



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**“ESTUDIO DE FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLADOS
CLÍNICOS DE *Candida sp.* EN MICOSIS DISEMINADAS Y EN
INFECCIONES LOCALES EN DOS HOSPITALES DE REFERENCIA
DEL ECUADOR”**

AUTOR

ZAMORA TORRES, BRYAN ORLANDO

DIRECTOR: JIMÉNEZ ARIAS, ANA PATRICIA Ph.D.

SANGOLQUÍ

2019



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**ESTUDIO DE FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLADOS CLÍNICOS DE *Candida sp.* EN MICOSIS DISEMINADAS Y EN INFECCIONES LOCALES EN DOS HOSPITALES DE REFERENCIA DEL ECUADOR**” fue realizado por el señor **Zamora Torres Bryan Orlando** el mismo que ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido, por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de Junio de 2019

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "Ana Patricia Jiménez Arias".

Ana Patricia Jiménez Arias, Ph.D.

DIRECTOR



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **ZAMORA TORRES BRYAN ORLANDO**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“ESTUDIO DE FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLADOS CLÍNICOS DE *Candida sp.* EN MICOSIS DISEMINADAS Y EN INFECCIONES LOCALES EN DOS HOSPITALES DE REFERENCIA DEL ECUADOR”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 27 de Junio de 2019


ZAMORA TORRES BRYAN ORLANDO
C.I. 171977189-9



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y LA MECÁNICA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **ZAMORA TORRES BRYAN ORLANDO**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación **“ESTUDIO DE FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLADOS CLÍNICOS DE *Candida sp.* EN MICOSIS DISEMINADAS Y EN INFECCIONES LOCALES EN DOS HOSPITALES DE REFERENCIA DEL ECUADOR”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 27 de Junio de 2019

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Zamora Torres'.

ZAMORA TORRES BRYAN ORLANDO

C.I. 171977189-9

DEDICATORIA

Dedico este título de Ingeniero a mi padre, por todas las enseñanzas impartidas sobre el trabajo, valores personales y perseverancia ante cualquier eventualidad. A mi madre por el amor incondicional, constancia, coraje y creencia en mis habilidades como profesional. A mis hermanos, por aconsejarme en momentos de desasosiego y colmarme de risas durante mi tiempo recreacional. A mi abuelita, que me crio desde niño y compartió momentos inmemorables de mi vida. A mis tíos, por fomentar la unión familiar. A mis amigos, por brindarme su amistad, comprensión, enseñanzas, lealtad, responsabilidad, tiempo y trabajo en equipo.

Bryan Orlando Zamora Torres.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y docentes del Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura, por ayudarme en el desarrollo académico, personal y profesional durante el periodo universitario.

A mis docentes Patricia Jiménez PhD. y PhD. Marcelo Grijalva MD. PhD., por brindarme la oportunidad de ingresar al Laboratorio de Nanomedicina & Nanobiología (Biotecnología Humana) como pasante y posterior tesista del proyecto. Por su colaboración en el proceso de compras de bienes y servicios. Por el seguimiento brindado al proceso experimental del proyecto. Por el apoyo técnico, moral y motivación para culminar mi tesis.

A mi mentora María José Vallejo MSc., por enseñarme los principios de la Microbiología Clínica Aplicada y acogerme como tesista del proyecto.

Al personal de los hospitales Carlos Andrade Marín (HCAM) y Eugenio Espejo (HEE), por la buena acogida del proyecto y mi participación en la recolección de aislados clínicos.

A mis amigos, compañeros y laboratoristas, por crear un ambiente ameno en la vida universitaria y convivir conmigo en momentos de estudio, diversión y superación.

Bryan Orlando Zamora Torres.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
LISTADO DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Formulación del Problema	1
1.2. Justificación del Problema	2
1.3. Objetivos de la investigación.....	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Generalidades	6

2.2.	Taxonomía	6
2.3.	Morfología del género <i>Candida</i>	8
2.4.	Estructura química	9
2.4.1.	Lípidos de la pared celular	9
2.4.2.	Quitina	10
2.4.3.	Glucanos de pared celular	10
2.5.	Epidemiología y evolución de <i>Candida sp.</i>	11
2.6.	Factores de virulencia	14
2.7.	Mecanismos patogénicos del género <i>Candida</i>	15
2.7.1.	Adherencia	16
2.7.2.	Formas morfológicas diferentes.....	17
2.7.3.	Secreción de hidrolasas.....	17
2.7.4.	Formación de <i>biofilm</i>	18
2.8.	Caracterización de <i>Candida sp.</i>	20
2.8.1.	Criterios morfológicos.....	20
2.8.2.	Estudios bioquímicos.....	21
2.8.3.	Pruebas de identificación rápida	21
2.8.4.	Métodos automatizados	21
2.8.5.	Métodos bioquímicos.....	21
2.8.6.	Métodos moleculares.....	22

2.8.7.	Métodos semicuantitativos de estudio de <i>biofilmes</i>	22
2.8.8.	Microscopía electrónica	22
2.8.9.	Microscopía confocal.....	23
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS		25
3.1.	Participantes	25
3.2.	Zona de estudio	25
3.3.	Recolección de aislados clínicos	26
3.4.1.	Aislados clínicos de micosis diseminadas	26
3.4.2.	Aislados clínicos de infecciones locales.....	26
3.4.	Criopreservación de aislados clínicos.....	27
3.5.	Identificación de aislados clínicos	27
3.6.	Cultivo de aislados clínicos de trabajo	27
3.7.	Curva de crecimiento.....	28
3.8.	Formación de <i>biofilm</i>	28
3.9.	Caracterización cualitativa del <i>biofilm</i> mediante microscopía confocal.....	28
3.10.	Caracterización cualitativa del <i>biofilm</i> mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	29
3.11.	Caracterización volumétrica del <i>biofilm</i> mediante el ensayo de Cristal Violeta.....	29
3.12.	Caracterización de la actividad metabólica del <i>biofilm</i> mediante el ensayo de XTT	30

3.13.	Evaluación de la actividad fosfolipasa	30
3.14.	Evaluación de la actividad proteasa	31
3.15.	Cálculo del coeficiente de actividad enzimática (Pz)	31
3.16.	Análisis estadístico	32
3.17.	Gráficos	32
CAPÍTULO IV: RESULTADOS		33
4.1.	Colección de aislados clínicos	33
4.2.	Curva de crecimiento	34
4.3.	Caracterización cualitativa del <i>biofilm</i> mediante microscopía confocal.....	36
4.4.	Caracterización cualitativa del <i>biofilm</i> mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	37
4.5.	Caracterización volumétrica del <i>biofilm</i> mediante el ensayo de Cristal Violeta.....	40
4.6.	Caracterización de la actividad metabólica del <i>biofilm</i> mediante el ensayo de XTT	42
4.7.	Evaluación de la actividad fosfolipasa y proteasa.....	43
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN		45
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES		53
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES		55
BIBLIOGRAFÍA		56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de la pared celular de clamidosporas de <i>Candida albicans</i>	9
Figura 2. Estructura y representación esquemática de la arquitectura de la pared celular de <i>Candida albicans</i> . (a) Micrografía electrónica de una sección media de células, (b) organización de la pared celular, y (c) representación de la organización celular.	10
Figura 3. Etiología de Candidemia en países y regiones seleccionadas.	12
Figura 4. Rangos de incidencia anual de candidemia por 100000 personas por año en el área Metropolitana de Baltimore.	13
Figura 5. Eventos tempranos en la patogénesis de Candidiasis generados en la superficie mucosa.	16
Figura 6. Morfología de levaduras, fomas de hifas y pseudohifas.	17
Figura 7. Ciclo de vida del biofilm de <i>C. albicans</i> . (A) Adherencia de levaduras a la superficie. (B) Inicio de la formación de biofilm, teniendo la proliferación de células a la forma de capa basal de células adherentes. (C) Maduración del biofilm, donde se desarrollan capas complejas de células polimórficas y se agrupan en una matriz extracelular. (D) Dispersión, donde las levaduras salen del biofilm maduro a colonizar nuevos sitios.	19
Figura 8. Determinación del índice de la actividad enzimática (Pz).	31
Figura 9. Curva de crecimiento de aislados clínicos de Micosis sistémicas escogidos aleatoriamente de la colección de estudio. Aislado 1: <i>Candida albicans</i> . Aislado 2: <i>Candida glabrata</i>	35

- Figura 10.** Curva de crecimiento de aislados clínicos de Infecciones locales escogidos aleatoriamente de la colección de estudio. Aislado 1: *Candida ciferrii*. Aislado 2: *Candida lusitaniae*.....35
- Figura 11.** Imágenes de microscopía confocal del crecimiento del biofilm del aislado de *C. albicans* correspondiente al grupo de micosis sistémicas. (A) Biofilm marcado con el fluoróforo ConA (25 ug/mL), (B) imagen de contraste y (C) superposición de imágenes A y B. Magnificación de 60X.36
- Figura 12.** Imágenes de microscopía confocal del crecimiento del biofilm del aislado de *C. albicans* correspondiente al grupo de infecciones locales. (A) Biofilm marcado con el fluoróforo ConA (25 ug/mL), (B) imagen de contraste y (C) superposición de imágenes A y B. Magnificación de 60X.36
- Figura 13.** Microscopía electrónica de barrido de biofilms de *C. albicans* provenientes de (A) micosis sistémicas vs (B) infecciones locales.....37
- Figura 14.** Microscopía electrónica de barrido de biofilms de *C. ciferrii* provenientes de (A) micosis sistémicas vs (B) infecciones locales.38
- Figura 15.** Microscopía electrónica de barrido de biofilms de *C. glabrata* provenientes de (A) micosis sistémicas vs (B) infecciones locales.....38
- Figura 16.** Microscopía electrónica de barrido de biofilms de *C. guillermondii* provenientes de (A) micosis sistémicas vs (B) infecciones locales.39
- Figura 17.** Microscopía electrónica de barrido de biofilms de *C. lusitaniae* provenientes de (A) micosis sistémicas vs (B) infecciones locales.....39
- Figura 18.** Microscopía electrónica de barrido de biofilms de *C. tropicalis* provenientes de (A) micosis sistémicas vs (B) infecciones locales.....40

- Figura 19.** Comparación volumétrica de biofilms formados por las diferentes especies de *Candida* mediante el ensayo cristal violeta.41
- Figura 20.** Comparación volumétrica de biofilms formados por los aislados con respecto al tipo de infección mediante el ensayo del cristal violeta.41
- Figura 21.** Comparación de la actividad metabólica de los biofilms formados por las diferentes especies de *Candida* mediante el ensayo de XTT.42
- Figura 22.** Comparación de la actividad metabólica de los biofilms formados por los aislados con respecto al tipo de infección mediante el ensayo de XTT.43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Clasificación taxonómica de hongos</i>	8
Tabla 2 <i>Factores predisponentes a candidiasis</i>	15
Tabla 3 <i>Identificación fenotípica de aislados clínicos</i>	33
Tabla 4 <i>Detalle de aislados clínicos recopilados según especie y tipo de infección</i>	34
Tabla 5 <i>Actividad fosfolipasa y proteasa de los aislados clínicos a nivel de especie</i>	44
Tabla 6 <i>Actividad fosfolipasa y proteasa de los aislados clínicos según tipo de infección</i>	44

LISTADO DE ABREVIATURAS

µg/mL	Microgramo por mililitro
µL	Microlitros
API	Índice analítico de perfil
AST	Prueba de susceptibilidad antifúngica
ATCC	Colección de Cultivos Tipo Americano
BDG	1,3-β-D-glucano
CENCINAT	Centro de Nanociencia y Nanotecnología
CFU	Unidades formadoras de colonias
CLSM	Microscopía de escaneo laser confocal
ConA	Conjugado Concavalina A – Alexa Fluor 488
CV	Cristal Violeta
DPBS	Buffer fosfato salino Dubelco
ECM	Material extracelular
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
h	Horas
HCAM	Hospital Carlos Andrade Marín
HEE	Hospital Eugenio Espejo
INSPI	Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-morfolino-4-il-propano-1-sulfónico

msnm	Metros sobre el nivel del mar
nm	Nanómetro
°C	Grados centígrados
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Ioduro de Propidio
Pz	Coficiente de actividad enzimática
RPMI 1640	Medio Roswell Park Memorial Institute
s	segundos
SD	Desviación estándar
SDA-YEA	Medio Sabauroud – Emulsión yema de huevo
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TSA	Agar Triptosa de Soya
XTT	sal 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-hidróxido de tetrazolio
YCB-BSA	Medio Base Carbón de Levadura – Albúmina de Suero Bovino
YPD	Agar de Levadura Peptona Dextrosa

RESUMEN

El género *Candida sp.* ha sido considerado como el principal agente causal de infecciones fúngicas invasivas en pacientes hospitalizados. Las especies de este género conforman levaduras comensales de la cavidad oral en individuos saludables. Sin embargo, pueden actuar como patógenos oportunistas cuando existen alteraciones en el sistema inmune de sus hospederos, mediado por factores de virulencia específicos. La adhesión, secreción de hidrolasas y formación de *biofilm* son considerados como los mayores factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis del género *Candida*. En este estudio se analizaron 136 aislados clínicos provenientes de pacientes con infecciones locales y micosis sistémicas procedentes de dos hospitales de referencia del Ecuador. Los aislados de micosis sistémicas comparados con los de infecciones locales, demostraron tener similar conformación estructural del *biofilm* comprobada por los ensayos de microscopía confocal (*Confocal Laser Scanning Microscopy* CLSM) y microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscope* SEM), mayor producción de biomasa (ensayo de cristal violeta), mayor actividad metabólica (ensayo XTT), menor producción de fosfolipasas (ensayo en medio SDA-YEA) y menor producción de proteasas (ensayo en medio YCB-BSA). En conclusión, existe diferencia entre los factores de virulencia pertenecientes a los aislados de infecciones locales con los de micosis sistémicas, lo que les permite tener mayor o menor patogenicidad durante el proceso de infección.

PALABRAS CLAVE:

- *Candida sp.*
- **FACTORES DE VIRULENCIA**
- **SECRECIÓN DE HIDROLASAS**
- **FORMACIÓN DE *BIOFILM***

ABSTRACT

Candida sp. have been considered as the main causative agent of invasive infections in hospitalized patients. The species of this gender form commensal yeasts from the oral cavity in healthy individuals. However, they can act as opportunistic pathogens when there are problems in the host's immune system, mediated by specific virulence factors. The adhesion, secretion of hydrolases and *biofilm* formation are the major virulence factors related to the pathogenesis of the *Candida* genus. In this study, 136 clinical isolates were analyzed from patients with local infections and systemic mycoses from to reference hospitals in Ecuador. The isolates of systemic mycosis compared with those of local infections, demonstrated to have similar structural conformation of the *biofilm* verified by confocal microscopy (CLSM) and scanning electron microscopy (SEM), higher biomass production (violet crystal assay), higher metabolic activity (XTT assay), lower production of phospholipases (assay in SDA-YEA medium) and lower production of proteases (assay in YCB-BSA medium). In conclusion, there is a difference between the virulence factors phenotype of isolates from local infections and those causing systemic mycosis, which allows them to have more or less pathogenicity during the infection.

KEY WORDS:

- *Candida sp.*
- VIRULENCE FACTORS
- HIDROLASE SECRETION
- *BIOFILM* FORMATION

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del Problema

Candida spp. es un grupo de hongos levaduriformes oportunistas y patógenos que han sido responsables de las infecciones fúngicas invasivas más comunes en pacientes hospitalizados a nivel mundial, que pueden alcanzar altas tasas de mortalidad y morbilidad entre 40 y 50%, llegando a ser la cuarta infección nosocomial más común y de flujo sanguíneo (Antinori, Milazzo, Sollima, Galli, & Corbellino, 2016; Zdanavičienė, Gleiznys, & Gleiznys, 2017).

Según Arendrup, et al. (2010) y Cleveland, et al. (2015), la candidiasis invasiva afecta a un estimado de 250000 personas en todo el mundo cada año, causando la muerte de 50000 infectados. Declarando rangos de candidemia entre 2 y 14 casos por 100000 personas en estudios de poblaciones amplias (Andes et al., 2012). Dicha incidencia se debe a factores como edad del paciente, estado de salud, inmunodeficiencias, trasplantes de órganos, tratamientos mediante quimioterapia para cáncer, entre otros (Quindós, 2018). Se ha encontrado gran incidencia de cinco especies de *Candida* en candidiasis invasivas, entre las cuales destacan *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*; que conforman el 90% de los aislados recuperados de pacientes infectados (Antinori et al., 2016).

Generalmente, las fungemias ocasionadas por estas especies, afectan a pacientes inmunocomprometidos o sujetos a cirugía, ubicados en unidades de cuidado intensivo. Otras de las causas frecuentes de contagio son la colonización de catéteres hospitalarios, translocación desde el intestino al torrente sanguíneo y terapia con antibióticos de alto espectro (Antinori et al., 2016). Estos hongos oportunistas residen en mucosas, piel, tracto gastrointestinal, tracto genitourinario, entre otros. La colonización por parte de los hongos es inofensiva en individuos saludables. Las infecciones sistémicas llegan a producirse debido a

la intrusión de los hongos por el epitelio celular del hospedero, generalmente desde el intestino a través del torrente sanguíneo, difundiéndose a través de todo el cuerpo (Zdanavičienė et al., 2017).

Las especies de *C. albicans* causan un número considerable de infecciones invasivas, pero las no-*albicans* han ido incrementando niveles de mortalidad y una mayor resistencia antifúngica. La identificación de las especies de *Candida* que se encuentran colonizando un hospedero, es de vital importancia, debido a que cada especie tiene un patrón específico de susceptibilidad a drogas antifúngicas, confiriendo el tratamiento adecuado para el paciente (Lockhart et al., 2017).

El diagnóstico tradicional para la Candidiasis Invasiva son los cultivos de sangre u otros fluidos estériles y la demostración histopatológica de la enfermedad del tejido invasivo (Antinori et al., 2016). Sin embargo, la sensibilidad de estos sistemas se ve comprometida por el número de unidades formadoras de colonias (CFU), que son bajos en pacientes con candidemia (Pfeiffer et al., 2011). Por lo tanto, Nguyen, et al. (2012) desarrolló ensayos que no involucren el cultivo diagnóstico, como 1,3-β-D-glucano (BDG), el ensayo manano/anti-manano y una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mejorando la sensibilidad para la detección de Candidiasis invasivas.

1.2. Justificación del Problema

Dado el incremento de incidencia de Candidiasis Invasiva generada por hongos del género *Candida*, se han llevado a cabo investigaciones sobre las infecciones, patogenicidad y factores de virulencia asociados a este género (Chaffin, López-Ribot, Casanova, Gozalbo, & Martínez, 1998). Como menciona Nucci, et al. (2013), de su encuesta realizada en 22 hospitales de ocho países Latino Americanos, a pesar de amplias diferencias entre los países encuestados, la

media de incidencia fue sumamente superior a la reportada en Estados Unidos y Europa. Por lo que Panizo, et al. (2005), propone diseñar metodologías de prevención e identificación de los diferentes tipos de Candidiasis.

Según la problemática planteada, surge la interrogante: ¿Existen registros médicos confiables de infecciones originadas por hongos levaduriformes en Ecuador?, donde la literatura menciona que las infecciones nosocomiales son en cierto punto, generadas por un gran número de levaduras patógenas (Antinori et al., 2016), pero no se han analizado factores de virulencia asociados al género. Por ende, se requiere que la comunidad científica publique reportes médicos sobre este tipo de infecciones, con el fin de llevar un registro para compilar datos a nivel mundial. Buscando la generación de respuestas farmacéuticas para este tipo de infecciones (Hazen, 1995).

Los factores de virulencia característicos de los hongos del género *Candida*, con mayor incidencia en el cuadro clínico para Candidiasis Invasiva de nivel agudo o recurrente, se deben a cambios fenotípicos, adherentes, secreción de enzimas líticas dependientes de pH y formación de *biofilms* (Ombrella, Racca, & Ramos, 2008).

Detallando dichos factores, en primer lugar, la habilidad de este género para intercambiar y filamentar sus morfotipos entre levaduras unicelulares, pseudohifas e hifas promueven la Candidiasis Invasiva (Pappas, Lionakis, Arendrup, Ostrosky-zeichner, & Kullberg, 2018). Segundo, la secreción de enzimas hidrolíticas (Richardson & Lass-Flörl, 2008), como hidrolasas, fosfolipasas, lipasas y proteasas, que ayudan a la invasión del tejido del hospedero y daño de órganos (Pappas et al., 2018; Ramos et al., 2015). Tercero, una efectiva adherencia e invasión a células endoteliales y epiteliales facilitan la diseminación en el flujo sanguíneo, mediante proteínas como proteína aglutinante 3, adhesinas e invasivas específicas de este

género (Edwards et al., 2018). Cuarto, la formación de *biofilms*, definidos como comunidades de células empacadas densamente adheridas a la superficie, que confieren resistencia intrínseca a antifúngicos terapéuticos convencionales, al sistema inmune del huésped y otros factores ambientales (Gulati & Nobile, 2016; Pappas et al., 2018).

A nivel mundial se han realizado numerosas investigaciones sobre el tema, sin embargo, en Ecuador, dadas condiciones económicas, tecnológicas, científicas y sociales, no se ha podido profundizar al respecto (Nisha, Mudhigeti, Asir, & Chandrakesan, 2015). Las investigaciones existentes, se limitan a los proyectos que involucran la identificación, susceptibilidad y distribución de *Candida* (Guerrero, 2016), identificación de *Candida ecuadorensis* en dos regiones del Ecuador (James et al., 2017), determinación de flora micótica en secreciones faríngeas (Ocaña Herrera, 2015), prevalencia de candidiasis vulvovaginal (Sacoto, 2015), medidas preventivas (Piguave, 2013) y vigilancia microbiológica en cuidados intensivos (Jiménez, 2013). Por lo que el estudio de factores de virulencia de aislados de *Candida sp.* permitirá reforzar el conocimiento sobre su distribución, epidemiología y patogenicidad, de modo que se pueda establecer soluciones de mejora terapéutica.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Identificar y comparar factores de virulencia (formación de *biofilms*, actividad fosfolipasa y proteasa) en *Candida sp.* presentes en aislados clínicos de origen invasivo en contraste con no invasivos provenientes de los hospitales de referencia Carlos Andrade Marín y Eugenio Espejo, mediante técnicas de microscopía electrónica, microscopía confocal, ensayos bioquímicos y microbiológicos.

1.3.2. Objetivos específicos

- Recolectar e identificar fenotípicamente aislados clínicos de *Candida* a nivel de especie.
- Caracterizar de forma cualitativa la formación de *biofilms* en especies de *Candida*.
- Determinar el volumen del *biofilm* en especies de *Candida* y su actividad metabólica.
- Evaluar la actividad fosfolipasa y proteasa de los aislados.
- Comparar el comportamiento de los factores de virulencia en el grupo de aislados de origen invasivo vs. los aislados de origen no invasivo.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades

Candida es un género de levaduras saprófitas conformado por alrededor de 150 especies, que pertenecen al *phylum Ascomycotina* (Castañón, 2016). Se ha estimado que una porción de especies del género causa infecciones invasivas en humanos (Lockhart et al., 2017). Existen 19 especies del género implicadas en infecciones humanas, entre las cuales destacan *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* (Chandrakant Deorukhkar & Roushani, 2018).

El miembro más patogénico del género que causa diferentes tipos de candidiasis es *Candida albicans* (Chandrakant Deorukhkar & Roushani, 2018). Sin embargo, las especies no *albicans*, han sido asociadas a un aumento de mortalidad y resistencia a drogas antifúngicas en los últimos años (Lockhart et al., 2017).

Las levaduras dimórficas son capaces de cambiar de hifas unicelulares a filamentosas con el fin de penetrar materiales sólidos (Gow, Van De Veerdonk, F.L. Brown, & Netea, 2012; Sudbery, 2011). Dicha plasticidad morfológica es un determinante de virulencia, debido a que la forma hifal invasiva no es tolerada por el sistema inmune, induciendo una respuesta inmune específica mediada por macrófagos (Moyes et al., 2010).

2.2. Taxonomía

Según Lodder, et al. (1952), el género *Candida* es un grupo heterogéneo perteneciente a las levaduras que no cuenta con características necesarias para clasificarlas fuera del género de levaduras imperfectas. Estos microorganismos son los agentes etiológicos de Candidiasis, con la siguiente clasificación taxonómica:

Reino superior: Eukariota

Reino: Fungi (Mycota)

División: *Blastomycetes*

Orden: *Cryptococcales*

Familia: *Cryptococcaceae*

Género: *Candida*

Otra de las clasificaciones más renombradas para hongos en la comunidad científica fue desarrollada por Hoog y Guarro (1995), determinando diversos parámetros que brindaban mayor grado de complejidad evolutiva a este género. Empezando desde los más simples como *Myxomycota*, *Chytridiomycota*, *Oomycota* y *Zygomycota*, los cuales no presentan micelio septado. Por otro lado, la división *Ascomycota* y *Basidiomycota* que son hongos superiores, con la principal característica de presentación de micelio septado. Y por último, los hongos anamórficos, subdivididos por la presencia de hifas de reproducción sexual y un estado telomorfo desconocido (Guarro, Gené, & Stchigel, 1999). Dicha clasificación es detallada en la Tabla 1.

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de hongos.

División Myxomycota	
División Chytridiomycota	
División Oomycota	
División Zygomycota	
Orden Mucorales	
Orden Entomophthorales	
División Ascomycota	
Clase Endomycetes	
Familia Saccharomycetaceae	
Issatchenkia orientalis.....	<i>C. krusei</i>
Saccharomyces cerevisiae	
Familia Endomycetaceae	
Debaryomyces hansenii.....	<i>C. famata</i>
Hansenula anomala.....	<i>C. pelliculosa</i>
Pichia guilliermondii.....	<i>C. guilliermondii</i>
Pichia norvegensis.....	<i>C. norvegensis</i>
Stephanoascus ciferri.....	<i>C. ciferri</i>
Familia Dipodascaceae	
Clavispora lusitaniae.....	<i>C. lusitaniae</i>
Familia Lipomycetaceae	
Kluyveromyces marxianus.....	<i>C. kefir</i>
Clase Euascomycetes	
División Basidiomycota	
Clase Heterobasidiomycetes	
Clase Holobasidiomycetes	
Hongos anamórficos	
Levaduras	
Hyphomycetes	
Coelomycetes	

Fuente: (Hoog & Guarro, 1995)

2.3. Morfología del género *Candida*

El género *Candida* es un grupo de hongos polimórficos, debido a que su pared celular permite adoptar una amplia gama de morfologías (Iglesias, 2011). El tamaño celular y rango de crecimiento de este género es similar al de *S. cerevisiae*, con un ligero incremento en el volumen de la pared celular con cada ciclo de crecimiento. Siendo cultivadas a condiciones

óptimas, alcanzan un diámetro de 2.6 y 3.4 μm para tubos germinales e hifas maduras, respectivamente (Klis, Koster, & Brul, 2014).

Bajo pobres condiciones de crecimiento, estos microorganismos pueden formar clamidosporas, conocidas como esporas redondas con pared celular de gran espesor (Kwon-Chung, Lehman, Good, & Magee, 1985). Estas condiciones contribuyen a la adaptación al entorno en el que se desarrollen, conformadas por una serie de capas proteicas que pueden variar dependiendo de la especie, como se visualiza en la Figura 1.

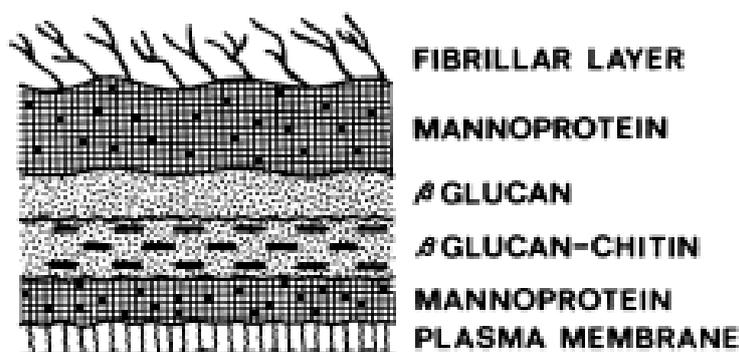


Figura 1. Diagrama esquemático de la pared celular de clamidosporas de *Candida albicans*.

Fuente: (Shepherd, 1987)

2.4. Estructura química

2.4.1. Lípidos de la pared celular

Son constituyentes menores de la pared celular del género *Candida* y a nivel general del resto de hongos. Uno de los principales lípidos es el fosfolipomanano, que carece de glucosamina y presenta una organización diferente de las cadenas de glicano, conformado por cadenas lineales de β -1,2 unidos a residuos de manosa y fosfoinositol ceramida, los cuales según Mille, et al. (2004), proveen la capacidad de adhesión, protección y señalización de este género.

2.4.2. Quitina

Es un polisacárido lineal conformado de 2000 unidades de N-acetilglucosamina unidas por enlaces β -1,4 (Figura 2)(Elorza & Valent, 2006). Es un componente principal de la pared celular de este grupo, dado su relación con β -1,3-glucano, donde la manoproteína es covalentemente asociada (Elorza & Valent, 2006).

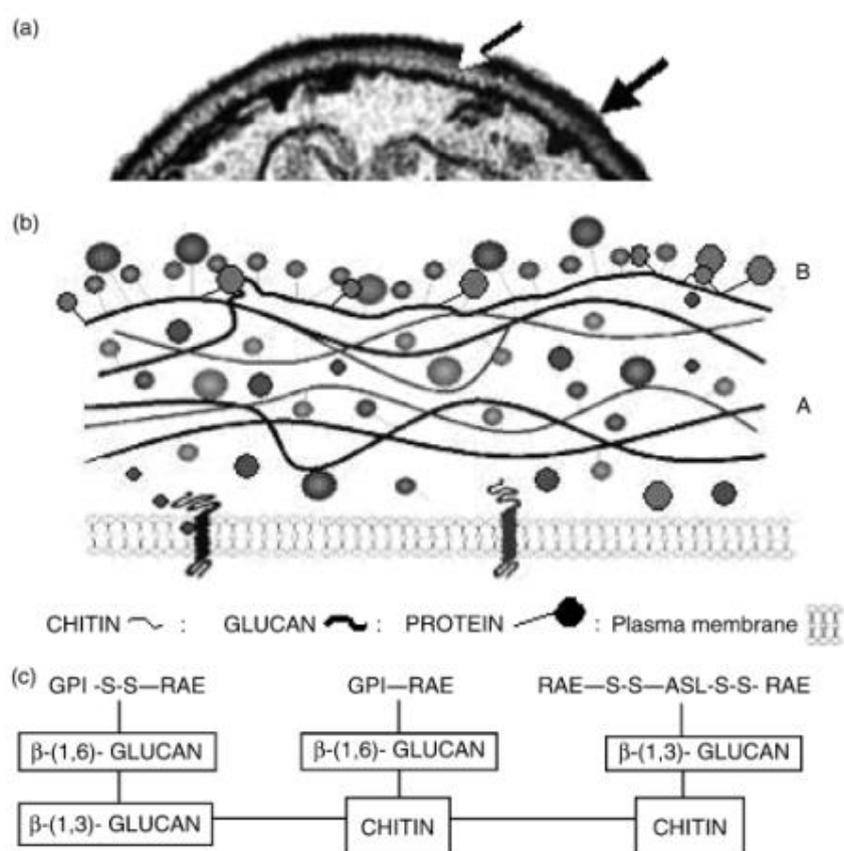


Figura 2. Estructura y representación esquemática de la arquitectura de la pared celular de *Candida albicans*. (a) Micrografía electrónica de una sección media de células, (b) organización de la pared celular, y (c) representación de la organización celular.

Fuente: (Elorza & Valent, 2006)

2.4.3. Glucanos de pared celular

Glucanos complejos (β -glucanos) y mananos son liberados por el género *Candida* cuando se los inocula en medio sintético y en sangre de pacientes infectados, dichos compuestos

tienen un alto nivel de toxicidad y pueden causar shocks anafilácticos o arteritis coronaria. Además, pueden suprimir funciones de monocitos y células T de forma directa e indirecta respectivamente, generando el desarrollo de Candidiasis (Nakagawa, Ohno, & Murai, 2003).

2.5. Epidemiología y evolución de *Candida sp.*

La Candidemia es una de las micosis invasivas con mayor renombre en pacientes hospitalizados a nivel mundial, estudiada principalmente por Estados Unidos, el Oeste Europeo y Asia. A nivel latinoamericano, a excepción de Brasil y pequeños reportes de otros países, el conocimiento de la epidemiología de la Candidemia es escaso (Leanord & Bal, 2011; Liu, Liao, Chen, & Chang, 2010; Zilberberg, Shorr, Kollef, Zilberberg, & Shorr, 2014). *Candida albicans* ha perdurado como el patógeno predominante de Candidemia y Candidiasis Invasiva (Figura 3). Sin embargo, la emergencia de otras especies ha complicado el diagnóstico y tratamiento de estas infecciones (Quindós, 2018).

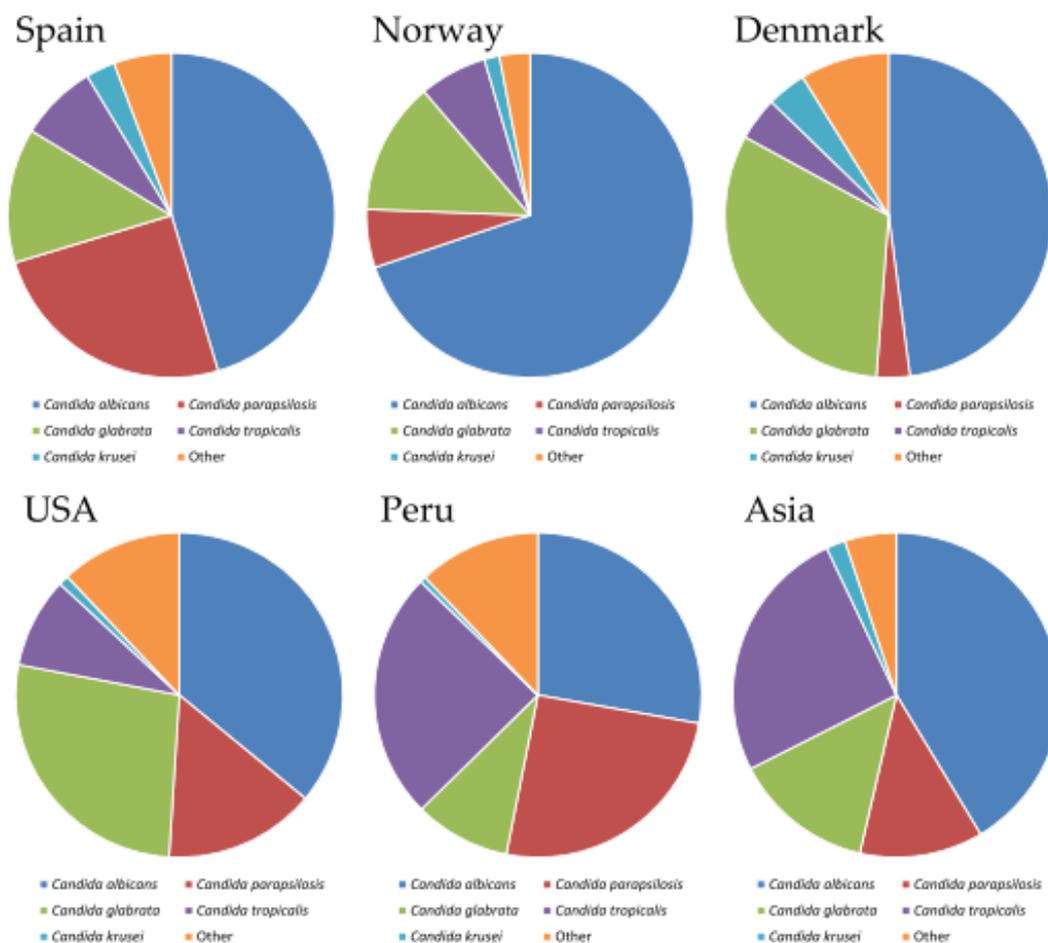


Figura 3. Etiología de Candidemia en países y regiones seleccionadas.

Fuente: (Quindós, 2018)

El reconocimiento de las características de incidencia, poblaciones susceptibles (infantes <1 año y adultos ≥ 65 años) (Figura 4), distribución de especies y susceptibilidad antifúngica es fundamental para establecer medidas de control de la infección, manejo de la enfermedad, profilaxis y terapia antifúngica (Nucci et al., 2013).

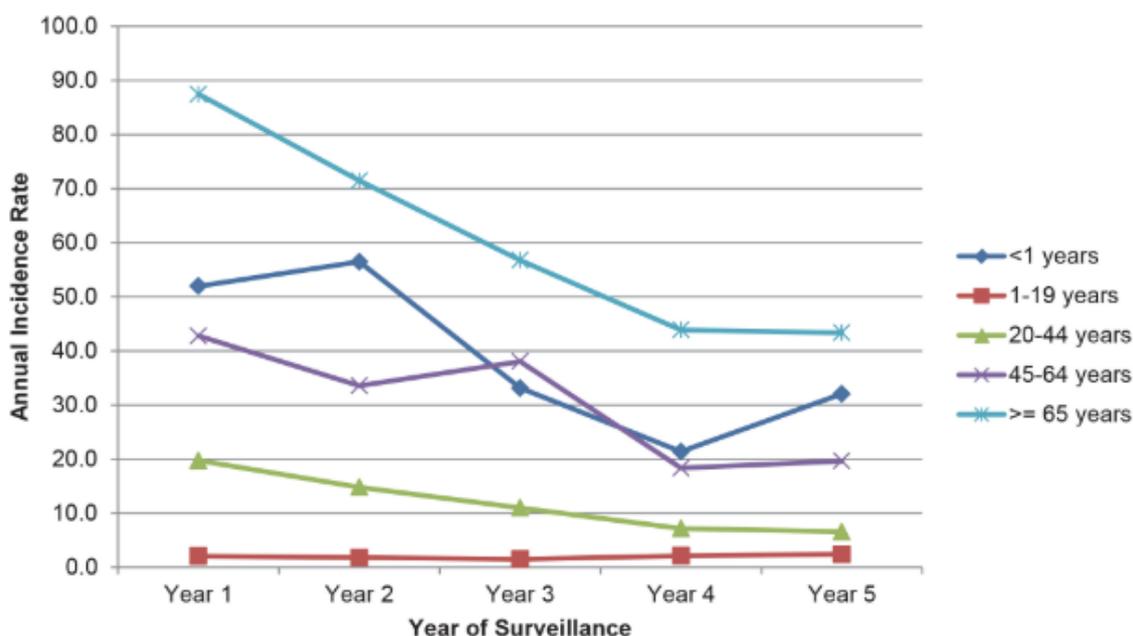


Figura 4. Rangos de incidencia anual de candidemia por 100000 personas por año en el área Metropolitana de Baltimore.

Fuente: (Cleveland et al., 2015)

Las especies del género *Candida* son comensales y llegan a colonizar la piel y superficies mucosas de los humanos. Pacientes enfermos críticamente o inmunocomprometidos, son más susceptibles a contraer y desarrollar infecciones superficiales y sistémicas mortales (Sardi, Bernardi, Scorzoni, Fusco-Almeida, & Giannini, 2013).

Candida auris ha sido un patógeno emergente reciente, que fue aislado del canal externo del oído de un paciente en 2008, el cual demostró ser una levadura multirresistente (Lockhart et al., 2017). Este patógeno ha sido asociado a graves infecciones invasivas con un alto rango de mortalidad (aproximadamente del 60%), causando conmoción en la región Asiática, África, Reino Unido, Latinoamérica y Estados Unidos (Larkin, Hager, Chandra, & Mukherjee, 2017).

2.6. Factores de virulencia

La mayoría de especies de este género han desarrollado un amplio rango de factores de virulencia para conseguir la habilidad para colonizar tejidos hospederos, superar defensas del hospedero y causar infecciones (Furlaneto, Tardei, Furlaneto-Maia, Galvao, & Pereira, 2012).

Estas infecciones se alcanzan una vez que se perturba el equilibrio inmunológico del hospedero, al ocurrir variaciones en el medio ambiente (cambios de pH o cambios nutricionales) o el uso indiscriminado de antibióticos, que pueden desencadenar la proliferación de la micosis (Gulati & Nobile, 2016).

Además, se han mostrado varias enzimas degradadoras que promueven la virulencia. Así como se asume, que la invasión puede ser facilitada por el cambio de células en forma de lavaduras a su crecimiento filamentoso, denominado morfogénesis (Calderone & Fonzi, 2001).

Cardenes, et al. (2006), señala los principales factores que favorecen la candidiasis humana de forma clara y concreta en la Tabla 2.

Tabla 2*Factores predisponentes de la candidiasis*

Factores intrínsecos	Factores extrínsecos
Fisiológicos <ul style="list-style-type: none"> • Edad • Recién nacidos • Ancianos • Embarazo 	Medicamentos <ul style="list-style-type: none"> • Inmunosupresores • Corticosteroides • Antimitóticos • Anticonceptivos • Antibioterapia antibacteriana • Antibioterapia antiparasitaria (metronidazol)
Patológicos <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma • Leucemia • Linfoma • Enfermedad de Hodgkin • Anemia aplásica • Agranulocitosis • Granulomatosis séptica familiar • Alteración de la inmunidad celular • Diabetes • Hipotiroidismo • Hipoadrenocorticismo • Malabsorción • Malnutrición • Enfermedades consuntivas 	Medicamentos quirúrgicos <ul style="list-style-type: none"> • Cateterismo venoso o arterial • Cirugía cardíaca • Cirugía abdominal • Trasplante de órganos • Extracciones dentarias

Fuente: (Cardenes, 2006)

2.7. Mecanismos patogénicos del género *Candida*

En condiciones de salud estables, el sistema inmune del humano es capaz de proteger el organismo de infecciones bacterianas y/o fúngicas. Al entrar en un estado inmunosuprimido, los microorganismos saprófitos se pueden convertir en patógenos potenciales (López &

Marín, 2001). Entre los mecanismos patogénicos de mayor relevancia del género, se encuentran la adhesión, secreción de hidrolasas, formación de *biofilm*, entre otros.

2.7.1. Adherencia

El género *Candida* se conecta al huésped mediante biomoléculas denominadas adhesinas, que promueven la adherencia a células y ligandos celulares del hospedero. Las proteínas de los microorganismos que se unen a las proteínas de la matriz extracelular de células mamíferas como la fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno, han sido estudiadas detalladamente por la importancia clínica (Calderone & Fonzi, 2001).

Se han evidenciado dos mecanismos de invasión por parte de estos microorganismos, los cuales pueden generar daño a las células epiteliales (Dalle et al., 2010). El primer mecanismo hace referencia al proceso de endocitosis, el cual es inducido por el microorganismo, forzando a la célula huésped a envolver al hongo e incluirlo en los procesos celulares. El segundo mecanismo, incluye a la penetración activa, durante la invasión las hifas ejercen presión sobre las células epiteliales, generando el ingreso del hongo (Zdanavičienė et al., 2017; Zhu & Filler, 2016). Dichos mecanismos se muestran en la Figura 5.

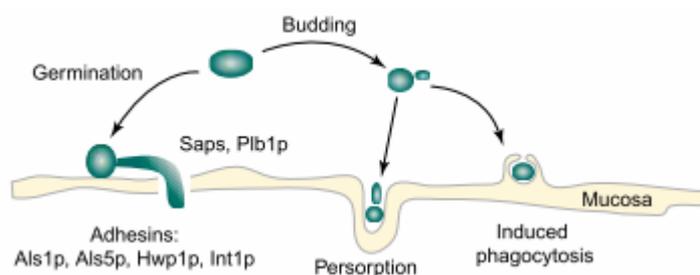


Figura 5. Eventos tempranos en la patogénesis de Candidiasis generados en la superficie mucosa.

Fuente: (Calderone & Fonzi, 2001)

2.7.2. Formas morfológicas diferentes

Las especies del género *Candida* pueden crecer de forma diferentes, como células de levadura envueltas (de forma redonda u ovoide, unidas o separadas), células pseudohifales, con verdaderas hifas ubicadas paralelamente (Figura 7).

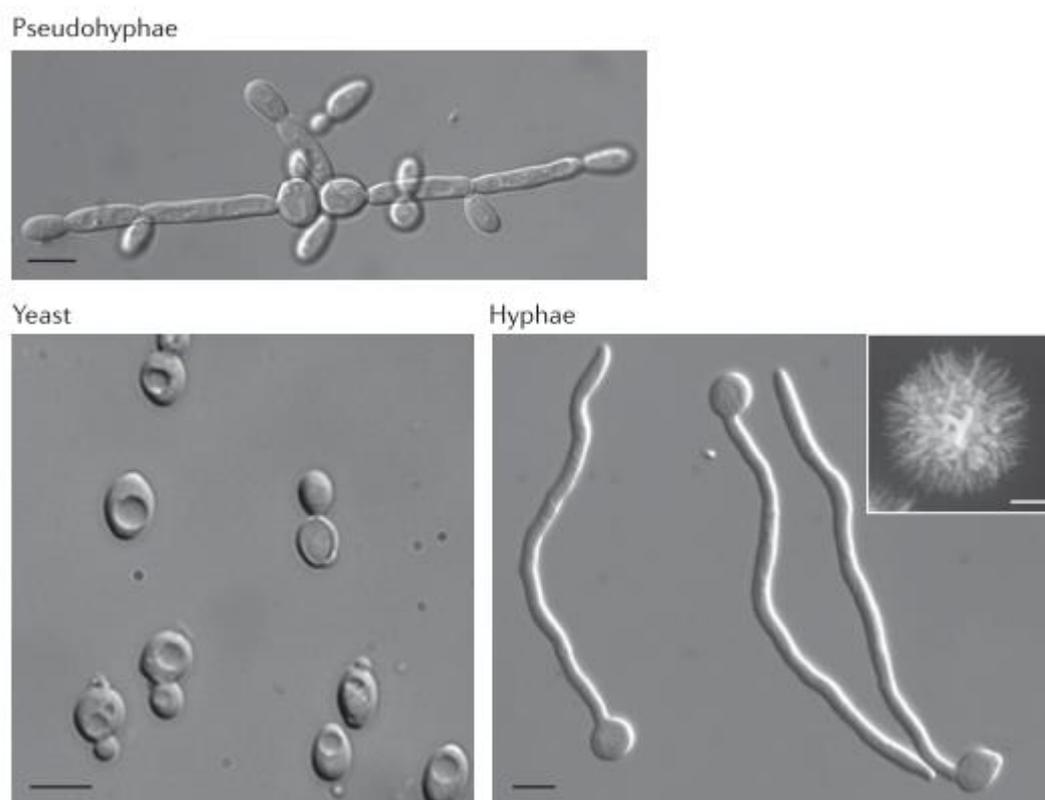


Figura 6. Morfología de levaduras, fomas de hifas y pseudohifas.

Fuente: (Sudbery, 2011)

La presencia de levaduras e hifas otorga la virulencia a estos microorganismos, dado que la forma hifal invasiva permite al microorganismo evitar a los fagocitos y dirigirse a los vasos sanguíneos; mientras que las células de levaduras son importantes para dispersarse en flujo sanguíneo (Zdanavičienė et al., 2017).

2.7.3. Secreción de hidrolasas

Las hifas del género *Candida* producen hidrolasas en el proceso de adherencia, lo cual facilita la penetración activa (Zdanavičienė et al., 2017). Las hidrolasas son responsables del inicio de los procesos digestivos y fisiológicos. Su nombre se debe a que usan agua para degradar sustratos como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos o grasas y carbohidratos o azúcares (Dennis, 2015). Destacando como principales:

- **Proteasas:** son enzimas destructivas necesarias para el catabolismo de otras proteínas y la generación de aminoácidos en organismos primitivos. Catalizan reacciones altamente específicas de procesamiento proteolítico (López-Otín & Bond, 2008). Su producción mejora la habilidad del microorganismo para colonizar y penetrar tejidos hospederos. Ayuda a evadir el sistema inmune del huésped degradando proteínas fundamentales en la defensa del huésped, como las inmunoglobulinas y citoquinas (Serda Kantarciolu & Yücel, 2002).
- **Fosfolipasas:** catalizan la hidrólisis de ésteres de acilo y ésteres de fosfato en fosfolípidos (Dennis, 2015). Estas hidrolasas pueden jugar un rol activo en la invasión del tejido hospedero durante una Candidiasis, mediante la disrupción de la membrana celular epitelial, promoviendo el ingreso de la punta de las hifas al citoplasma (Ghannoum, 2000; Serda Kantarciolu & Yücel, 2002).

2.7.4. Formación de *biofilm*

El género *Candida* produce *biofilms* altamente estructurados que se encuentra formado por múltiples tipos de células, por ejemplo: células en forma de levaduras, células ovaladas pseudohifales y células hifales cilíndricas; agrupadas en una matriz extracelular (Nobile & Johnson, 2016).

El conocimiento adquirido sobre la formación de *biofilms*, ha sido originado a partir de estudios que han sido caracterizados en sistemas *in vitro* e *in vivo*, conformado por cuatro fases de desarrollo (Gulati & Nobile, 2016) (Figura 6). *In vitro*, el estrato basal del *biofilm* se desarrolla por células de levadura a partir de las cuales se forman células filamentosas. Mientras que *in vivo*, la estructura del *biofilm* es más irregular, conformado de células filamentosas, levaduras y una matriz extracelular con células inmunes del huésped (Zdanavičienė et al., 2017).

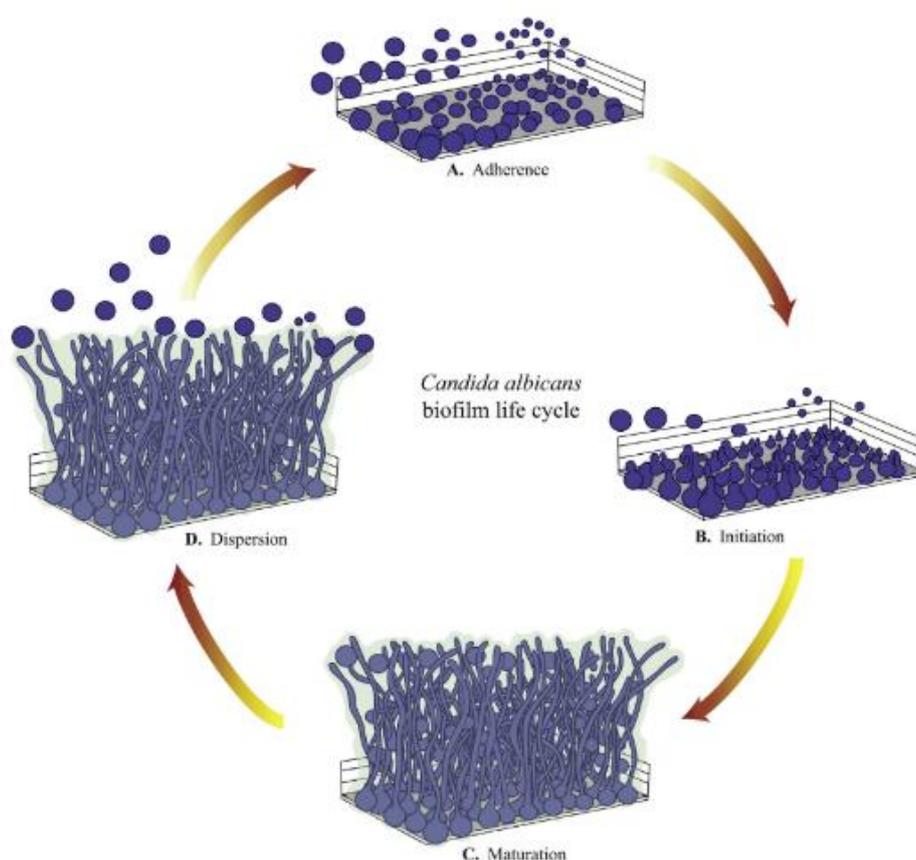


Figura 7. Ciclo de vida del *biofilm* de *C. albicans*. (A) Adherencia de levaduras a la superficie. (B) Inicio de la formación de *biofilm*, teniendo la proliferación de células a la forma de capa basal de células adherentes. (C) Maduración del *biofilm*, donde se desarrollan capas complejas de células polimórficas y se agrupan en una matriz extracelular. (D) Dispersión, donde las levaduras salen del *biofilm* maduro a colonizar nuevos sitios.

Fuente: (Gulati & Nobile, 2016)

Cuando se forma el *biofilm* en un dispositivo médico implantado como catéteres venosos, marcadores de paso, válvulas mecánicas cardíacas, entre otros; el *biofilm* tiene la capacidad de generar infecciones diseminadas al torrente sanguíneo y dirigir infecciones sistémicas invasivas de tejidos u órganos (Nobile & Johnson, 2016).

2.8. Caracterización de *Candida sp.*

Se puede identificar las diferentes especies del género *Candida* mediante métodos sencillos o complejos, entre los más importantes se detallan:

2.8.1. Criterios morfológicos

- Criterios macroscópicos: centrados en el aspecto de las colonias en medios de cultivo con diferentes nutrientes, tales como agares: Mycosel, Cled, Sabouraud, Harina de Maíz-Tween 80, sangre, chocolate, entre otros (Sicilia & Cuesta, 2007). Ciertos medios están fundamentados en la detección de la actividad enzimática de las levaduras con la ayuda de la hidrólisis de un sustrato cromogénico dado por su indicador enzimático (Mathur et al., 2012), entre los cuales se usan: CHROMagar®, Cromogen Albicans®, Candida ID®, entre otros.
- Prueba de tubo germinal: detecta la capacidad de producción de un tubo germinativo de las especies de *Candida* en suero u otro tipo de medios. Dicho tubo germinal es un crecimiento filamentosos que surge del blasconidio (Deorukhkar, Saini, & Jadhav, 2012).
- Tinciones: para el estudio microscópico de levaduras se emplean tinciones por el bajo costo y facilidad de empleo de los reactivos involucrados. Se emplean tinciones simples como la tinción Gram, dado que las levaduras se comportan como bacterias

Gram positivas, evidenciando la formación de blastosporas, artrosporas, hifas, pseudohifas o endosporas (Sicilia & Cuesta, 2007).

2.8.2. Estudios bioquímicos

- Auxonograma: basado en la asimilación de azúcares y nitratos de potasio usando como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente (Giusiano, 2009).
- Zimograma: es un medio líquido suplementado con diversos azúcares con un indicador de color, evidenciando la presencia de burbujas en la campana de Durham por la degradación anaerobia (Guerrero & Villacis, 2016).

2.8.3. Pruebas de identificación rápida

Se emplean un conjunto de pruebas bioquímicas con la cualidad para asimilar carbohidratos, prueba representada principalmente por los kits API 20C y API 32C (Neppelenbroek et al., 2013).

2.8.4. Métodos automatizados

En la actualidad se emplean el *Sistema Vitek2* y *Rapid Yeast Identification Panel MicroScan* en laboratorios especializados debido al elevado costo de su adquisición. Estos métodos emplean ensayos de asimilación de carbohidratos y otras reacciones bioquímicas que entregan resultados en periodos de 24 a 48 horas (Graf, Adam, Zill, & Go, 2000).

2.8.5. Métodos bioquímicos

Basados en la identificación rápida de especies del género *Candida* por la aglutinación de partículas empleando un anticuerpo monoclonal específico anti-manano realizada mediante la técnica ELISA en muestras de suero o plasma (Guerrero & Villacis, 2016; Sicilia & Cuesta, 2007).

2.8.6. Métodos moleculares

Las técnicas moleculares han demostrado ser altamente replicables y precisas. Estas técnicas se ven limitadas por el alto costo y requerimientos técnicos necesarios para su desarrollo en servicios de diagnóstico microbiológico. Para la identificación de las diferentes especies de *Candida* a nivel cuantitativo y/o cualitativo se han desarrollado PCR's anidadas, inmunoensayos con PCR, PCR en tiempo real, PCR multiplex, entre otros (Chandrakant Deorukhkar & Roushani, 2018; Neppelenbroek et al., 2013).

2.8.7. Métodos semicuantitativos de estudio de *biofilmes*

- XTT: es un ensayo de reducción mediante la sal 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfófenil)-5-[(fénilamino) carbonil]-2H- hidróxido de tetrazolio (ATCC, 2011). Es un método colorimétrico basado en la reducción de sales de formazan del XTT por las deshidrogenasas mitocondriales de células de levaduras activas metabólicamente. La formación de formazan es medida por espectrofotetría (Hawser, Norris, & Jessup, 1998; Jin, Yip, Samaranayake, Yau, & Samaranayake, 2003; Gordon Ramage, Walle, Wickes, & Lo, 2001).
- Cristal violeta: con esta técnica el *biofilm* es teñido con cristal violeta y desteñido con una solución de decoloración, medida por espectrofotetría. Este método tiñe todas las células que conforman el *biofilm*, sin considerar su viabilidad (Jin et al., 2003).

2.8.8. Microscopía electrónica

Las técnicas de microscopía electrónica han permitido el reconocimiento de varios detalles de la taxonomía de los microorganismos (Guarro et al., 1999).

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es usualmente empleada para analizar características microestructurales de cuerpos sólidos en superficies, generando una imagen

tridimensional tomando en consideración profundidad y campo. En la actualidad, se ha empleado SEM para evaluar eventos relacionados con la patogenicidad de aislados clínicos, tomando en consideración adherencia a superficies, capacidad de invasión, morfogénesis y alteraciones morfológicas (Furlaneto et al., 2012).

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) han demostrado significancia en la distinción de secciones cruzadas, capas de células de levaduras, diferencias entre ascomicetos y basidomicetos, entre otros (Guarro et al., 1999).

2.8.9. Microscopía confocal

Es una técnica importante para el análisis de *biofilms* producidos por bacterias y hongos en la actualidad, debido a que permite la visualización de *biofilms* hidratados y no perturbados (Chandra et al., 2001; Jin et al., 2005). La aplicación de combinaciones de fluoróforos permiten el marcaje de zonas de interés de la matriz del *biofilm* de acuerdo al objetivo de las investigaciones (Gonçalves, Del Bel Cury, de Vasconcellos, Cury, & da Silva, 2015). Entre los fluoróforos más empleados para la observación de *biofilms* se conocen:

- Concalvín A – Alexa Fluor 488 (ConA): permite unirse a residuos de manosa y glucosa de los polisacáridos de la pared celular, emitiendo fluorescencia verde. Su espectro de fluorescencia muestra excitación a 495 nm y emisión a 519 nm (Invitrogen Molecular Probes, 2006a).
- FUN-1: este fluoróforo aprovecha los mecanismos de procesamiento bioquímico endógeno normal que suelen permanecer bien conservados en especies de levaduras y el resto de hongos. La capacidad metabólica e integridad de la membrana plasmática de las células permite que el fluoróforo tiña estructuras intravacuolares de las células metabólicamente activas de un color tomate-rojo, mientras que las

células que no presenten dicha actividad mantienen fluorescencia verde. Su espectro de fluorescencia muestra excitación a 488 nm y emisión en un rango de 510-560 nm para la fluorescencia verde y 560-610 nm para la fluorescencia tomate-roja (Molecular Probes, 2001).

- SYTO-9: es una molécula que cuenta con la capacidad para penetrar la pared celular fúngica fácilmente y tiñe las células con fluorescencia verde, basado en la integridad de la pared celular en lugar de la actividad metabólica de la célula. Su espectro de fluorescencia muestra excitación a 480 nm y emisión a 500 nm (Molecular Probes, 2014).
- Ioduro de propidio: funciona como una membrana impermeable que generalmente es excluido de células viables, por lo que es usado para identificar células muertas en una población. Su espectro de fluorescencia muestra excitación a 535 nm y emisión a 617 nm (Invitrogen Molecular Probes, 2006b).

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Participantes

El trabajo de titulación se ejecutó en el Laboratorio de Nanomedicina y Nanobiología (Biotecnología Humana) de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, bajo la tutela de Patricia Jiménez Arias PhD., y Marcelo Grijalva MD. PhD. El personal de laboratorio del Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT) de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, bajo la tutela de Luis Cumbal PhD., y Alexis Debut PhD.

El personal de laboratorio del Área de Bacteriología del Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM). El personal de laboratorio del Área de Microbiología del Hospital Eugenio Espejo (HEE).

3.2. Zona de estudio

El trabajo de titulación se ejecutó en el Laboratorio de Nanomedicina y Nanobiología (Biotecnología Humana) y Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT) de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicado en la Av. General Rumiñahui y Ambato, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, Latitud 0°19'04" S, Longitud 78°26'43" O, Altura elipsoidal 2489 (msnm).

Los aislados se recolectaron del Área de Bacteriología del Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) ubicado en la Avenida Universitaria y Portoviejo, Latitud: 0°12'19.141", Longitud: 78°30'16.818", Altura elipsoidal: 2821 m, y del Área de Microbiología del Hospital Eugenio Espejo (HEE) ubicado en la Avenida Gran Colombia y Yaguachi, Latitud: 0°12'52.987", Longitud: 78°29'53.508", Altura elipsoidal: 2824 m.

Para la identificación de los aislados se utilizó el servicio de los Laboratorios de NETLAB S.A., ubicados en la Av. Mariana de Jesús y Pasaje A, Latitud 0°11'15" S, Longitud 78°30'12" O, Altura elipsoidal 2897 (msnm).

3.3. Recolección de aislados clínicos

3.4.1. Aislados clínicos de micosis diseminadas

Se seleccionaron hemocultivos con crecimiento de hongos de los hospitales de referencia, los cuales fueron recolectados en viales con 1.5 mL de medio de cultivo Agar Triptosa de Soya (TSA), preparados y esterilizados según las indicaciones del proveedor. Los viales se rotularon según la nomenclatura manejada por cada hospital.

Se recolectaron 68 aislados provenientes de pacientes con micosis diseminadas de los hospitales Carlos Andrade Marín (HCAM) y Eugenio Espejo (HEE), muestras correspondientes al periodo de noviembre -2015 a enero -2017. Los aislados clínicos de micosis invasivas provienen de la colección de aislados del proyecto SENESCYT/FWO "Resistencia a carbapenémicos en Enterobacteriaceae: valor diagnóstico del perfilamiento de small RNAs" realizado en el Laboratorio de Nanomedicina & Nanobiología (Biotecnología Humana) de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Los datos de los aislados se muestran en la Tabla 3.

3.4.2. Aislados clínicos de infecciones locales

Se seleccionaron placas de CHROMagar con crecimiento de hongos inoculadas por parte del personal del laboratorio de ambos hospitales, los cuales fueron recolectados en viales con 1.5 mL de medio de cultivo Agar Extracto de Levadura Peptona Dextrosa (YPD), preparados y esterilizados según las indicaciones del proveedor. Los viales se rotularon según la nomenclatura manejada por cada hospital.

Se recolectaron 68 aislados clínicos de pacientes con infecciones locales de los hospitales de referencia, muestras correspondientes al periodo de Junio -2017 a Agosto -2017. Se tomaron las muestras principalmente de las regiones de la cavidad bucal y secreciones faríngeas. Los datos de los aislados se muestran en la Tabla 3.

3.4. Criopreservación de aislados clínicos

Los aislados clínicos provenientes de los hospitales fueron transferidos a caldo YPD para su reactivación y enriquecimiento durante 24 horas a 37°C. Se tomó 10 uL de medio y se lo transfirió a placas Petri con agar YPD, procurando un cultivo por estriado para la formación de colonias durante 24 horas a 37°C. Una vez obtenidas las colonias puras, se colocó una asada de agar y se lo transfirió nuevamente a caldo YPD por 24 horas a 37°C. A continuación, se transfirió 500 uL de medio inoculado a viales previamente esterilizados con 500 uL de glicerol al 50%. Finalmente se almacenó los 136 viales en ultracongelación a -80°C.

3.5. Identificación de aislados clínicos

A partir de los antibiogramas obtenidos de los hospitales para cada aislado clínico se generó una base de datos con la identificación previa de cada vial. Para la confirmación de especies bajo criterios bioquímicos y microbiológicos específicos, se contrató el servicio otorgado por NETLAB S.A., para los 136 aislados clínicos.

Se enviaron 136 placas de Petri conteniendo cada aislado de la colección respectivamente, procurando la formación de colonias. Se obtuvo 136 antibiogramas resultantes del servicio contratado respecto a cada aislado de la colección enviado y se actualizó la base de datos.

3.6. Cultivo de aislados clínicos de trabajo

Se activó las cepas empleadas para cada ensayo tomando 40 uL del vial criopreservado, colocándolo en tubos Falcón con 5 mL de caldo YPD y se incubó por 24 horas a 37°C. Se

tomó 10 uL de medio y se lo transfirió a placas Petri con agar YPD y se incubó por 24 horas. Se realizó un pase de una colonia nuevamente a 5 mL de caldo YPD y se incubó durante 18 horas. Se ajustó el inóculo inicial a 1×10^6 células/mL.

3.7. Curva de crecimiento

Se emplearon dos aislados de cada tipo de infección (Infección local y Micosis sistémica) elegidos aleatoriamente. Se colocó 10 mL de caldo inoculado con 90 mL de caldo YPD fresco (relación 1:10) en un Erlenmeyer y se incubó a 37°C. Para cada muestreo, se separó 10 mL de caldo inoculado del frasco madre y transfirió 2 mL a una cubeta de plástico. Las muestras fueron tomadas a 0, 2, 4, 8 y cada 4 horas hasta alcanzar las 30 horas de inóculo. La lectura de las absorbancias se realizó a 600 nm, cuyas lecturas fueron recopiladas y representadas gráficamente (Mahazar, Zakuan, Norhayati, MeorHussin, & Rukayadi, 2017; Nordin, Wan Harun, & Abdul Razak, 2013).

3.8. Formación de *biofilm*

Se usó el método modificado de Ramage, et al. (2001) para inducir la formación de *biofilm*. Se tomó 1 mL de la suspensión celular ajustada y se centrifugó a 5000 RPM durante 6 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de medio RPMI 1640 conteniendo L-glutamina (tamponado con MOPS 0.165 M a pH 7.0) sin bicarbonato. Se colocó la suspensión en la placa de cultivo celular y se incubó por 48 horas a 37°C.

3.9. Caracterización cualitativa del *biofilm* mediante microscopía confocal

Se tomó un aislado de cada tipo de infección. Se realizaron dos repeticiones por aislado. Se colocaron 200 uL de la suspensión celular estandarizada (5×10^6 levaduras/mL en RPMI 1640) más 1 mL de RPMI 1640 fresco en placas de Petri fondo de vidrio. Se incubó la placa por 48 horas a 37°C. Se descartó el sobrenadante y lavó con 200 uL de PBS estéril. Se añadió 1 mL

del combinado de ConA (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en PBS (Kagan et al., 2014). Se incubó por 30 minutos a 37°C. Se observaron las muestras en el microscopio confocal Olympus Fluoview FV1200.

3.10. Caracterización cualitativa del *biofilm* mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se tomaron ocho aislados de cada tipo de infección. Se realizaron dos repeticiones por aislado. El *biofilm* fue formado sobre discos cubreobjetos en placas de microtitulación estériles de 12 pocillos. Para la fase de fijación, se modificó la metodología de Melo, et al. (2011), en la cual se mezcló los discos con 1 mL de glutaraldehído al 2% tamponado a pH 7.2 con cacodilato de sodio 0.1 M y se mantuvo la placa por 24 horas a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se añadió tetraóxido de osmio al 1% en buffer DPBS por 1 hora. Seguido, se trató las muestras con ácido tánico al 1% por 1 hora. La deshidratación se llevó a cabo con lavados consecutivos de etanol al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 99% de 1 hora cada uno. Se liofilizaron las muestras por 24 horas. Para la posterior observación de las muestras, se recubrió con oro los discos cubreobjetos y se examinaron las muestras en el microscopio electrónico de barrido ZEISS DSM-960A.

3.11. Caracterización volumétrica del *biofilm* mediante el ensayo de Cristal Violeta

Se emplearon los 136 aislados de la colección para este ensayo. Se realizaron cuatro repeticiones para cada uno. El *biofilm* fue formado en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos. Para retirar las células no adheridas se lavó cada pocillo con 200 μL de PBS después del periodo de incubación. Se dejó secar la placa por 20 minutos a 35°C. a continuación, se colocó 110 μL de la solución acuosa de cristal violeta al 0.4% por 45 minutos. Se descartó y lavo nuevamente cada pocillo con agua estéril cuatro veces. Inmediatamente se descoloró con 200 μL de etanol al 95% por 45 minutos. 100 μL de la solución descolorada de cada pocillo fueron transferidos a una nueva placa estéril. Se realizó la lectura de las absorbancias en el

lector de placas a 595 nm (Jin et al., 2003). Al existir una desviación estándar mayor al 10% entre las cuatro repeticiones para un determinado aislado, se repitió el ensayo.

3.12. Caracterización de la actividad metabólica del *biofilm* mediante el ensayo de XTT

Se emplearon los 136 aislados de la colección para este ensayo. Se realizaron cuatro repeticiones para cada uno. Se preparó la solución XTT-menadiona, añadiendo 1.5 mL de XTT 1mg/mL en PBS (filtrado por milipore 0.22 μm , almacenado a -70°C) a 300 μL de menadiona 0.4 mM en acetona (filtrada por milipore 0.22 μm inmediatamente antes de cada ensayo) (Jin et al., 2003). El *biofilm* fue formado en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos. Para retirar las células no adheridas se lavó cada pocillo con 200 μL de PBS después del periodo de incubación. A cada pocillo se le añadió 200 μL de PBS y 12 μL de solución XTT-menadiona. Se incubó la placa durante 3 horas a 37°C cubriendo la placa con papel aluminio. A continuación, se transfirió 100 μL de la solución de reacción a una nueva placa de microtitulación. Se realizó la lectura de las absorbancias en el lector de placas a 490 nm (Melo et al., 2011). Al existir una desviación estándar mayor al 10% entre las cuatro repeticiones para un determinado aislado, se repitió el ensayo.

3.13. Evaluación de la actividad fosfolipasa

Se emplearon los 136 aislados de la colección para este ensayo. Se realizaron dos repeticiones para cada uno. Se ajustó la suspensión celular a un total de 1×10^6 células/mL. Se preparó placas Petri de agar SDA-YEA (medio Sabouraud 6.5%, Emulsión estéril de yema de huevo 8%, NaCl 1M, CaCl₂ 5mM). Se activaron los aislados en caldo YPD y se incubó por 18 horas a 37°C . Se colocó 1 μL de la suspensión en el centro de las placas de SDA-YEA y se las incubó por 72 horas a 37°C (Echeverría, Durante, & Arechavala, 2002). Se midieron los diámetros de las colonias y halos enzimáticos de cada aislado de acuerdo al método

establecido por Price, et al. (1982), ejemplificado en la figura 8. Se calculó el coeficiente de actividad enzimática con los datos recopilados.

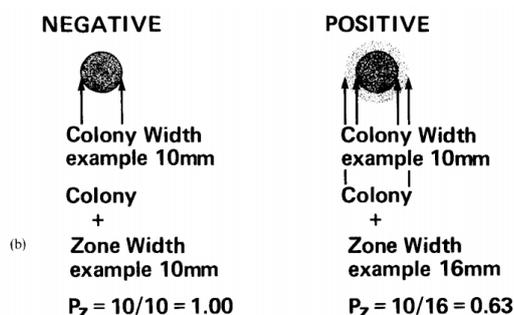


Figura 8. Determinación del índice de la actividad enzimática (P_z).

Fuente: (Price et al., 1982)

3.14. Evaluación de la actividad proteasa

Se emplearon los 136 aislados de la colección para este ensayo. Se realizaron dos repeticiones para cada uno. Se ajustó la suspensión celular a un total de 1×10^6 células/mL. Se preparó placas Petri de agar YCB-BSA (Base de Carbón de Levadura 1.17%, Suero albúmina bovina 0.2%, Agar 2%). Se activaron los aislados en caldo YPD y se incubó por 18 horas a 37°C. Se colocó 1 uL de la suspensión en el centro de las placas de YCB-BSA y se las incubó por 72 horas a 37°C (Ramos et al., 2015). Se midieron los diámetros de las colonias y halos enzimáticos de cada aislado de acuerdo al método establecido por Price, et al. (1982), ejemplificado en la figura 8. Se calculó el coeficiente de actividad enzimática con los datos recopilados.

3.15. Cálculo del coeficiente de actividad enzimática (P_z)

El coeficiente se calculó mediante la razón entre el diámetro de crecimiento de la colonia y el diámetro de la zona de producción enzimática. Los resultados pueden tomar valores de entre cero a uno, siendo los cercanos a cero, los niveles máximos de actividad enzimática y,

por el contrario, los más cercanos a uno, indican un nivel bajo de actividad enzimática. Cuando el índice Pz es igual 1, indica que no se evidencia actividad enzimática, como se evidencia en la figura 8.

3.16. Análisis estadístico

Se realizó una prueba t de Student para comparación de medias, tomando en consideración los resultados cuantitativos y semicuantitativos de los ensayos ejecutados. Se empleó el programa estadístico INFOSSTAT para el análisis pertinente.

3.17. Gráficos

Para el desarrollo de esquemas y gráficos se empleó los softwares RStudio, GraphPad Prism 7.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Colección de aislados clínicos

La confirmación de identificación a nivel de especies de los aislados clínicos fue realizada por el servicio brindado por NETLAB S.A. (Tabla 3), resultando una variación en 35 aislados (25.7%) con respecto a la identificación inicial otorgada por los hospitales involucrados, de este modo, se aceptó y continuó la investigación con la identificación por parte de NETLAB S.A.

Se evidenció que *C. albicans* es el agente etiológico más común hallado en candidiasis (M. N. Souza, Ortiz, Mello, & Oliveira, 2015), alcanzando una prevalencia del 63.97% durante su identificación, mientras que los aislados de *Candida no albicans* más frecuentes como *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilopsis* llegaron a conformar el 8.82, 8.82 y 8.09% de frecuencia, respectivamente. Por otro lado, los aislados con menor proporción como *C. ciferrii*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* y *C. guilliermondii* alcanzaron una frecuencia del 3.68, 3.68, 1.47 y 1.47% de la población de estudio, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3.

Identificación fenotípica de aislados clínicos

Especie	Prevalencia
<i>Candida albicans</i>	87 (63,97%)
<i>Candida no albicans</i>	
<i>Candida tropicalis</i>	12 (8,82%)
<i>Candida glabrata</i>	12 (8,82%)
<i>Candida krusei</i>	2 (1,47%)
<i>Candida guilliermondii</i>	2 (1,47%)
<i>Candida ciferrii</i>	5 (3,68%)
<i>Candida lusitaniae</i>	5 (3,68%)
<i>Candida parapsilopsis</i>	11 (8,09%)
Total	136 (100%)

Se recopilaron un total de 136 aislados clínicos, los cuales fueron separados según el tipo de infección (Tabla 4). Se procuró mantener una población uniforme respecto a los hospitales de proveniencia (68 aislados por hospital). Dichos aislados fueron criopreservados y mantenidos a -80°C .

Tabla 4.

Detalle de aislados clínicos recopilados según especie y tipo de infección.

Especie	Tipo de infección	
	Infección local	Micosis sistémica
<i>Candida albicans</i>	54 (79.41%)	33 (48.53%)
<i>Candida no albicans</i>		
<i>Candida tropicalis</i>	2 (2.94%)	10 (14.71%)
<i>Candida glabrata</i>	5 (7.35%)	7 (10.29%)
<i>Candida krusei</i>	0 (0%)	2 (1.47%)
<i>Candida guilliermondii</i>	1 (1.47%)	1 (1.47%)
<i>Candida ciferrii</i>	2 (2.94%)	3 (4.41%)
<i>Candida lusitaniae</i>	4 (5.88%)	1 (1.47%)
<i>Candida parapsilosis</i>	0 (0%)	11 (16.18%)
Total	68	68

4.2. Curva de crecimiento

Se tabularon las absorbancias obtenidas durante el tiempo de crecimiento de los hongos para cada tipo de infección por separado (Figuras 9 y 10). Los aislados seleccionados aleatoriamente correspondieron a *Candida albicans* y *Candida glabrata* para micosis sistémicas, y *Candida ciferrii* y *Candida lusitaniae* para infecciones locales. Las curvas sigmoidales exhibieron claramente las fases lag, log y estacionaria. No se evidenciaron diferencias significativas entre el crecimiento de los aislados con respecto al tipo de infección de proveniencia.

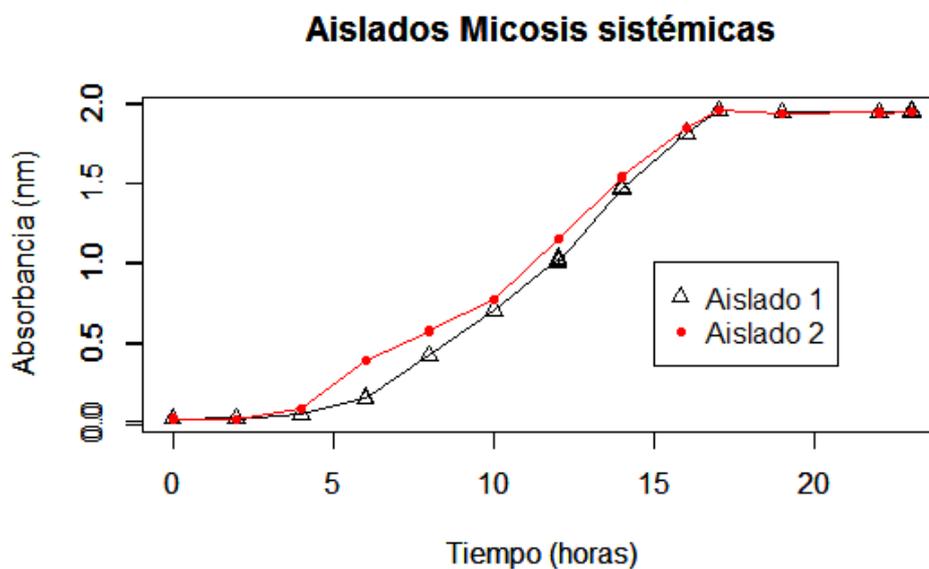


Figura 9. Curva de crecimiento de aislados clínicos de Micosis sistémicas escogidos aleatoriamente de la colección de estudio. Aislado 1: *Candida albicans*. Aislado 2: *Candida glabrata*.

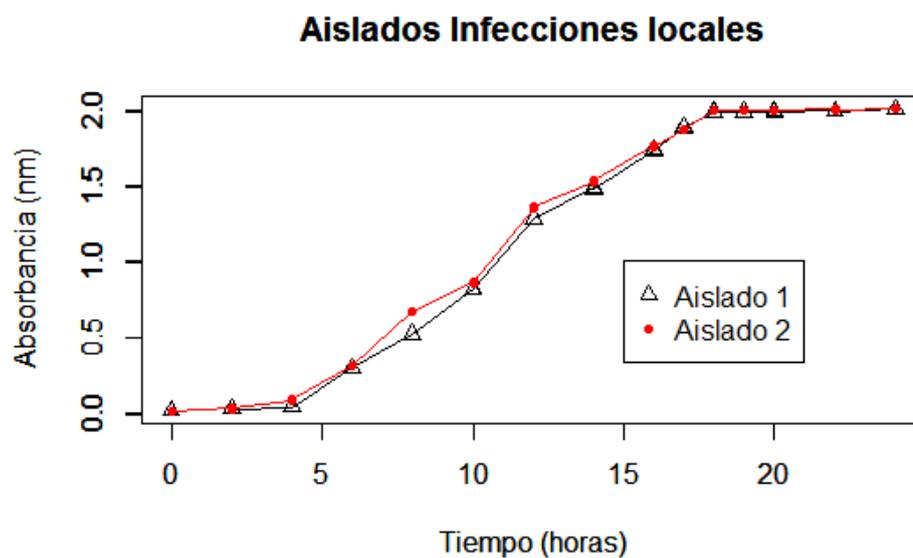


Figura 10. Curva de crecimiento de aislados clínicos de Infecciones locales escogidos aleatoriamente de la colección de estudio. Aislado 1: *Candida ciferrii*. Aislado 2: *Candida lusitaniae*.

4.3. Caracterización cualitativa del *biofilm* mediante microscopía confocal

Se tomó en cuenta un aislado por tipo de infección que pertenezcan a la misma especie, es decir, un aislado de *C. albicans* por micosis sistémica y por infección local, con el fin de evidenciar si existen diferencias en la estructura del *biofilm*. En las Figuras 11 y 12, se muestran capturas de la observación en el microscopio confocal, donde se observa la unión del fluoróforo conjugado Concavalin A – Alexa Fluor 488 (ConA) a residuos de manosa y glucosa de los polisacáridos de la pared celular con fluorescencia verde.

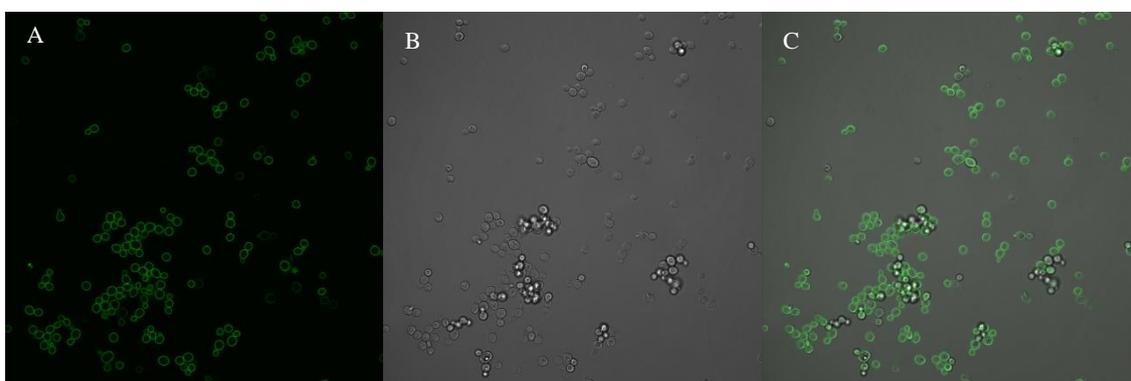


Figura 11. Imágenes de microscopía confocal del crecimiento del *biofilm* del aislado de *C. albicans* correspondiente al grupo de micosis sistémicas. (A) *Biofilm* marcado con el fluoróforo ConA (25 ug/mL), (B) imagen de contraste y (C) superposición de imágenes A y B. Magnificación de 60X.

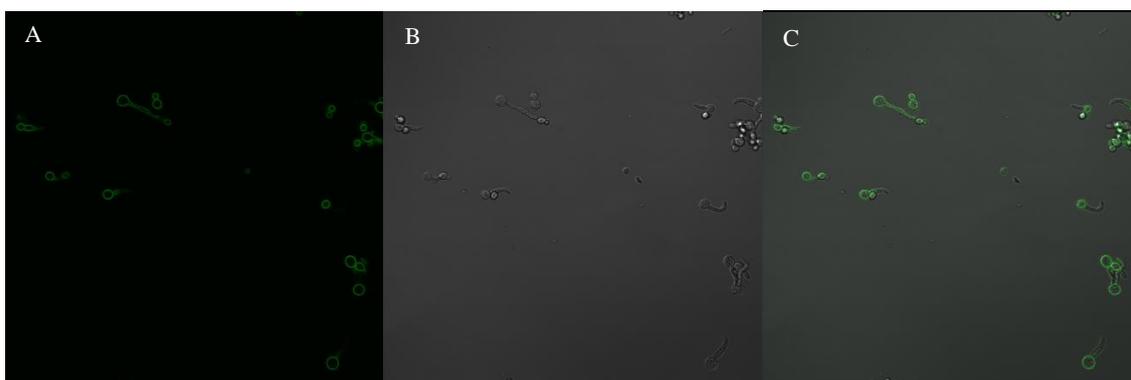


Figura 12. Imágenes de microscopía confocal del crecimiento del *biofilm* del aislado de *C. albicans* correspondiente al grupo de infecciones locales. (A) *Biofilm* marcado con el fluoróforo ConA (25 ug/mL), (B) imagen de contraste y (C) superposición de imágenes A y B. Magnificación de 60X.

4.4. Caracterización cualitativa del *biofilm* mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se realizó la caracterización de seis aislados clínicos por tipo de infección, tomando en consideración los aislados con mayor formación volumétrica de *biofilm* (ensayo de cristal violeta) junto con su actividad metabólica (ensayo de XTT). En las figuras mostradas a continuación se comparan los *biofilms* formados por la misma especie de *Candida* provenientes de los diferentes tipos de infección:

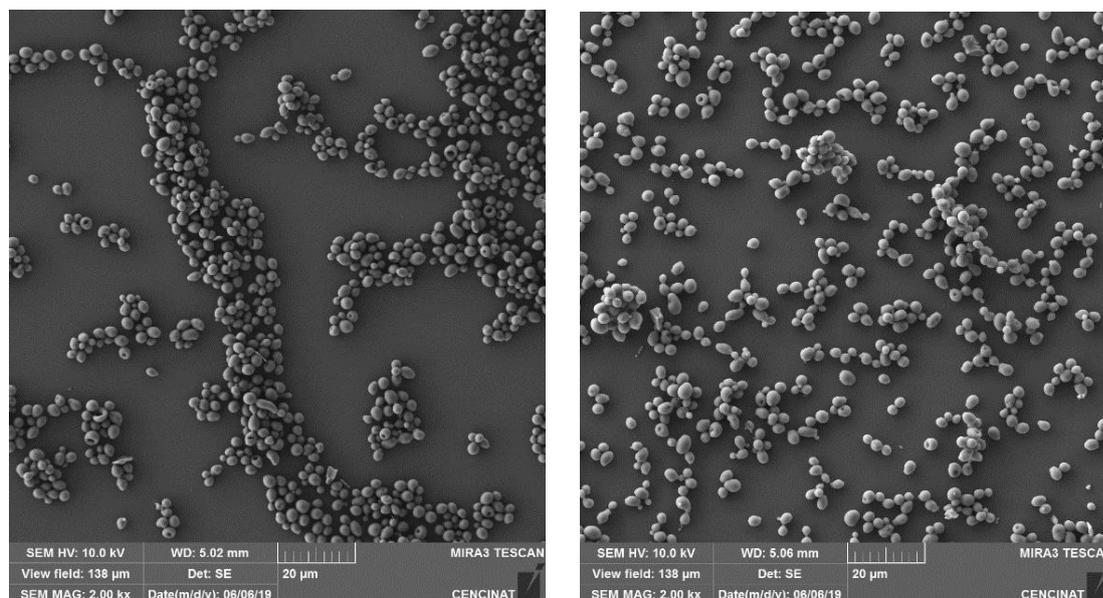


Figura 13. Microscopía electrónica de barrido de biofilms de *C. albicans* provenientes de (A) micosis sistémicas vs (B) infecciones locales.

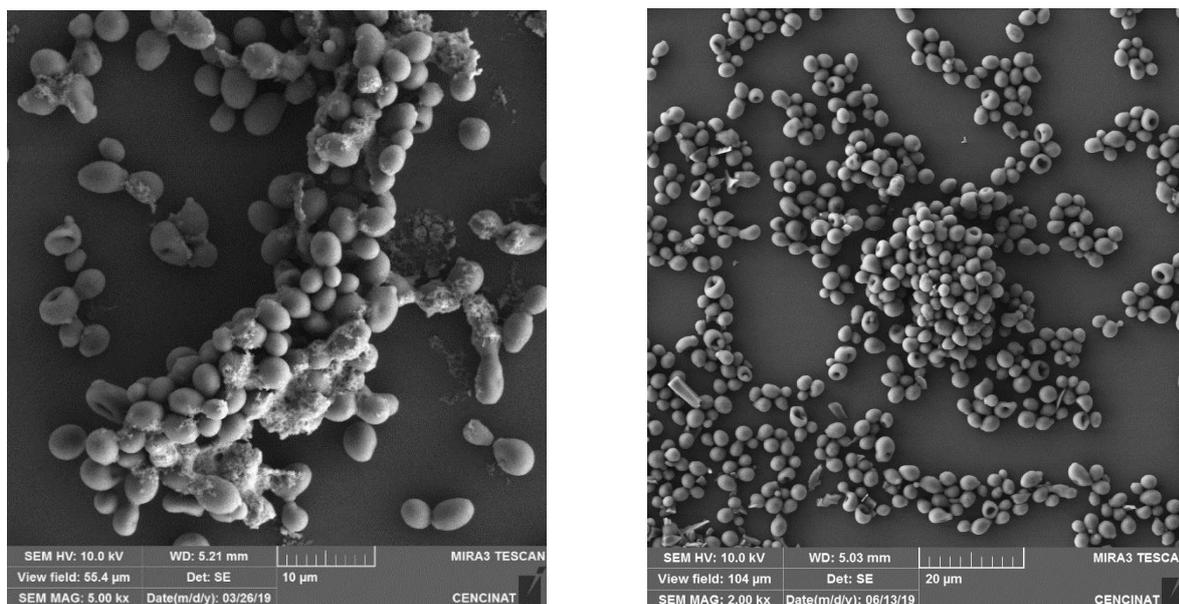


Figura 14. Microscopía electrónica de barrido de *biofilms* de *C. ciferri* provenientes de (A) micosis sistémicas vs (B) infecciones locales.

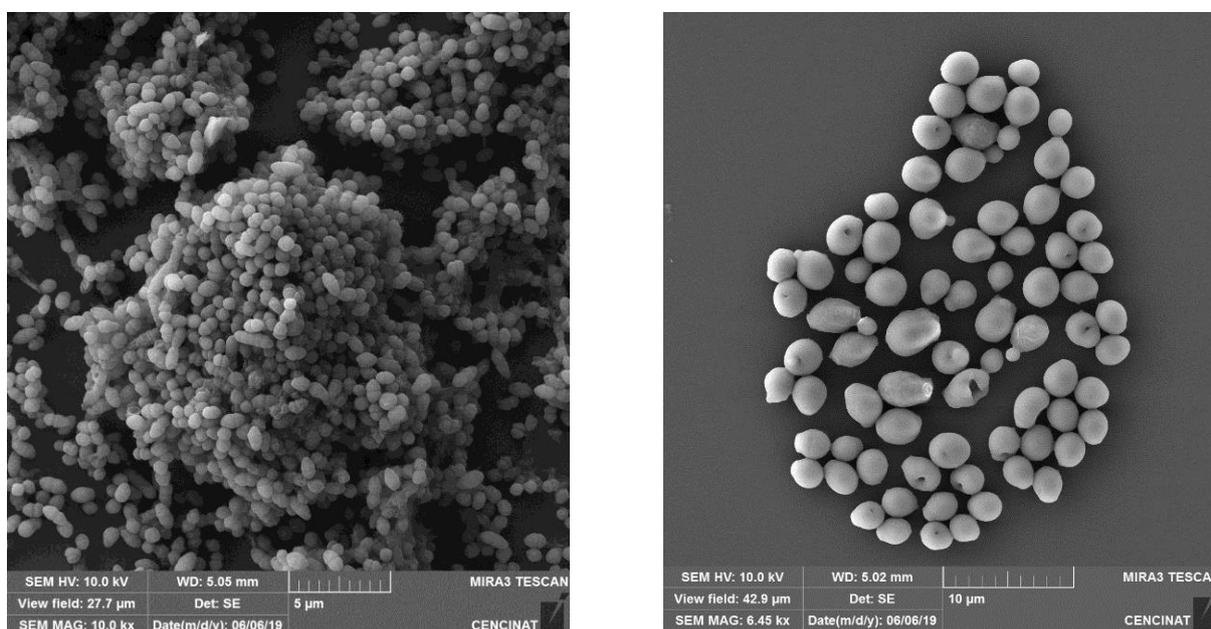


Figura 15. Microscopía electrónica de barrido de *biofilms* de *C. glabrata* provenientes de (A) micosis sistémicas vs (B) infecciones locales.

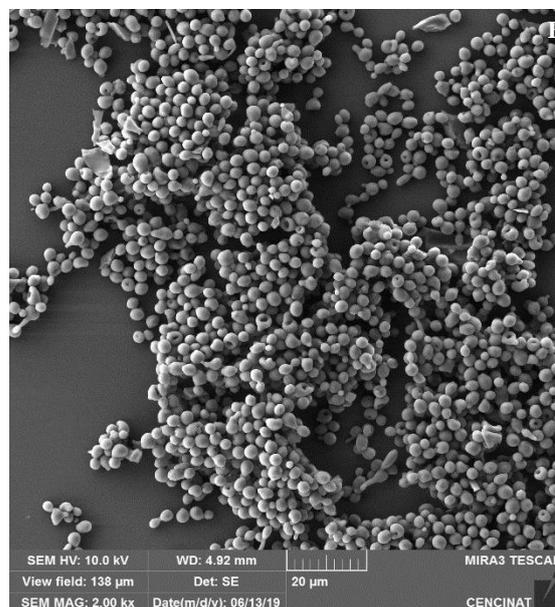
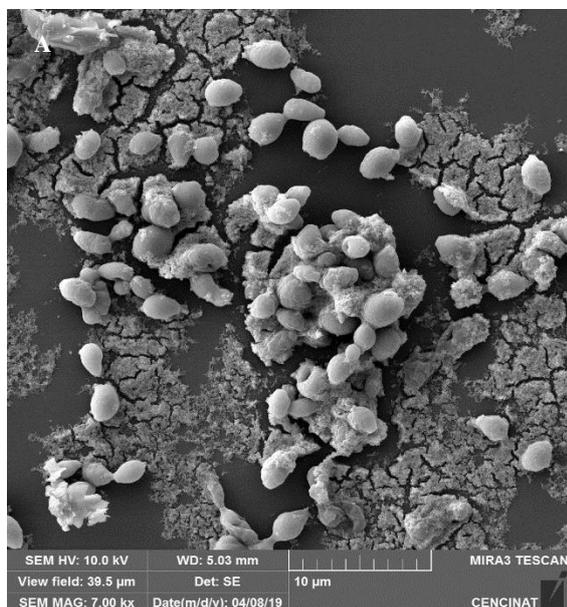


Figura 16. Microscopía electrónica de barrido de *biofilms* de *C. guillemontii* provenientes de (A) micosis sistémicas vs (B) infecciones locales.

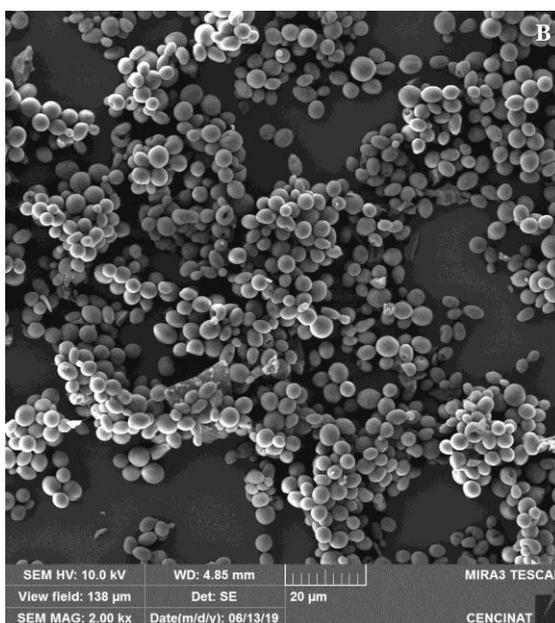
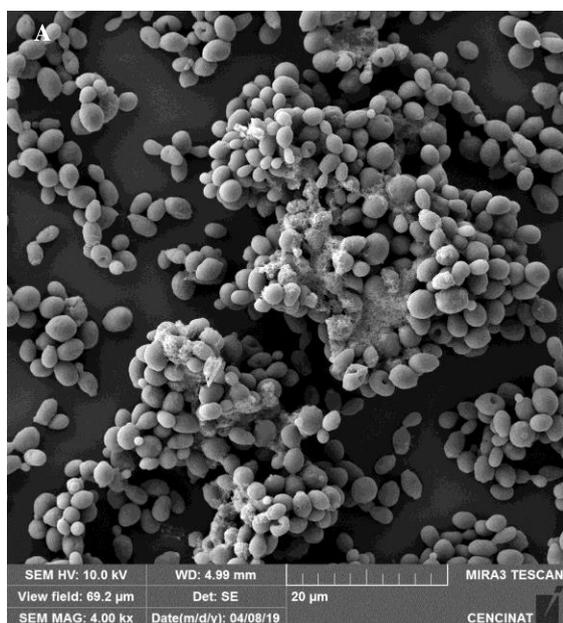


Figura 17. Microscopía electrónica de barrido de *biofilms* de *C. lusitaniae* provenientes de (A) micosis sistémicas vs (B) infecciones locales.

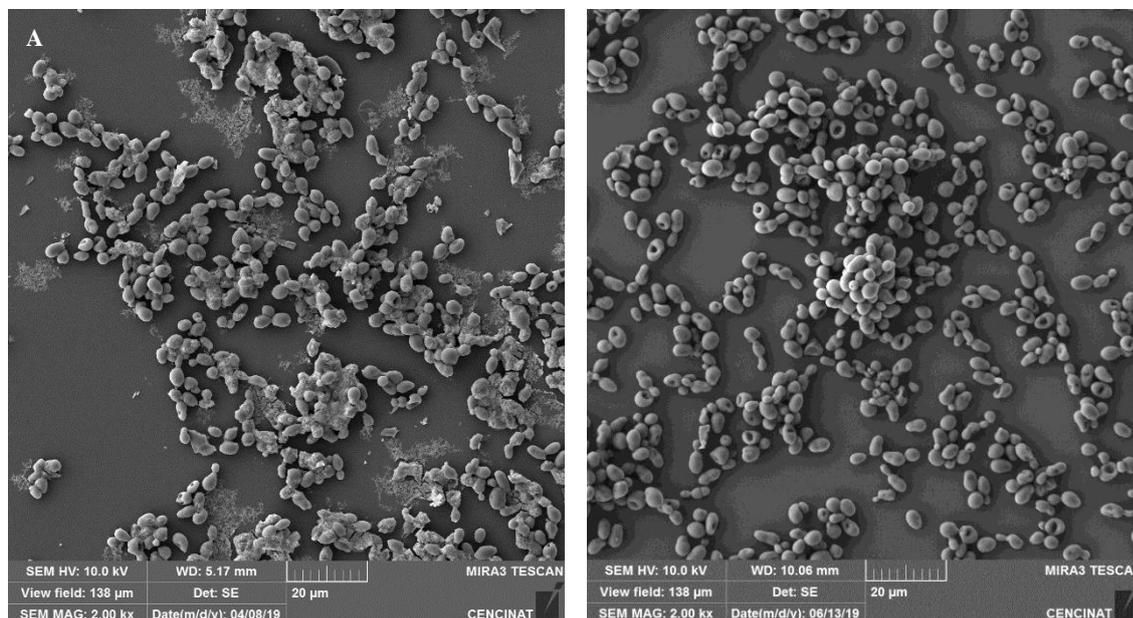


Figura 18. Microscopía electrónica de barrido de *biofilms* de *C. tropicalis* provenientes de (A) micosis sistémicas vs (B) infecciones locales.

4.5. Caracterización volumétrica del *biofilm* mediante el ensayo de Cristal Violeta

La tinción CV reveló un amplio rango de variación en la producción de *biofilm* entre los diferentes aislados. El análisis de la masa media del *biofilm* para los 136 aislados mediante el ensayo de cristal violeta se representa con las absorbancias de los ensayos a nivel de especie y según el tipo de infección (Figuras 19 y 20). A nivel de especie, *C. tropicalis* mostró poseer la mayor producción de *biofilm* sobre el resto de especies (Figura 19).

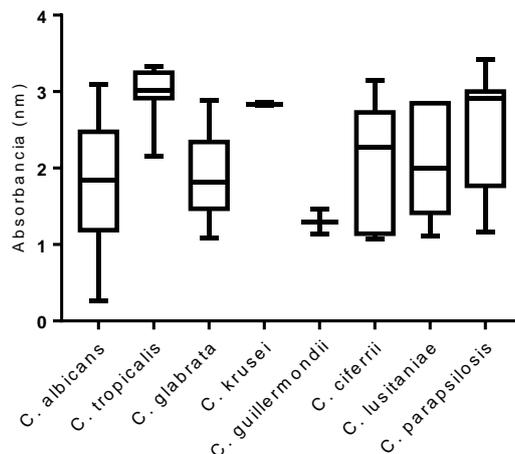


Figura 19. Comparación volumétrica de *biofilms* formados por las diferentes especies de *Candida* mediante el ensayo cristal violeta.

Por otro lado, se identificó una diferencia significativa ($p < 0.0001$) en la formación de *biofilm* entre los tipos de infección. La media del *biofilm* cuantificado para los aislados de infecciones sistémicas fue de 1.66 nm, mientras que para los de micosis sistémicas fue de 2.34 nm (Figura 20).

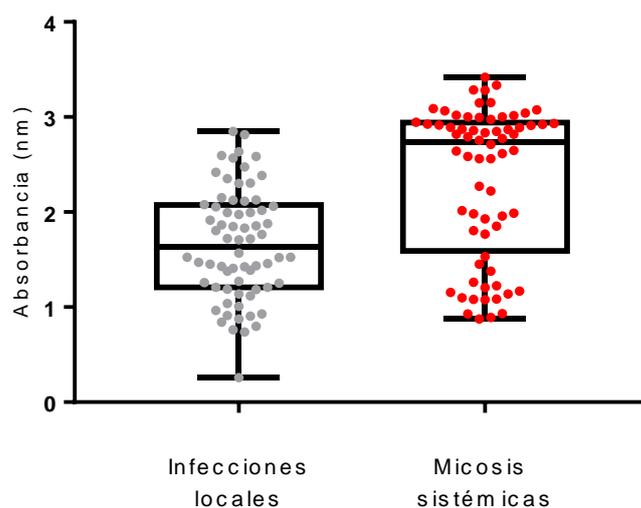


Figura 20. Comparación volumétrica de *biofilms* formados por los aislados con respecto al tipo de infección mediante el ensayo del cristal violeta.

4.6. Caracterización de la actividad metabólica del *biofilm* mediante el ensayo de XTT

La actividad metabólica del *biofilm* fue cuantificada para los 136 aislados mediante el ensayo XTT, en el cual se analizaron las absorbancias de los ensayos a nivel de especie y según el tipo de infección como se representa en las Figuras 21 y 22, respectivamente. A nivel de especie, se observó una alta actividad metabólica perteneciente a los aislados de *C. glabrata*, seguido de *C. parapsilosis* y *C. albicans* (Figura 21).

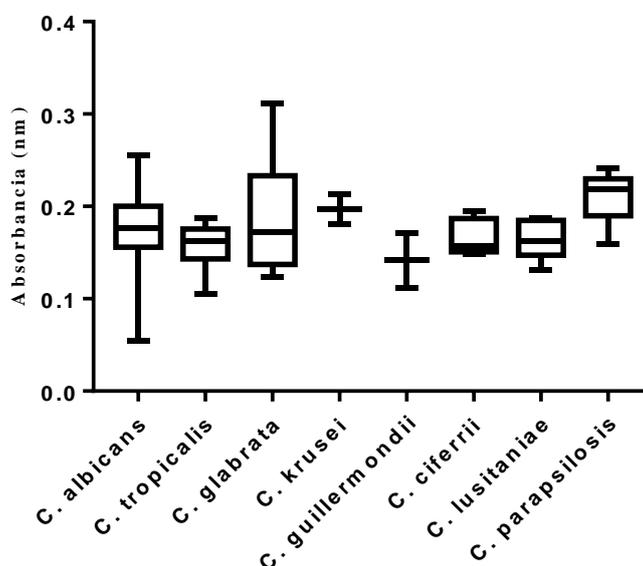


Figura 21. Comparación de la actividad metabólica de los *biofilms* formados por las diferentes especies de *Candida* mediante el ensayo de XTT.

Tomando en consideración el tipo de infección, la actividad metabólica producida por los aislados de micosis sistémicas fue mayor a la de las infecciones locales, evidenciando una diferencia significativa ($p < 0.0001$). Obteniendo una media de 0.19 nm para los aislados de micosis sistémicas y 0.16 nm para los de infecciones locales (Figura 22).

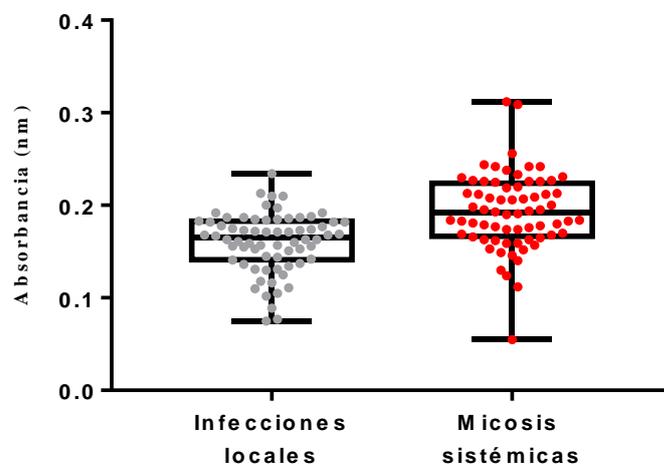


Figura 22. Comparación de la actividad metabólica de los *biofilms* formados por los aislados con respecto al tipo de infección mediante el ensayo de XTT.

4.7. Evaluación de la actividad fosfolipasa y proteasa

La actividad enzimática expresada por los aislados clínicos fue evaluada en los medios de cultivo SDA-YEA y YCB-BSA para las fosfolipasas y proteasas, respectivamente. Dichas actividades se detallan a nivel de especie y tipo de infección en las Tablas 5 y 6, respectivamente. *C. guilliermondii* demostró ser la especie con mayor producción de fosfolipasas y proteasas, resultado que posee baja confiabilidad, debido a que solo se obtuvieron dos aislados correspondientes a esta especie en toda la colección, y de ellos solo uno presentó producción enzimática. También se señala que los aislados de *C. tropicalis* y *C. krusei* no presentaron actividad fosfolipasa (Tabla 5).

La mayor producción de fosfolipasas en orden descendente fue dada por *C. guilliermondii* > *C. ciferrii* > *C. glabrata* > *C. albicans* > *C. lusitaniae* > *C. parapsilosis*. Mientras que para la producción de proteasas fue dada por *C. guilliermondii* > *C. albicans* > *C. lusitaniae* > *C. ciferrii* > *C. glabrata* > *C. tropicalis* > *C. parapsilosis* > *C. krusei*.

Tabla 5

Actividad fosfolipasa y proteasa de los aislados clínicos a nivel de especie.

Especie	Número	Fosfolipasa SDA-YEA			Proteasa YCB-BSA		
		Positivo	Porcentaje	Pz ± SD	Positivo	Porcentaje	Pz ± SD
<i>C. albicans</i>	87	78	89,66	0,635 ± 0,084	65	74,71	0,280 ± 0,109
<i>C. tropicalis</i>	12	-	-	-	12	100,00	0,536 ± 0,157
<i>C. glabrata</i>	12	2	16,67	0,617 ± 0,008	8	66,67	0,307 ± 0,12
<i>C. krusei</i>	2	-	-	-	2	100,00	0,6 ± 0
<i>C. guilliermondii</i>	2	1	50,00	0,558 ± 0	1	50,00	0,186 ± 0
<i>C. ciferrii</i>	5	4	80,00	0,604 ± 0,058	3	60,00	0,298 ± 0,175
<i>C. lusitaniae</i>	5	2	40,00	0,7 ± 0,064	5	100,00	0,295 ± 0,154
<i>C. parapsilosis</i>	11	1	9,09	0,786 ± 0	5	45,45	0,56 ± 0,148

Según el tipo de infección, se evidenció una mayor cantidad de aislados con actividad fosfolipasa y proteasa positiva por los aislados de infecciones locales (85.29 y 95.59%, respectivamente). Del mismo modo, resultó una mayor producción de fosfolipasas y proteasas por los aislados de infecciones locales, obteniendo un coeficiente de actividad enzimática de 0.622 ± 0.083 y 0.261 ± 0.078 , respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6

Actividad fosfolipasa y proteasa de los aislados clínicos según tipo de infección.

Tipo de infección	Número	Fosfolipasa SDA-YEA			Proteasa YCB-BSA		
		Positivo	Porcentaje	Pz ± SD	Positivo	Porcentaje	Pz ± SD
Infección local	68	58	85,29	0,622 ± 0,083	65	95,59	0,261 ± 0,078
Micosis sistémica	68	30	44,12	0,663 ± 0,075	36	52,94	0,463 ± 0,182

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

El constante cambio epidemiológico y resistencia de las diferentes especies del género *Candida* ha generado preocupación a nivel global, por lo cual Guerrero, et al. (2016) desarrolló la identificación, susceptibilidad y distribución de especies de *Candida* obtenidas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) del Ecuador.

El servicio brindado por los laboratorios NETLAB S.A., empleó un análisis de diferenciación directa en platos de aislamiento como CHROMAgar *Candida* y el uso del sistema VITEK 2 para la identificación de los aislados clínicos. La frecuencia de los aislados clínicos identificados en esta investigación (Tabla 3), concuerdan con los resultados de varios autores (Alnuaimi et al., 2016; Cleveland et al., 2015; Idelevich & Grunewald, 2014; Panizo et al., 2005). Según Giolo, et al. (2010), *C. krusei* es uno de los aislados más frecuentemente encontrados, pero debido a su susceptibilidad antes nuevos azoles, su prevalencia ha ido disminuyendo (Rodriguez Tudela et al., 2008).

Las infecciones nosocomiales causadas por el género *Candida* tienen una frecuencia del 53% en hospitales pediátricos de tercer nivel, 34% en hospitales de tercer nivel, 11% en centros y sub-centros de salud, 1% en hospitales de segundo nivel y 1% en clínicas particulares. Revelando que los aislados provinieron en mayor proporción de lavados bronquiales con un 29%, seguidos de orina con 22% y finalmente de sangre con 13% (Guerrero & Villacis, 2016). Según Harakuni, et al. (2012) y Pongrácz, et al. (2016), los aislados de *Candida no albicans* son aislados con mayor frecuencia de muestras de sangre que de otros sitios no estériles, como se evidencia en los resultados tabulados en la Tabla 4.

Se muestra que no existen aislados de *C. krusei* y *C. parapsilosis* con respecto a infecciones locales (Tabla 4). Tan, et al. (2016) menciona que las infecciones causadas por *C.*

krusei a nivel respiratorio es hallado con menor frecuencia en la micología clínica comparado con otras especies patógenas de *Candida*. Por otro lado, Namratha, et al. (2018) menciona que existe una mayor proporción de aislados de *C. parapsilosis* en esputo cuando se produce una co-infección fúngica con tuberculosis.

La prueba de tubo germinal llevada a cabo por el personal de los hospitales de referencia, tuvo una diferencia del 25.7% en la identificación de los aislados comparados con los métodos en conjunto aplicados por los laboratorios NETLAB S.A. Moya, et al. (2018) menciona que la prueba del tubo germinal es un método eficiente para la identificación del género *Candida*, debido a su rapidez, bajo costo y sencillo modo de empleo para discriminar entre *C. albicans* y *C. dublensis* de otras especies, alcanzando un 98% de sensibilidad. Sin embargo, se ha evidenciado que existe un 5 a 10% de aislados de *C. albicans* que no poseen la capacidad de producir tubo germinal. Adicionando que no permite una clara identificación de especies no-*albicans*, por ende, no puede ser considerada una prueba absoluta (M. N. Souza et al., 2015). Dadas estas limitaciones, se ha fomentado la búsqueda de otras alternativas para la identificación de levaduras patógenas (Carrillo-Muñoz et al., 2003).

El medio CHROMAgar *Candida* ofrece una identificación sencilla de varias especies que se fundamenta en el color de las colonias y su morfología, manteniendo una diferenciación precisa de las especies más comunes, representadas por: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Stefaniuk, Baraniak, Fortuna, & Hryniewicz, 2016). Madhavan, et al. (2011) menciona en su investigación que la sensibilidad, especificidad y eficiencia para el cultivo de diferentes especies de *Candida* en CHROMAgar a 37°C alcanzan rangos de 56-100%, 92-100% y 88-100%, respectivamente.

El sistema Vitek 2 Biomerieux incluye cartas que permiten la identificación de microorganismos mediante la comparación del perfil bioquímico con una amplia base de datos (Cuenca-Estrella et al., 2010; Kaur, Dhakad, Goyal, Haque, & Mukhopadhyay, 2016). A este sistema se le pueden incorporar cartas de pruebas de susceptibilidad antifúngica (AST), como el trabajo realizado por NETLAB S.A., en el que identificó la susceptibilidad de los aislados a una concentración mínima inhibitoria en base a fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina, anfotericina B y flucitosina. De acuerdo a diversas investigaciones se ha estimado que la sensibilidad del sistema Vitek 2 puede alcanzar valores desde el 85 hasta 100% de identificación inequívoca de los aislados (Ferrara, Mercedes Panizo, Mazzone, Pequenese, & Reviakina, 2014; Kaur et al., 2016; Melhem et al., 2013; Stefaniuk et al., 2016).

La arquitectura de los *biofilms* es un rasgo muy importante para caracterización de las especies de *Candida*. Las técnicas como SEM y CLSM han sido empleadas para evaluar el fenotipo celular, matriz extracelular, crecimiento y arquitectura. Sin embargo, existen limitaciones que pueden ocasionar variabilidad durante su desarrollo (Soll & Daniels, 2016).

La microscopía confocal surge como una técnica importante para demostrar la distribución 3D de la matriz de exopolisacaridos de células de levaduras, arquitectura interna, fenotipo celular y espesor del *biofilm* (Gonçalves et al., 2015; Soll & Daniels, 2016). Esta técnica no destructiva permite la observación *in situ* de *biofilms* hidratados, lo cual mantiene la heterogeneidad de la estructura del *biofilm* (G Ramage et al., 2001). En la Figura 11 se puede apreciar un *biofilm* maduro de 48 horas proveniente de un aislado de micosis sistémicas, que en comparación al aislado proveniente de infecciones locales (Figura 12) bajo las mismas condiciones muestra una mayor proliferación del *biofilm*, concordando con el espesor del *biofilm* alcanzado de 27.72 y 12.78 μm , respectivamente.

Al mismo tiempo, varios autores indican que *C. albicans* produce mayor cantidad de *biofilm* que otras especies patógenas comunes, alcanzando un rango de 14 hasta 450 μm de espesor durante las 24 a 72 horas, mientras que se observa un decaimiento del espesor del *biofilm* a las 96 horas mostrándose menos denso y más disperso (Chandra et al., 2001; Jin et al., 2005; Kuhn, Chandra, Mukherjee, & Ghannoum, 2002; Larkin et al., 2017; G Ramage et al., 2001; Ranjith, Chakravarthy, Adicherla, Sharma, & Shivaji, 2018). Kuhn, et al. (2002) sostiene que los aislados de tipo invasivo son mayores productores de *biofilm* que los provenientes de infecciones no invasivas, comparando su peso seco.

El análisis SEM reveló una formación robusta de la estructura de *biofilms* para las diferentes especies de *Candida* evaluadas en función del tipo de infección (Figuras 13-18). Las imágenes demostraron la correlación existente entre los resultados cuantitativos con respecto a la formación del *biofilm* (ensayo de cristal violeta y XTT). Sin embargo, se identificó que los aislados de micosis sistémicas mantuvieron una prominente formación de material extracelular (ECM) entretejido en el *biofilm*.

Se ha visto que en la mayoría de *biofilms*, la población de microorganismos conforma el 10% de la biomasa total, mientras que la ECM corresponde al 90% restante (Flemming & Wingender, 2010). El ECM juega un rol importante para la formación del *biofilm*, debido a que se encarga de mantener la integridad de la arquitectura del *biofilm*, inmoviliza agua y nutrientes dentro de la matriz y ayuda a la tolerancia antifúngica (Flemming & Wingender, 2010; Nisha et al., 2015; Vila et al., 2017). Este material ha sido difícil de estudiar debido a la sensibilidad del *biofilm* ante el proceso de preparación para la microscopía electrónica, mediante el empleo de químicos fijadores que solo llegan a mostrar células fúngicas sin ECM (C. M. Souza, Pereira Junior, & Moraes Tda, 2016; Walraven, Bernardo, Wiederhold, & Lee, 2014). Según Kuhn, et al. (2002) un gran espesor del *biofilm* de los especímenes indica que

son altos productores de material extracelular. El ECM forma una malla de fibras que parece mediar la adhesión célula a célula (Vila et al., 2017).

Ramage, et al. (2001) menciona que los *biofilms* del género *Candida* generalmente son conformados por levaduras y formas filamentosas (hifas y pseudohifas) incrustadas dentro del material extracelular. Interesantemente, los aislados mostrados en las Figuras 13-18, fueron compuestos de blastoconidios sin la presencia de formas filamentosas. Apareciendo capas discontinuas de blastoconidios adheridas a la superficie. Estos descubrimientos concuerdan con las investigaciones realizadas por Chandra, et al. (2001), Silva, et al. (2009) y Leite de Andrade, et al. (2017); donde señalan que los medios empleados para la inducción a la formación de *biofilms* deben ser bien suplementados de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Según Jayewardeneperura, et al. (2016) la formación de un *biofilm* maduro con marcado desarrollo hifal se alcanza a las 72 horas de crecimiento.

En la actualidad existen varios métodos para evaluar la formación de *biofilm*. Entre los métodos más comunes se incluyen los sistemas de platos de microtitulación, sistemas basados en quimiostato y fermentadores de *biofilms* perfundidos. El sistema de platos de microtitulación es un método bastante simple y barato, el cual permite la evaluación de los efectos de múltiples factores en la formación de *biofilms* y por lo tanto permiten analizar un amplio número de aislados a la vez (Jin et al., 2003).

El método del Cristal Violeta (CV) marca en primera instancia a los mucopolisacáridos y amiloides de células metabólicamente activas e inactivas en *biofilms* maduros, por lo cual es un método apropiado y confiable para determinar la formación alta, media y baja de los aislados productores de *biofilm* (Melo et al., 2011; Soll & Daniels, 2016).

De acuerdo a las investigaciones realizadas por Silva, et al. (2009) y Melo, et al. (2011), *C. tropicalis* fue la especie que formó la mayor cantidad de *biofilm*, seguido de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. Estos datos confirman la relación observada en la Figura 19 obtenida a partir de los resultados del estudio.

El método de la reducción de sales de tetrazolio ha sido empelado comúnmente para análisis de los efectos de drogas antifúngicas en el desarrollo del *biofilm*, dado que mide la respiración o actividad metabólica de las células involucradas en una matriz. La reducción de XTT por oxidoreductasas dependientes de NADH en la mitocondria y vesículas especiales, produce formazán, el cual puede ser cuantificado colorimétricamente (Gordon Ramage, Vandewalle, Wickes, López, & Ribot, 2001; Soll & Daniels, 2016). Sin embargo, este es un método de medición indirecta de la extensión entera del *biofilm*, debido a que las monocapas son conformadas por hifas y pseudohifas que poseen baja actividad metabólica, las cuales se encuentran en la zona basal y proximal del *biofilm* (Soll & Daniels, 2016).

Se evidenció una alta actividad metabólica por parte de los aislados de *C. glabrata* como se observó en la Figura 21. Esta especie de *Candida* ha demostrado tener alta actividad metabólica mientras que su biomasa fue baja en comparación con otras especies (Ferreira, Prado, Carvalho, Dias, & Dias, 2013; Marcos-Zambrano, Escribano, Bouza, & Guinea, 2014; Treviño-Rangel, Peña-López, Hernández-Rodríguez, Beltrán-Santiago, & González, 2017). La razón por la cual se muestra este patrón, puede deberse a que las células de *C. glabrata* en el *biofilm* parecen estar más activas metabólicamente que las de otras especies a pesar de su estructura compacta (Marcos-Zambrano et al., 2014).

Como se observa en las Figuras 20 y 22, la producción total de *biofilm* por los aislados de micosis sistémicas fue sumamente superior a la de infecciones locales. Esta característica

puede deberse a la capacidad de los aislados de *Candida no albicans* proveniente de muestras de sangre para producir mayor *biofilm* que en otros sitios anatómicos, lo que indica que debe ser un factor importante para que estas especies causen candidemia (Melo et al., 2011; Shin et al., 2002).

La presencia de actividad fosfolipasa, proteasa y de coagulación ha sido vista en una tercera parte de aislados de *Candida* provenientes de candidiasis no invasivas, esta característica tiene un gran impacto clínico, indicando la capacidad de candidiasis no invasiva para progresar hacia infecciones invasivas severas cuando los pacientes se encuentran inmunocomprometidos (Mushi, Bader, Bii, Groß, & Mshana, 2018). Esta habilidad de producir enzimas hidrolíticas permite a estos especímenes colonizar superficies mucosas o sintéticas para invadir tejidos del hospedero mediante la disrupción de la membrana celular. La ausencia o baja producción de estas enzimas hidrolíticas indican que las especies de *Candida* pueden ser menos virulentas (Nisha et al., 2015).

La actividad fosfolipasa es raramente encontrada en especies de *Candida no albicans* (Ibrahim et al., 1995). Sin embargo, varios estudios actuales contradicen este hecho, dado que se ha visto que aislados de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. ciferri*, *C. sake*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, entre otros; tienden a presentar actividad fosfolipasa (Alenzi, 2016; Alnuaimi et al., 2016; Mushi et al., 2018; Nisha et al., 2015; Panizo et al., 2005; Serda Kantarciolu & Yücel, 2002; L. De Souza, Silva, & Braga-silva, 2014). Por lo tanto, estas investigaciones concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio mostrados en la Tabla 5. La actividad proteasa se evidenció en todas las especies analizadas en este estudio. Según Souza, et al. (2014) *C. albicans* es un productor moderado de proteasas con respecto al resto de especies patógenas.

La actividad enzimática demostrada por los aislados clínicos en función del tipo de infección, indicó superioridad en la producción de fosfolipasas y proteasas para los aislados provenientes de lavados bronquiales y esputos (infecciones locales) en comparación con las de origen sistémico (Tabla 6). Varios autores coinciden con estos resultados, al evidenciar mayor producción enzimática en aislados provenientes del tracto respiratorio presentan una mayor producción de proteasas, las cuales son seguidas de las secreciones vaginales y cavidad oral, hasta llegar a las de sangre que no presentaron actividad enzimática alguna (Mushi et al., 2018; Panizo et al., 2005; Serda Kantarciolu & Yücel, 2002). Por otro lado, otras investigaciones obtuvieron resultados en los que los aislados provenientes del torrente sanguíneo mostraron mayor actividad fosfolipasa y proteasa, alcanzando el 50 y 75%, respectivamente (Dagdeviren, Cerikcioglu, & Karavus, 2005; Nisha et al., 2015). Estas variaciones pueden relacionarse con la especie, linajes, estado inmune del hospedero y diferencias que existen intra-especie (Panizo et al., 2005).

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

Se recolectaron 136 aislados clínicos provenientes de los hospitales HCAM y HEE, los cuales fueron identificados fenotípicamente, entre los cuales se determinaron las especies *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida ciferri*, *Candida lusitaniae*, *Candida parapsilosis*. Se generó una colección de aislados clínicos criopreservada.

La microscopía confocal permitió identificar los polisacáridos de la pared celular de las células de levaduras que conforman el *biofilm* de las especies de *Candida*, la cual dio una aproximación del espesor formado por los aislados.

La microscopía electrónica de barrido, permitió identificar la conformación de la matriz del *biofilm* formado por las diferentes especies de *Candida*. A pesar de no existir una diferencia marcada en la formación de *biofilm* entre ambos grupos de estudio, se demostró la formación de material extracelular en el que se encuentran entrelazados los aislados provenientes de micosis sistémicas, factor que puede estar asociado al sitio anatómico en el que se desarrolla el *biofilm*.

La determinación cuantitativa del *biofilm* formado por los aislados clínicos, fue determinada por los ensayos de cristal violeta y XTT, en los cuales se analizó la producción volumétrica total del *biofilm* y su actividad metabólica. Evidenciando por ambos métodos que los aislados provenientes de micosis sistémicas presentaron una mayor formación de *biofilm* que los provenientes de infecciones locales.

La actividad enzimática producida por los aislados clínicos, fue llevada a cabo en dos medios de cultivo especiales para su desarrollo. Se evidenció que la actividad fosfolipasa y

proteasa de los aislados provenientes de infecciones locales, tuvo una mayor proporción en comparación a los aislados de micosis sistémicas.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Reportar los hallazgos obtenidos de los aislados clínicos de los hospitales de referencia en una revista científica a nivel nacional y/o internacional para contar con información valiosa para el desarrollo de nuevos estudios en el área de la micología clínica.

Realizar estudios de epidemiología molecular de los aislados clínicos, para establecer linajes y distribución de los mismos en el país.

Concientizar al personal sanitario sobre la importancia de las medidas de prevención (asepsia) en el manejo de los pacientes así como también la administración del tratamiento antifúngico considerando la susceptibilidad a los mismos, lo cual contribuye a disminuir el tiempo de estancia hospitalaria, la morbimortalidad y reducir los gastos económico-humanos que afectan a todos los niveles de la población.

BIBLIOGRAFÍA

- Alenzi, F. (2016). Virulence factors of *Candida* species isolated from patients with urinary tract infection and obstructive uropathy, *32*(1), 143–146.
- Alnuaimi, A. D., Ramdzan, A. N., Wiesenfeld, D., Kolev, S. D., Reynolds, E. C., & Mccullough, M. J. (2016). *Candida* virulence and ethanol-derived acetaldehyde production in oral cancer and non-cancer subjects. <https://doi.org/10.1111/odi.12565>
- Andes, D. R., Safdar, N., Baddley, J. W., Playford, G., Reboli, A. C., Rex, J. H., ... Kullberg, B. J. (2012). Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: A patient-level quantitative review of randomized trials. *Clinical Infectious Diseases*, *54*(8), 1110–1122. <https://doi.org/10.1093/cid/cis021>
- Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M., & Corbellino, M. (2016). Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2016.06.029>
- Arendrup, M. C. (2010). Epidemiology of invasive candidiasis. <https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e32833e84d2>
- ATCC. (2011). *XTT Cell Proliferation Assay Kit by Cellular Enzymes*.
- Calderone, R., & Fonzi, W. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, *9*(7), 327–35. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7)
- Cardenes, C. D. (2006). Levaduras del género *Candida* de procedencia clínica. Evaluación de métodos de identificación, 125.
- Carrillo-Muñoz, A. J., Quindós, G., Cárdenes, C. D., Alonso-Vargas, R., Brió, S., Arévalo, P., ... Pontón, J. (2003). Performance of Bactocard TM *Candida* compared with the germ

tube test for the presumptive identification of *Candida albicans* Bactocard TM *Candida* in der Identifizierung von *Candida albicans* im Vergleich mit dem Keimschlauchtest. *Mycoses*, (October 2002), 467–470.

Castañón, L. (2016). Candidiasis o Candidosis. Retrieved from <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>

Chaffin, W. L., López-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D., & Martínez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(1), 130–180. [https://doi.org/1092-2172/98/\\$04.0010](https://doi.org/1092-2172/98/$04.0010)

Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., Ghannoum, M. A., ... Mitchell, J. S. F. and A. P. (2001). Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *National Review of Microbiology*, 9(18), 109–118. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5385>

Chandrakant Deorukhkar, S., & Roushani, S. (2018). Identification of *Candida* Species: Conventional Methods in the Era of Molecular Diagnosis, 1(1), 1–6.

Cleveland, A. A., Harrison, L. H., Farley, M. M., Hollick, R., Stein, B., Chiller, T. M., ... Park, B. J. (2015). Declining Incidence of Candidemia and the Shifting Epidemiology of *Candida* Resistance in Two US Metropolitan Areas , 2008 – 2013: Results from Population-Based Surveillance, 17, 2008–2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120452>

Cuenca-Estrella, M., Gomez-Lopez, A., Alastruey-Izquierdo, A., Bernal-Martinez, L., Cuesta, I., Buitrago, M. J., & Rodriguez-Tudela, J. L. (2010). Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility System with the Clinical and Laboratory Standards Institute (

- CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)
Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititr, *48*(5), 1782–1786.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02316-09>
- Dagdeviren, M., Cerikcioglu, N., & Karavus, M. (2005). Acid proteinase , phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients, 321–326.
- Dalle, F., Wächtler, B., Ollivier, C. L., Holland, G., Bannert, N., Wilson, D., ... Hube, B. (2010). Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes, *12*(October 2009), 248–271. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01394.x>
- Dennis, E. A. (2015). Introduction to Thematic Review Series: Phospholipases: Central Role in Lipid Signaling and Disease. *Journal of Lipid Research*, *56*(7), 1245–1247. <https://doi.org/10.1194/jlr.E061101>
- Deorukhkar, S., Saini, S., & Jadhav, P. (2012). Evaluation of different media for germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*, *199*, 704–707.
- Echeverría, A., Durante, A. G., & Arechavala, A. (2002). Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol*, *19*, 95–98.
- Edwards, J., Schwartz, M. M., Schmidt, C. S., Sobel, J. D., Nyirjesy, P., Schodel, F., ... Jr, J. P. H. (2018). A Fungal Immunotherapeutic Vaccine (NDV-3A) for Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis—A Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial, (May), 1–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy185>

- Elorza, M. V., & Valent, E. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity, *6*, 14–29. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x>
- Ferrara, G., Mercedes Panizo, M., Mazzone, M., Pequenese, M. D., & Reviakina, V. (2014). Estudio comparativo entre los sistemas automatizados Vitek YBC ® y Microscan Walk Away RYID ® con los métodos fenotípicos convencionales para la identificación de levaduras de interés clínico .
- Ferreira, A. V, Prado, C. G., Carvalho, R. R., Dias, K. S. T., & Dias, A. L. T. (2013). *Candida albicans* and Non- *C . albicans* *Candida* Species : Comparison of Biofilm Production and Metabolic Activity in Biofilms , and Putative Virulence Properties of Isolates from Hospital Environments and Infections. *Springer*, 265–272. <https://doi.org/10.1007/s11046-013-9638-z>
- Flemming, H., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Publishing Group*, *8*(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Furlaneto, M. C., Tardei, C. G., Furlaneto-Maia, L., Galvao, E. J., & Pereira, A. T. (2012). Pathogenic Attributes of Non-*Candida albicans* *Candida* Species Revealed by SEM. *IntechOpen*.
- Ghannoum, M. A. (2000). Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis, *13*(1), 122–143.
- Giolo, M. P., Inez, T., & Svidzinski, E. (2010). Fisiopatogenia , epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia, 225–234.
- Giusiano, G. G. (2009). Micosis oportunistas.

- Gonçalves, L. M., Del Bel Cury, A. A., de Vasconcellos, A. A., Cury, J. A., & da Silva, W. J. (2015). Confocal analysis of the exopolysaccharide matrix of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 6(3), 179–185. <https://doi.org/10.1111/jicd.12093>
- Gow, N. A. R., Van De Veerdonk, F.L. Brown, A. J. P., & Netea, M. G. (2012). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2), 112–122.
- Graf, B., Adam, T., Zill, E., & Go, U. L. F. B. (2000). Evaluation of the VITEK 2 System for Rapid Identification of Yeasts and Yeast-Like Organisms, 38(5), 1782–1785.
- Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, A. M. (1999). *Developments in fungal taxonomy. Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 12). [https://doi.org/0893-8512/99/\\$04.00?0](https://doi.org/0893-8512/99/$04.00?0)
- Guerrero, J. (2016). Identificación , susceptibilidad y distribución de especies de *Cándida* obtenidas de muestras clínicas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. *Pontificia Universidad Católica Del Ecuador*.
- Guerrero, J., & Villacis, E. (2016). *Identificación , susceptibilidad y distribución de especies de Cándida obtenidas de muestras clínicas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), de enero 2007 a abril 2016*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms : development , regulation , and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18(5), 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>
- Harakuni, S. U., Karadesai, S. G., & Jamadar, N. (2012). Biofilm Production by *Candida* :

Comparison of Bloodstream Isolates with Cervical Isolates, 52(3), 504–506.

<https://doi.org/10.1007/s12088-012-0261-3>

Hawser, S. P., Norris, H., & Jessup, C. J. (1998). amino) Carbonyl] -2 H -Tetrazolium Hydroxide (XTT) Colorimetric Method with the Standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards Method of Testing Clinical Yeast Isolates for Susceptibility to Antifungal Agents, 36(5), 1450–1452.

Hazen, K. C. (1995). New and emerging yeast pathogens . These include : New and Emerging Yeast Pathogens, 8(4), 462–478.

Hoog, G., & Guarro, J. (1995). *Atlas of Clinical Fungi*.

Ibrahim, A. S., Mirbod, F., Filler, S. G., Banno, Y., Cole, G. T., Kitajima, Y., ... Mmun, I. N. I. (1995). Evidence Implicating Phospholipase as a Virulence Factor of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 63(5), 1993–1998.

Idelevich, E. A., & Grunewald, C. M. (2014). Rapid Identification and Susceptibility Testing of *Candida* spp . from Positive Blood Cultures by Combination of Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry and Direct Inoculation of Vitek 2, 1–14.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114834>

Iglesias, C. (2011). *Prevalencia De Especies De Cándida En La Cavidad Oral En Pacientes Diabéticos Tipo 2*. Retrieved from <http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/17677968.pdf>

Invitrogen Molecular Probes. (2006a). Concanavalin A Conjugates, 1–3.

Invitrogen Molecular Probes. (2006b). Propidium Iodide Nucleic Acid Stain.

James, S. A., Javier, E., Barriga, C., Barahona, P. P., Cross, K., Bond, C. J., ... James, S. A.

- (2017). yeast species found in two separate regions of Ecuador, (2013), 393–397.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.047555-0>
- Jayewardeneperu, S., Jayewardeneperu, S., & Jayewardeneperu, S. (2016). Culture media profoundly affect *Candida Albicans* and *Candida tropicalis* growth , adhesion and biofilm development, (November). <https://doi.org/10.1590/0074-02760160294>
- Jiménez, M. (2013). *Vigilancia microbiológica año 2011: Una herramienta para el control de las infecciones intrahospitalarias (IIH), área de cuidados intensivos (ACI) HCAM*. Universidad San Francisco de Quito.
- Jin, Y., Yip, H. K., Samaranayake, Y. H., Yau, J. Y., & Samaranayake, L. P. (2003). Biofilm-Forming Ability of *Candida albicans* Is Unlikely To Contribute to High Levels of Oral Yeast Carriage in Cases of Human Immunodeficiency Virus Infection Biofilm-Forming Ability of *Candida albicans* Is Unlikely To Contribute to High Levels of Oral Yea. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 2961–2967.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.2961>
- Jin, Y., Zhang, T., Samaranayake, Y. H., Fang, H. H. P., Yip, H. K., & Samaranayake, L. P. (2005). The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*, 159(3), 353–360. <https://doi.org/10.1007/s11046-004-6987-7>
- Kagan, S., Jabbour, A., Sionov, E., Alquntar, A. A., Steinberg, D., Srebnik, M., ... Polacheck, I. (2014). Anti-*Candida albicans* biofilm effect of novel heterocyclic compounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(2), 416–427.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkt365>
- Kaur, R., Dhakad, M., Goyal, R., Haque, A., & Mukhopadhyay, G. (2016). Identification and

- Antifungal susceptibility testing of *Candida* species: A Comparison of Vitek-2 system with conventional and molecular methods. *Journal of Global Infectious Diseases*, 8(4), 139–146.
- Klis, F. M., Koster, C. G. De, & Brul, S. (2014). *Cerevisiae* and *Candida albicans*, 13(1), 2–9. <https://doi.org/10.1128/EC.00250-13>
- Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. a. (2002). Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. *Society*, 70(2), 878–888. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.878>
- Kwon-Chung, K. J., Lehman, D., Good, C., & Magee, P. T. (1985). Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 49(3), 571–575.
- Larkin, E., Hager, C., Chandra, J., & Mukherjee, P. K. (2017). The Emerging Pathogen *Candida auris*: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(5), 1–13. <https://doi.org/10.1128/AAC.02396-16>
- Leanord, A., & Bal, A. M. (2011). Epidemiology and management of candidaemia – a retrospective, multicentre study in five hospitals in the UK, (January), 795–800. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02027.x>
- Leite De Andrade, M. C., Soares De Oliveira, M. A., Dos Santos, F. D. A. G., Ximenes Vilela, P. D. B., Da Silva, M. N., Macêdo, D. P. C., ... Neves, R. P. (2017). A new approach by optical coherence tomography for elucidating biofilm formation by emergent *Candida* species. *PLoS ONE*, 12(11), 1–12.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188020>

- Liu, C., Liao, C., Chen, Y., & Chang, S. (2010). Changing Epidemiology of Nosocomial Bloodstream Infections in 11 Teaching Hospitals in Taiwan Between 1993 and 2006. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 43(5), 416–429. [https://doi.org/10.1016/S1684-1182\(10\)60065-5](https://doi.org/10.1016/S1684-1182(10)60065-5)
- Lockhart, S. R., Jackson, B. R., Vallabhaneni, S., Ostrosky-Zeichner, L., Pappas, P. G., & Chiller, T. (2017). Thinking beyond the common *Candida* species: Need for speciation of *Candida* due to the emergence of multidrug resistant *Candida auris*. *Journal of Clinical Microbiology*, (September). <https://doi.org/10.1128/JCM.01355-17>
- Lodder, J., & Kreger-Van Rij, N. J. W. (1952). The yeasts. *North-Holland Pub.*
- López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433–30437. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800035200>
- López, E. M., & Marín, A. F. (2001). La candidiasis como manifestación bucal en el SIDA. *Revista Cubana de Estomatología*, 38(1), 25–32.
- Madhavan, P., Jamal, F., & Chong, P. (2011). Identification of local clinical *Candida* isolates using CHROMagar *Candida* TM as a primary identification method for various *Candida* species. *Tropical Biomedicine*, 28(2), 269–274.
- Mahazar, N. H., Zakuan, Z., Norhayati, H., MeorHussin, A. S., & Rukayadi, Y. (2017). Optimization of culture medium for the growth of *Candida* sp. and *blastobotrys* sp. as starter culture in fermentation of cocoa beans (*Theobroma cacao*) using response surface methodology (RSM). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 20(3).

<https://doi.org/10.3923/pjbs.2017.154.159>

Marcos-Zambrano, L. J., Escribano, P., Bouza, E., & Guinea, J. (2014). Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp . isolates causing fungemia : Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), 1192–1198.

<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.08.012>

Mathur, P., Behera, B., Sharma, S., Jain, N., Misra, M., & Xess, I. (2012). Rapid identification of yeast isolates from clinical specimens in critically ill trauma ICU patients. *Journal of Laboratory Physicians*, 4(1), 30. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.98667>

Melhem, M., Bertoletti, A., Lucca, H. R. L., Silva, R. B. O., Meneghin, F. A., & Szeszs, M. W. (2013). Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species, 1266, 1257–1266.

Melo, A. S., Bizerra, F. C., Freymüller, E., Arthington-Skaggs, B. A., & Colombo, A. L. (2011). Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Medical Mycology*, 49(3), 253–262. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.530032>

Mille, C., Janbon, G., Delplace, F., Ibata-ombetta, S., Gaillardin, C., Jouault, T., & Poulain, D. (2004). Inactivation of CaMIT1 Inhibits *Candida albicans* Phospholipomannan ^N - Mannosylation , Reduces Virulence , and Alters Cell Wall Protein ^N -Mannosylation *, 279(46), 47952–47960. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405534200>

Molecular Probes. (2001). Probes for Yeast Viability, 1–6.

- Molecular Probes. (2014). SYTO ® Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains, 1–8.
- Moya-salazar, J., & Rojas, R. (2018). Comparative study for identification of *Candida albicans* with germ tube test in human serum and plasma, 3(3), 1–4. <https://doi.org/10.15761/CMID.1000143>
- Moyes, D. L., Runglall, M., Murciano, C., Shen, C., Nayar, D., Thavaraj, S., ... Naglik, J. R. (2010). Article A Biphasic Innate Immune MAPK Response Discriminates between the Yeast and Hyphal Forms of *Candida albicans* in Epithelial Cells. *Cell Host and Microbe*, 8(3), 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.08.002>
- Mushi, M. F., Bader, O., Bii, C., Groß, U., & Mshana, S. E. (2018). Virulence and susceptibility patterns of clinical *Candida* spp . isolates from a tertiary hospital , Tanzania, 1–7. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy107>
- Nakagawa, Y., Ohno, N., & Murai, T. (2003). Suppression by *Candida albicans* β -Glucan of Cytokine Release from Activated Human Monocytes and from T Cells in the Presence of Monocytes, 187, 710–713.
- Neppelenbroek, K. H., Urban, V. M., Jorge, J. H., Campanha, N. H., Grosso, M., Grossa, P., ... Paulista, E. (2013). Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional . <https://doi.org/10.1111/odi.12123>
- Nguyen, M. H., Wissel, M. C., Shields, R. K., Salomoni, M. A., Hao, B., Press, E. G., ... Clancy, C. J. (2012). Performance of *Candida* Real-time Polymerase Chain Reaction , β -D -Glucan Assay , and Blood Cultures in the Diagnosis of Invasive Candidiasis, 54. <https://doi.org/10.1093/cid/cis200>
- Nisha, V. J., Mudhigeti, N., Asir, J., & Chandrakesan, S. D. (2015). Detection of virulence

factors and phenotypic characterization of *Candida* isolates from clinical specimens, (September).

Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2016). *Candida albicans* Biofilm and Human Disease. *HHS Public Access*, 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330.Candida>

Nordin, M.-A.-F., Wan Harun, W. H. A., & Abdul Razak, F. (2013). Antifungal susceptibility and growth inhibitory response of oral *Candida* species to *Brucea javanica* Linn. extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(January 2014), 342. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-342>

Nucci, M., Queiroz-telles, F., Alvarado-matute, T., Tiraboschi, I. N., Cortes, J., Zurita, J., ... Sifuentes-, J. (2013). Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059373>

Ocaña Herrera, M. J. (2015). *Determinación de la flora micótica asociada a infecciones respiratorias con secreciones faríngeas en pacientes con riesgo oncohematológico, UCI, VIH y SIDA en el hospital “Carlos Andrade Marín” durante el periodo de enero a junio del 2015*. Universidad Nacional de Chimborazo.

Ombrella, A. M., Racca, L., & Ramos, L. (2008). Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(1), 12–16. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70004-4](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70004-4)

Panizo, M., Reviákina, V., Flores, Y., Montes, W., & Gladys, G. (2005). Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislados clínicos de *Candida* spp. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(April), 88–95. Retrieved from http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_vm/article/view/447

- Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Publishing Group*, 4(May), 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
- Pfeiffer, C. D., Samsa, G. P., Schell, W. A., Reller, L. B., Perfect, J. R., Alexander, B. D., ... Icrobiol, J. C. L. I. N. M. (2011). Quantitation of Candida CFU in Initial Positive Blood Cultures □, 49(8), 2879–2883. <https://doi.org/10.1128/JCM.00609-11>
- Piguave, J. (2013). *Prevalencia y factores de riesgo de Candidiasis y Vaginosis bacteriana en mujeres atendidas en el centro de salud urbano área de salud N°2 de Shushufindi. 2013. Propuesta de medidas preventivas*. Universidad de Guayaquil.
- Pongrácz, J., Benedek, K., Juhász, E., Iván, M., & Kristóf, K. (2016). In vitro biofilm production of Candida bloodstream isolates: any association with clinical characteristics ?, (2016), 272–277. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000207>
- Price, M. F., Wilkinson, I. D., & Gentry, L. O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in Candida albicans . *Sabouraudia*. <https://doi.org/10.1080/00362178285380031>
- Quindós, G. (2018). The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis : from familiar Candida albicans to multiresistant Candida auris.
- Ramage, G., Vandewalle, K., Wickes, B. L., & López-Ribot, J. L. (2001). Characteristics of biofilm formation by Candida albicans. *Revista Iberoamericana de Micología : Organo de La Asociacion Espanola de Especialistas En Micologia*, 18(May 2017), 163–170. <https://doi.org/200118163> [pii]
- Ramage, G., Vandewalle, K., Wickes, B. L., López, J. L., & Ribot, -. (2001). Characteristics

- of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*, 18, 163–170.
<https://doi.org/200118163> [pii]
- Ramage, G., Walle, K. V. A., Wickes, B. L., & Lo, L. (2001). Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms, 45(9), 2475–2479.
<https://doi.org/10.1128/AAC.45.9.2475>
- Ramos, L. de S., Barbedo, L. S., Braga-Silva, L. A., Santos, A. L. S. dos, Pinto, M. R., & Sgarbi, D. B. da G. (2015). Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(2), 122–125. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.01.003>
- Ranjith, K., Chakravarthy, S. K., Adicherla, H., Sharma, S., & Shivaji, S. (2018). Temporal Expression of Genes in Biofilm-Forming Ocular *Candida albicans* Isolated From Patients With Keratitis and Orbital Cellulitis.
- Richardson, M., & Lass-Flörl, C. (2008). Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 5–24. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01978.x>
- Rodriguez Tudela, J., Donnelly, J. P., Arendrup, C., Arikan, S., Barchiesi, F., Bille, J., ... Fegeler, W. (2008). EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia – forming moulds, 10–12.
- Sacoto, U. (2015). *Prevalencia de Candidiasis Vulvovaginal y factores asociados en pacientes del centro de atención ambulatorio central del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social, Loja 2014*. Universidad de Cuenca.

- Sardi, J. C. O., Bernardi, T., Scorzoni, L., Fusco-Almeida, M., & Giannini, M. J. S. M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options, (May), 10–24. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
- Serda Kantarciolu, A., & Yücel, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, 45(5–6), 160–165. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2002.00727.x>
- Shepherd, M. G. (1987). Cell envelope of *Candida albicans*. *Critical Reviews in Microbiology*, 15(1), 7–25. <https://doi.org/10.3109/10408418709104445>
- Shin, J. H., Kee, S. J., Shin, M. G., Kim, S. H., Shin, D. H., Lee, S. K., ... Ryang, D. W. (2002). Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources, 40(4), 1244–1248. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1244>
- Sicilia, M. H. L., & Cuesta, F. S. (2007). Identificación de levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología*, (11), 1–20.
- Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., & Azeredo, J. (2009). Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition, (November), 681–689. <https://doi.org/10.3109/13693780802549594>
- Soll, D. R., & Daniels, K. J. (2016). Plasticity of *Candida albicans* Biofilms, 80(3), 565–595. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00068-15.Address>
- Souza, C. M., Pereira Junior, S. A., & Moraes Tda, S. (2016). Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells. *Medical*

Mycology, 54, 515–523.

Souza, L. De, Silva, L., & Braga-silva, L. A. (2014). Protease and phospholipase activities of *Candida* spp . isolated from cutaneous candidiasis *Revista Iberoamericana de Micología* Protease and phospholipase activities of *Candida* spp . isolated from cutaneous candidiasis, (October 2017). <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.01.003>

Souza, M. N., Ortiz, S. O., Mello, M. M., & Oliveira, F. D. M. (2015). Comparison between four usual methods of identification of, 57(4), 281–287.

Stefaniuk, E., Baraniak, A., Fortuna, M., & Hryniewicz, W. (2016). Usefulness of CHROMagar *Candida* Medium, Biochemical Methods – API ID32C and VITEK 2 Compact and Two MALDI-TOF MS Systems for *Candida* spp. Identification. *Polish Journal of Microbiology*, 65(1), 111–114.

Sudbery, P. E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 737–748. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2636>

Tan, M., Wang, J., Hu, P., Wang, B. I. N., Xu, W., & Chen, J. (2016). Severe pneumonia due to infection with *Candida krusei* in a case of suspected Middle East respiratory syndrome: A case report and literature review, (December 2014), 4085–4088. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3892>

Treviño-Rangel, R. de J., Peña-López, C. D., Hernández-Rodríguez, P. A., Beltrán-Santiago, D., & González, G. M. (2017). Association between *Candida* biofilm-forming bloodstream isolates and the clinical evolution in patients with candidemia: An observational nine-year single center study in Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología*, (xx). <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.01.005>

- Vila, T., Fonseca, B. B., da Cunha, M. M. L., Dos Santos, G. R. C., Ishida, K., Barreto-Bergter, E., ... Rozental, S. (2017). *Candida albicans* biofilms: comparative analysis of room-temperature and cryofixation for scanning electron microscopy. *Journal of Microscopy*, 267(3), 409–419. <https://doi.org/10.1111/jmi.12580>
- Walraven, C. J., Bernardo, S. M., Wiederhold, N. P., & Lee, S. A. (2014). Paradoxical antifungal activity and structural observations in biofilms formed by echinocandin-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *Medical Mycology*, 52, 131–139.
- Zdanavičienė, E., Gleiznys, A., & Gleiznys, D. (2017). Host responses to *Candida albicans*. A review, 19(4), 109–123.
- Zhu, W., & Filler, S. G. (2016). Interactions of *Candida albicans* with Epithelial Cells Weidong. *NIH Public Access*, 12(3), 273–282. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01412.x>. Interactions
- Zilberberg, M. D., Shorr, A. F., Kollef, M. H., Zilberberg, M. D., & Shorr, A. F. (2014). Secular Trends in Candidemia - Related Hospitalization in the United States , 2000 – 2005 • Secular Trends in Candidemia-Related Hospitalization in the United States , 29(10), 978–980.