FF	0.267	AFB	MF	0.33	AFB	FF	0.327	AFB	MF
24948	<i>C. tropicalis</i>	0.4	AFB	FF	0.338	AFB	FF	0.285	AFB	MF	0.257	AFB	MF
27258	<i>C. albicans</i>	0.263	AFB	MF	0.318	AFB	MF	0.562	AFB	FF	0.304	AFB	MF

54552	<i>C. albicans</i>	0.224	BFB	MF	0.28	AFB	MF	0.179	BFB	MF	0.231	BFB	MF
55288	<i>C. krusei</i>	0.132	BFB	DF	0.176	BFB	MF	0.178	BFB	MF	0.16	BFB	DF
60804	<i>C. albicans</i>	0.279	AFB	MF	0.212	BFB	MF	0.217	BFB	MF	0.315	AFB	MF
61529	<i>C. albicans</i>	0.233	BFB	MF	0.32	AFB	MF	0.2	BFB	MF	0.218	BFB	MF
67860	<i>C. albicans</i>	0.197	BFB	MF	0.174	BFB	MF	0.145	BFB	DF	0.164	BFB	MF
75785	<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	0.131	BFB	DF	0.254	BFB	MF	0.13	BFB	DF	0.141	BFB	DF
14607M	<i>C. glabrata</i>	0.189	BFB	MF	0.186	BFB	MF	0.201	BFB	MF	0.252	AFB	MF
14607V	<i>C. albicans</i>	0.175	BFB	MF	0.23	BFB	MF	0.213	BFB	MF	0.137	BFB	DF
60394A	<i>C. tropicalis</i>	0.148	BFB	DF	0.138	BFB	DF	0.173	BFB	MF	0.176	BFB	MF
60394M	<i>C. glabrata</i>	0.246	BFB	MF	0.166	BFB	MF	0.169	BFB	MF	0.178	BFB	MF
64554M	<i>C. glabrata</i>	0.101	BFB	DF	0.131	BFB	DF	0.079	BFB	NF	0.092	BFB	DF
64554V	<i>C. albicans</i>	0.18	BFB	MF	0.163	BFB	MF	0.199	BFB	MF	0.147	BFB	DF
64555M	<i>C. glabrata</i>	0.128	BFB	DF	0.144	BFB	DF	0.129	BFB	DF	0.104	BFB	DF
64555V	<i>C. albicans</i>	0.12	BFB	DF	0.155	BFB	DF	0.166	BFB	MF	0.169	BFB	MF
80320A	<i>C. glabrata</i>	0.169	BFB	MF	0.177	BFB	MF	0.163	BFB	MF	0.137	BFB	DF
80320B	<i>C. albicans</i>	0.17	BFB	MF	0.145	BFB	DF	0.176	BFB	MF	0.135	BFB	DF
80320U	<i>C. tropicalis</i>	0.188	BFB	MF	0.16	BFB	DF	0.184	BFB	MF	0.183	BFB	MF
83332H	<i>C. albicans</i>	0.287	AFB	MF	0.161	BFB	DF	0.252	AFB	MF	0.167	BFB	MF
83332V	<i>C. albicans</i>	0.151	BFB	DF	0.155	BFB	DF	0.168	BFB	MF	0.167	BFB	MF
83332R	<i>C. glabrata</i>	0.133	BFB	DF	0.188	BFB	MF	0.159	BFB	DF	0.119	BFB	DF
83254	<i>C. tropicalis</i>	0.188	BFB	MF	0.214	BFB	MF	0.288	AFB	MF	0.353	AFB	FF
87325	<i>C. albicans</i>	0.26	AFB	MF	0.247	BFB	MF	0.214	BFB	MF	0.337	AFB	FF

Clasificación de los aislados por Muadcheingka T *et al* (MH) y Stepanovic *et al*. (SV); BFB: buenos formadores de biopelícula; AFB: altos formadores de biopelículas; DF: debil formador, MF: moderado formador; FF: fuerte formador

II.4 Sensibilidad antifúngica

Cuadro 26. Valores de CMI₅₀ obtenidos para AMB, CSF y PSZ para biopelículas desarrolladas por aislados de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* sobre cuatro tipos de superficies.

		Sensibilidad antifúngica																							
		AMB CMI ₅₀ (µg/mL)				CSF CMI ₅₀ (µg/mL)				PSZ CMI ₅₀ (µg/mL)															
Aislado	Especie BM	CVC		FLY	MHK		TKF	CVC		FLY	MHK		TKF	CVC		FLY	MHK		TKF						
CAT18M	<i>C. glabrata</i>	2	R	0.12 5	0.03		0.03		0.25		0.5		0.06		0.06		8	R		0.125					
CAT18V	<i>C. albicans</i>	4	R	0.5		4	R	0.03		0.06		0.125		0.06		0.03		0.06		0.03	0.125				
CAT19	<i>C. tropicalis</i>	0.03		1		0.03		0.03		0.03		0.14		0.5		0.25		16	R	0.03	0.06	0.03			
CAT52M	<i>C. glabrata</i>	0.03		0.06		0.06		0.06		0.125		0.25		0.03		0.25		0.25				0.03			
CAT52V	<i>C. albicans</i>	0.5		1		0.06		0.03		8	R	0.25		0.5		0.03		0.03		16	R		0.03		
16926	<i>C. tropicalis</i>	0.03		1		0.125		0.12 5		0.06		0.1875		0.25		0.03		0.03		16	R	0.03	0.03		
60394A	<i>C. tropicalis</i>	0.5		0.25		2	R	0.06		0.125		0.155		0.03		1	R	0.06		0.03		0.03	0.06		
64554M	<i>C. glabrata</i>	0.03		0.25		0.03		0.06		0.03		0.25		0.03		0.03		2	R	0.03			0.03		
64554V	<i>C. albicans</i>	1	R	16	R	0.125		0.03		0.25		8	R	0.03		0.03		0.03		16	R		0.03		
80320A	<i>C. glabrata</i>	0.06		0.12 5		0.125		0.5		0.06		0.5		0.125		0.03		0.5		0.5			0.5		
80320B	<i>C. albicans</i>	8	R	16	R	0.25		0.03		0.125		0.06		0.06		0.03		0.03		16	R		0.06		
80320U	<i>C. tropicalis</i>	8	R			0.03		0.03		0.06		0.0925		0.125		0.06		8	R	4	R	0.03	4	R	
83332H	<i>C. albicans</i>	0.125		2	R	0.06		16	R	0.125		16	R	0.25		0.5		16	R	0.25			0.03		
83332R	<i>C. glabrata</i>	0.125		0.06		0.03		0.03		0.25		0.5		0.06		0.03		0.5		0.03			0.03		
83254	<i>C. tropicalis</i>	8	R	8	R	0.5		0.25		0.125		0.625		4	R	8	R	16	R	16	R	16	R	16	R

AMB: anfotericina B; CSF: caspofungina; PSZ: posaconazol.

