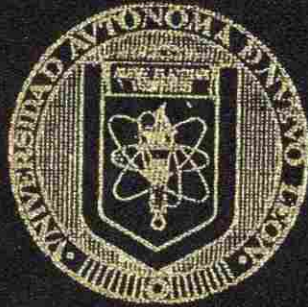


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* CON
ANTIFUNGICOS EN CELULAS PLANCTONICAS
Y EN BIOLFILMS DE *Candida parapsilosis*

Por

Q.F.B. Teresa Pérez Gavilán Robles

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA

Junio de 2003

TM

Z6658

FM

2003

.P4

Q.F.B. Teresa Pérez Gavilán Robles



1020148532



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* CON ANTIFÚNGICOS EN
CÉLULAS PLANCTÓNICAS Y EN BIOFILMS DE *Candida parapsilosis***

Por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Q.F.B. Teresa Pérez Gavilán Robles

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

JUNIO 2003



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



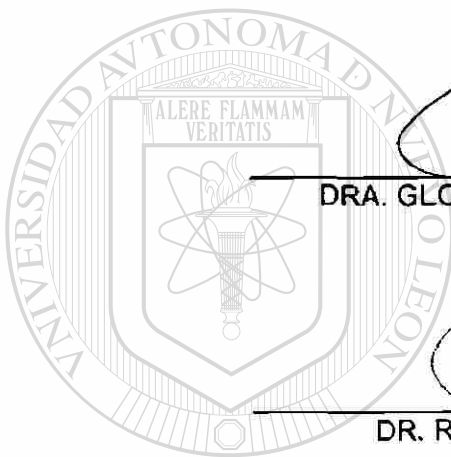
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**FONDO
TESIS**

**PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* CON ANTIFUNGICOS EN CÉLULAS
PLANCTÓNICAS Y EN BIOFILMS DE *Candida parapsilosis***

Aprobación de la Tesis:



DRA. GLORIA MARÍA GONZALEZ GONZALEZ
Director de la Tesis

DR. ROLANDO TIERINA MENCHACA
Co-Director de la Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS

DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ
Miembro de la Comisión de Tesis

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado



El presente proyecto se desarrolló en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Gloria González González y la codirección del Dr. Med. Rolando Tijerina Menchaca.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a ti Señor Dios que no me has dejado caminar sola en ningún momento de mi vida, por tu infinito amor de Padre, muchas gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme los recursos económicos necesarios para realizar mis estudios.

Al Dr. Med. Rolando Tijerina Menchaca, por haberme dado la oportunidad de estudiar en el Departamento de Microbiología a su cargo.

A la Dra. Ma. del Socorro Flores de C., por su apoyo, por sus regaños y sus consejos, además por ser mi maestra y amiga.

A la Dra. Gloria González González por confiar en mi para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Manuel Solís por el trabajo de microfotografía realizado para este trabajo de tesis.

A mis maestros, por compartirme su enorme experiencia, todos dejan una huella enorme en mi corazón, los respeto y los quiero mucho.

A mis compañeros de posgrado por todo el apoyo recibido y por haberme impulsado en los momentos duros, especialmente a ti Carmen y a ti Elsa.

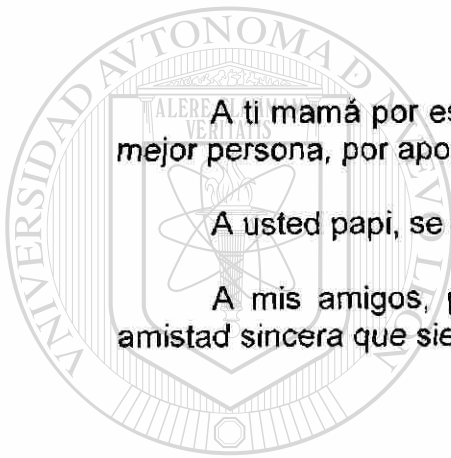
A todos los miembros del Departamento de Microbiología por brindarme su apoyo con pequeños y grandes detalles, especialmente a Rosaura, Angelitos, Carlos, Héctor y la Sra. Eva, los quiero mucho.

DEDICATORIAS

A ti mamá por estar siempre a mi lado, por ayudarme cada día a ser mejor persona, por apoyarme en mis proyectos y alentarme a concluirlos.

A usted papá, se que se sentiría orgulloso de mí.

A mis amigos, por brindarme cada día el invaluable regalo de su amistad sincera que siempre me motiva.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Biofilm	1
1.2 Biofilms de <i>Candida</i> spp.	3
1.3 <i>Candida parapsilosis</i>	4
1.4 Antecedentes	5
1.5 Justificación del estudio	8
CAPÍTULO 2	9
OBJETIVOS	9
2.1 Objetivos generales	9
2.2 Objetivos específicos	10
CAPÍTULO 3	11
MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1 Reactivos.....	11
3.2 Origen de las cepas de <i>C. parapsilosis</i>	12
3.3 Cepas control	12
3.4 Equipo	13
3.5 Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> con antifúngicos en células planctónicas de <i>Candida parapsilosis</i>	14
3.5.1 Preparación de placas de antifúngico.....	14
3.5.1.1 Fluconazol (0.125-64 µg/mL en agua)	14
3.5.1.2 Itraconazol (0.015-8 µg/mL en dimetilsulfóxido)	16
3.5.1.3 Anfotericina B (0.03-16 µg/mL en agua)	18
3.5.2. Inoculación de las placas de antifúngico	20
3.5.3. Incubación de las placas inoculadas	22
3.5.4. Lectura de resultados	22
3.5.4.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	23
3.5.4.2 Determinación de la concentración mínima letal.	23
3.6 Curva de crecimiento de biofilms de <i>Candida parapsilosis</i> en placas de microtitulación	24
3.7 Formación de biofilms de <i>Candida parapsilosis</i> en placas de microtitulación a las 17 horas de crecimiento.....	26
3.7.1. Método colorimétrico con XTT	27
3.8 Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> con antifúngicos en biofilms de <i>Candida parapsilosis</i> en placas de microtitulación.....	28
3.8.1. Método colorimétrico con XTT	30
3.9 Curva de crecimiento de biofilms de <i>Candida parapsilosis</i> en catéter	31
3.9.1. Preparación de cortes de catéter.....	31

3.9.2. Preparación de los tubos con corte de catéter	31
3.9.3. Curva de crecimiento de <i>Candida parapsilosis</i> en cortes de catéter ...	32
3.9.4. Método colorimétrico con XTT	33
3.10. Formación de biofilms de <i>Candida parapsilosis</i> en cortes de catéter a las 24 horas de crecimiento	33
3.10.1. Preparación de los tubos con corte de catéter	33
3.10.2. Formación de biofilms a las 24 horas de crecimiento	34
3.11. Microfotografía de biofilms	35
CAPITULO 4	36
RESULTADOS	36
4.1. Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> con antifúngicos en células planctónicas de <i>Candida parapsilosis</i>	36
4.1.1. ITRACONAZOL (Concentración mínima inhibitoria)	36
4.1.2. FLUCONAZOL (Concentración mínima inhibitoria)	37
4.1.3. ANFOTERICINA B (Concentración mínima inhibitoria)	38
4.1.4. ANFOTERICINA B (Concentración mínima letal)	39
4.2. Curva de crecimiento de biofilms de <i>Candida parapsilosis</i> en placas de microtitulación	40
4.3. Formación de biofilms de <i>Candida parapsilosis</i> en placas de microtitulación a las 17 horas de crecimiento	41
4.4. Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> con antifúngico en biofilms de <i>Candida parapsilosis</i> en placas de microtitulación	42
4.4.1. ITRACONAZOL (Concentración mínima inhibitoria)	42
4.4.2. FLUCONAZOL (Concentración mínima inhibitoria)	42
4.4.3. ANFOTERICINA B (Concentración mínima inhibitoria)	43
4.5. Curva de crecimiento de biofilms de <i>Candida parapsilosis</i> en catéter	44
4.6. Formación de biofilms de <i>Candida parapsilosis</i> en cortes de catéter a las 24 horas de crecimiento	47
4.7. Microfotografía de biofilms	49
4.7.1. Microfotografía de contraste de fases	49
4.7.2. Microfotografía electrónica de transmisión	50
CAPITULO 5	51
DISCUSIÓN	51
CAPITULO 6	54
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS	55

APÉNDICES.....	60
APENDICE A	
PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	60
APENDICE B	
ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO	
DE <i>Candida parapsilosis</i>.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pasos para la formación del biofilm	2
Figura 2. Diagrama de preparación de las diluciones seriadas de fluconazol	15
Figura 3. Diagrama de preparación de las diluciones seriadas de itraconazol.....	17
Figura 4. Diagrama de preparación de las diluciones seriadas de anfotericina B.....	19
Figura 5. Curvas de crecimiento de las cepas 2992, 5736, 5892 y la cepa control de <i>Candida parapsilosis</i> en placas de poliestireno	40
Figura 6. Formación de biofilms de las 20 cepas de <i>Candida parapsilosis</i> obtenidas de aislados clínicos y las cepas control de <i>Candida parapsilosis</i> (C.p) y <i>Candida krusei</i> (C.k) a las 17 horas de incubación en placa de poliestireno	41
Figura 7. Curvas de crecimiento de las cepas 2992, 5736, 5892 en catéteres de cloruro de polivinilo	44
Figura 8. Curvas de crecimiento de las cepas 2992, 5736, 5892 en catéteres de silicón.....	45
Figura 9. Curvas de crecimiento de las cepas 2992, 5736, 5892 en catéteres de látex	46
Figura 10. Esquema de formación de biofilms de las 20 cepas de <i>Candida parapsilosis</i> y las cepas control de <i>Candida parapsilosis</i> y <i>Candida krusei</i> a las 24 horas de incubación en catéteres de PVC, Silicón y Látex.	48
Figura 11. Biofilm de 6h de <i>C. parapsilosis</i> cepa 5736	49
Figura 12. Biofilm de 12h de <i>C. parapsilosis</i> cepa 5736	49
Figura 13. Biofilm de 17h de <i>C. parapsilosis</i> cepa 5736	49
Figura 14. Biofilm de 6h de <i>C. parapsilosis</i> cepa 5736	50
Figura 15. Biofilm de 12h de <i>C. parapsilosis</i> cepa 5736	50
Figura 16. Biofilm de 17h de <i>C. parapsilosis</i> cepa 5736	50
Figura 17. Esquema de dilución y siembra en placa	64

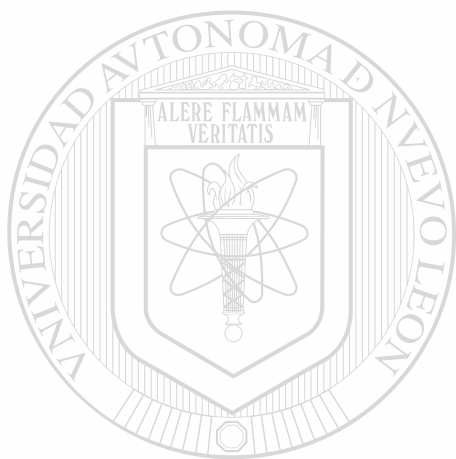
LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Origen de las cepas de <i>C. parapsilosis</i>	12
Tabla 2. Rangos de referencia CMI (mg/mL) 48 h de las cepas control	12
Tabla 3. Esquema de llenado de las placas de poliestireno con diluciones de fluconazol	16
Tabla 4. Esquema de llenado de las placas de poliestireno con diluciones de itraconazol	18
Tabla 5. Esquema de llenado de las placas de poliestireno con diluciones de anfotericina B	20
Tabla 6. Esquema de inoculación de las placas de poliestireno previamente preparadas con diluciones de antifúngico.	22
Tabla 7. Esquema de inoculación de las placas de poliestireno con las cepas elegidas para curva de crecimiento	25
Tabla 8. Esquema de inoculación de las placas de poliestireno para prueba de formación de biofilms a las 17 horas.	27
Tabla 9. Esquema de inoculación de las placas de poliestireno para formación de biofilms a las 17 horas.	29
Tabla 10. Esquema de llenado de las placas de poliestireno con biofilm con antifúngicos para pruebas de susceptibilidad.	30
Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria en $\mu\text{g/mL}$ después de 24 y 48 h de exposición a itraconazol.	36
Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria en $\mu\text{g/mL}$ después de 24 y 48 h de exposición a fluconazol (células planctónicas).....	37
Tabla 13. Concentración mínima inhibitoria en $\mu\text{g/mL}$ después de 24 y 48 h de exposición a anfotericina B (células planctónicas).....	38
Tabla 14. Concentración mínima letal en $\mu\text{g/mL}$ después de 24 y 48 h de exposición a anfotericina B (células planctónicas).....	39
Tabla 15. Densidades ópticas registradas para curva de crecimiento.	40
Tabla 16. Densidades ópticas registradas para formación de biofilm a las 17 horas.....	41
Tabla 17. Concentración mínima inhibitoria en $\mu\text{g/mL}$ después de 24 y 48 h de exposición a itraconazol (biofilm).....	42
Tabla 18. Concentración mínima inhibitoria en $\mu\text{g/mL}$ después de 24 y 48 h de exposición a fluconazol (biofilm).....	42
Tabla 19. Concentración mínima inhibitoria en $\mu\text{g/mL}$ después de 24 y 48 h de exposición a anfotericina B (biofilm).....	43
Tabla 20. Densidades ópticas registradas para curva de crecimiento en catéter de Cloruro de polivinilo.....	44
Tabla 21. Densidades ópticas registradas para curva de crecimiento en catéter de silicón.....	45
Tabla 22. Densidades ópticas registradas para curva de crecimiento en catéter de látex.	46
Tabla 23. Densidades ópticas registradas para todas las cepas en los diferentes catéteres	47

NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
µg	microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
AM3	Medio 3 para antibiótico
API 20C AUX	Pruebas bioquímicas (Analyzed Profile Index)
C.k	<i>Candida krusei</i>
C.p	<i>Candida parapsilosis</i>
cm	Centrimetros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CML	Concentración mínima letal
D.O.	Densidad óptica
<hr/>	
g	Gramos
I.V.	Intravenoso
Lbs	Libras
mg	Miligramo
mL	Mililitros
N	Normal
NCCLS M-27A	Método de microdilución en caldo (National Committee for Clinical Laboratory Standards)
nm	Nanómetros
PBS	Solución salina en buffer de fosfatos

PVC	Cloruro de polivinilo
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio de cultivo (Roswell Park Memorial Institute)
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
XTT	Sal de Tetrazolio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)- 5-[(fenilamino)carbonil]2H hidróxido de tetrazolio



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

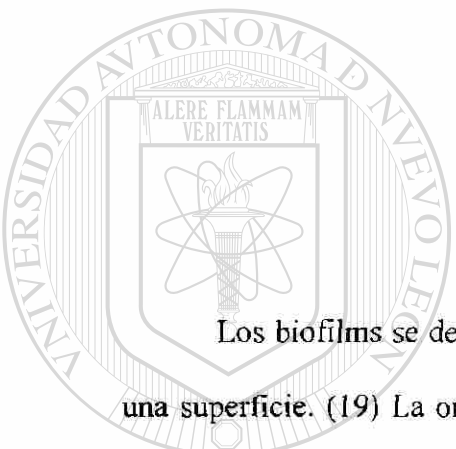


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Biofilm



Los biofilms se definen como un ensamblaje de microorganismos adheridos a una superficie. (19) La organización de microorganismos en biofilms y el estilo de vida de los mismos confiere propiedades que no se observan cuando las células crecen individualmente como poblaciones planctónicas en el laboratorio. (12) Una de las propiedades más importantes que se han observado en las infecciones asociadas a biofilms es la dificultad en el tratamiento debido a que disminuye su susceptibilidad a la terapia antimicrobiana. (4, 12)

Los microorganismos que conforman el biofilm generalmente producen una capa delgada de exopolisacáridos en la cual viven bajo un ambiente de protección. (6,9)

Los biofilms con frecuencia se forman sobre superficies expuestas a agua no estéril u otros líquidos. (Figura 1.)

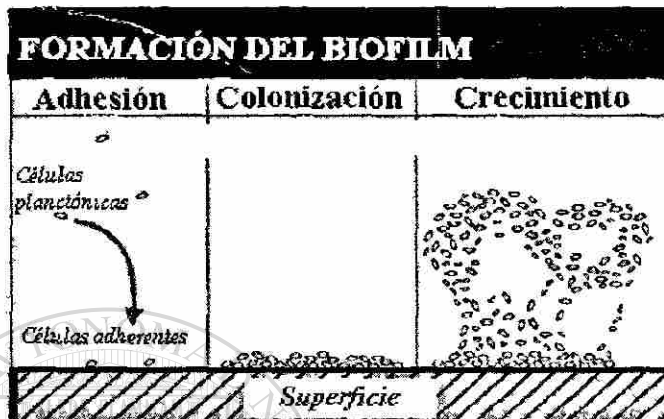


Figura 1. Pasos para la formación del biofilm

En la naturaleza los microorganismos se adhieren a una superficie entre una matriz líquida que sirve como soporte donde forman el biofilm y comienzan a crecer.

(7) En ambientes hospitalarios estas superficies pueden ser diversos materiales que cuentan con flujo de líquidos como por ejemplo un catéter. (10, 11, 29)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Los microorganismos en la base del biofilm tienen una necesidad continua de nutrientes para crecer, así que van dejando canales a través de los agregados de colonias de manera que los materiales puedan fluir libremente a través del biofilm.

(6)

Por otro lado, la concentración mínima inhibitoria (CMI) ha sido el estándar para las pruebas de susceptibilidad de antibióticos contra organismos planctónicos y sirve como una referencia importante en el tratamiento de muchas infecciones agudas. La aplicación de la concentración mínima inhibitoria en el tratamiento de

infecciones asociadas a catéteres que involucran biofilms, es por lo general ineficiente. (6) Se ha demostrado entonces, que los microorganismos que crecen como biofilm tienen una resistencia incrementada a los antibióticos. (2, 17) Los antibióticos que son efectivos en pruebas de concentración mínima inhibitoria son capaces de producir mejoría sintomática por eliminación de la población planctónica, sin embargo debido a que el biofilm no es eliminado por el tratamiento con antibiótico, ocurre la reinfección una vez que el antibiótico es retirado. (5)



1.2 Biofilms de *Candida* spp.

La candidosis es la cuarta causa más común de infecciones del tracto circulatorio en pacientes hospitalizados (3) y la tasa de mortalidad de pacientes con candidosis relacionada a catéteres alcanza el 40% (24)

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Un factor importante que contribuye al incremento de infecciones producidas por *Candida* spp. en la última década ha sido el uso frecuente y generalizado de un amplio rango de implantes médicos tales como catéteres, prótesis, válvulas artificiales, etc. (8) Estos dispositivos proveen las superficies necesarias para la formación de biofilms, los cuales son responsables de un porcentaje significativo de candidosis clínicas. Las fuerzas responsables de la adherencia de *Candida* spp. a

estas superficies son fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas. Las levaduras con mayor carga positiva se adhieren en mayor número. (16)

1.3 *Candida parapsilosis*.

La descripción original de esta levadura se debe a Ashford, quien en 1928 reportó el aislamiento en heces de una especie de *Monilia* fermentadora lenta de maltosa y utilizó el término *parapsilosis* para distinguirla de *Monilia psilosis* que más tarde se nombró *Candida albicans*. (1)

Candida parapsilosis fue considerada no patógena hasta 1940 cuando se le reportó como la causa de un caso fatal de endocarditis en un adicto a narcóticos. (14, 27) Posteriormente, el papel de *C. parapsilosis* se relacionó con infecciones asociadas a invasión de implantes médicos y soluciones parenterales.


Candida parapsilosis es una levadura patógena oportunista la cual puede causar tanto infecciones cutáneas superficiales, (especialmente en uñas) como enfermedades sistémicas (especialmente endocarditis). Otra manifestación clínica incluye endoftalmitis y además puede ocurrir fungemia. (24, 26, 30, 32, 33)

C. parapsilosis tiene propensión a proliferar en soluciones que contienen glucosa y es un colonizador frecuente de la piel, estas características pueden explicar su papel en brotes de infección debidas a soluciones de hiperalimentación

contaminadas, catéteres intravasculares, monitores de presión arterial y soluciones de irrigación oftálmica. (25)

En varios estudios *C. parapsilosis* ha resultado ser el segundo aislado fúngico más común especialmente en neonatos en los cuales se han utilizado líneas centrales y nutrición parenteral. (17)

1.4 Antecedentes



En 1980, Lam, et. al., publicaron que los biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* son comunidades desarrolladas con células bacterianas individuales embebidas en una matriz extracelular de polisacáridos y muestran resistencia a terapia antimicrobiana. (19)

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En 1982, Marie et. al., mostraron que la terapia antimicrobiana mejora síntomas causados por células planctónicas liberadas del biofilm pero que a este no logran eliminarlo. (20)

En 1984, Marie y Costerton. realizaron el examen de un catéter removido de un paciente bajo terapia de hiperalimentación usando microscopía electrónica de

barrido y transmisión mostrándose la presencia de *C. parapsilosis* en un biofilm extenso asociado con un material fibroso en la superficie plástica. (21)

En 1985, Critchley et. al. demostraron que la adherencia de *C. parapsilosis* al acrílico fue marcadamente notable y fue mayor que la de *C. albicans* después de crecimiento en una solución de glucosa 50mM. (8)

En 1988, Mc Ginley et, al. mostraron que *C. parapsilosis* puede ser parte de la flora normal de la piel humana y que es el hongo más frecuentemente aislado del espacio subungular de voluntarios sanos. (22)

En 1992 Khoury et, al. demostraron que aún en individuos con excelente funcionamiento del sistema inmune celular y humoral, las infecciones asociadas a biofilms se resuelven en raras ocasiones por los mecanismos de defensa del hospedero. (15)

En 1992 R. Tellier et, al. propusieron la reducción metabólica de la sal de tetrazolio (XTT) por parte de las levaduras como un método colorimétrico para prueba de antifúngicos en células planctónicas el cual es cuantitativo y objetivo. (31)

En 1994 Howser et. al., describieron un modelo para estudiar biofilms de *Candida* spp. en la superficie de discos de material de catéter. (11)

En 1995 Howser et. al., probaron 5 antifúngicos en biofilms de *C. albicans* creados en discos de material de catéter usando el método de incorporación de

leucina [³H] y la reducción de sales de tetrazolio (XTT). El fluconazol mostró la mayor actividad y anfotericina B la menor actividad. (12)

En 1998, Hawser et. al., determinaron CMI's para aislados de *Candida* y *Cryptococcus* spp. por un método basado en la reducción del indicador colorimétrico (XTT) y los resultados se compararon con los obtenidos por el National Committee of Clinical Laboratory Standards (M27-A). (13)

En el 2001 Ramage et al., probaron susceptibilidad de antifúngicos *in vitro* en biofilms de varias cepas de *C. albicans* contra anfotericina B y fluconazol, demostrándose incrementada resistencia de los biofilms contra estos agentes. (28)

En el 2002 Kuhn et al, encontraron que los biofilms de *Candida albicans* son morfológicamente diferentes a los de otras especies de *Candida* ya que los primeros

forman una capa basal de blastosporas cubierta con una densa matriz de exopolisacáridos e hifas. En contraste, los biofilms de *Candida parapsilosis* tienen menos volumen que los biofilms de *C. albicans* y están formados solo de cúmulos de blastosporas. (17)

En el 2002 Kuhn et al, hicieron pruebas de susceptibilidad en aislados de *Candida* usando fluconazol, nistatina, clorhexidina, terbinafina, anfotericina B y los triazoles voriconazol y ravuconazol revelando resistencia en todos los aislados de biofilms de *Candida* en comparación con las formas planctónicas, en contraste, las formulaciones lipídicas de anfotericina B (anfotericina B liposomal y anfotericina B

complejo lipídico) y equinocandinas (caspofungina y micafungina) mostraron actividad contra los biofilms de *Candida*. (18)

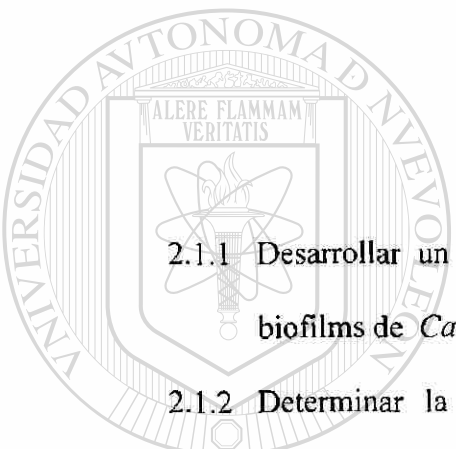
1.5 Justificación del estudio

Una de las consecuencias del crecimiento a manera de biofilm asociado a catéteres y otros implantes médicos es la resistencia incrementada a la terapia antimicrobiana, por esto, las candidosis en pacientes que usan estos dispositivos tienden a hacerse crónicas, además, en ambientes hospitalarios, se ha observado una marcada prevalencia de *C. parapsilosis*, por lo que, es importante implementar un método estandarizado para probar susceptibilidad a antifúngicos en biofilms de esta levadura, pues a la fecha, la metodología que se sigue para prueba de antifúngicos en levaduras (NCCLS M27-A) aplica únicamente para células planctónicas que muestran mayor sensibilidad a antifúngicos.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales



2.1.1 Desarrollar un modelo *in vitro* para la formación y cuantificación de biofilms de *Candida parapsilosis*.

2.1.2 Determinar la susceptibilidad a antifúngicos en los biofilms de *C. parapsilosis* previamente formados.

2.1.3 Determinar la susceptibilidad a antifúngicos en células planctónicas de *C. parapsilosis* utilizando el método de referencia para microdilución en caldo NCCLS M27-A

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Recolectar cepas de *C. parapsilosis* las cuales serán tipificadas utilizando el sistema API 20C AUX.

2.2.2 Desarrollar un modelo para la formación de biofilms de *C. parapsilosis* utilizando como soporte catéteres intravenosos de cloruro de polivinilo, silicón y látex.

2.2.3 Cuantificar el biofilm formado utilizando el método colorimétrico de reducción de la sal de tetrazolio.

2.2.4 Desarrollar un modelo para la formación de biofilms de *C. parapsilosis* utilizando como soporte placas para microtitulación.

2.2.5 Cuantificar el biofilm formado utilizando el método colorimétrico de reducción de la sal de tetrazolio.

2.2.6 Exponer los biofilms a diluciones de los siguientes antifúngicos; fluconazol, itraconazol, anfotericina B.

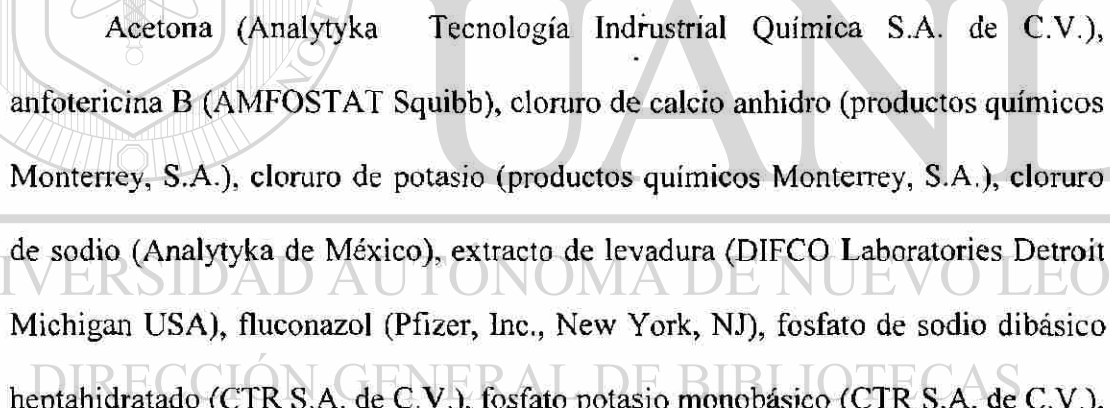
2.2.7 Realizar cuantificación del biofilm después de haber sido expuesto al antifúngico mediante la prueba colorimétrica de reducción de la sal de tetrazolio.

2.2.8 Determinar concentraciones mínimas inhibitorias.

CAPITULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Reactivos



Acetona (Analytika Tecnología Industrial Química S.A. de C.V.), anfotericina B (AMFOSTAT Squibb), cloruro de calcio anhidro (productos químicos Monterrey, S.A.), cloruro de potasio (productos químicos Monterrey, S.A.), cloruro de sodio (Analytika de México), extracto de levadura (DIFCO Laboratories Detroit Michigan USA), fluconazol (Pfizer, Inc., New York, NJ), fosfato de sodio dibásico heptahidratado (CTR S.A. de C.V.), fosfato potasio monobásico (CTR S.A. de C.V.), itraconazol (Laboratorios Jansen), lactato de sodio 60% (CTR S.A. de C.V.), medio AM3, Antibiotic médium 3 dehydrated (DIFCO laboratories), medio RPMI 1640 (American Biorganics, INC.), medio soya tripticasa (DIBICO S.A. de C.V.), menadiona (Sigma Cat. M5625), saboureaud dextrosa agar (DIBICO S.A. de C.V.), sistema AUX 20C, XTT (Sigma Cat. X4251),

3.2 Origen de las cepas de *C. parapsilosis*

Tabla 1. Origen de las cepas de *C. parapsilosis*

Número	Fecha	Fuente
381	02/06/95	Sangre
1531	06/29/95	Uñas
3202	07/08/96	Sangre
4775	10/06/97	Lavado bronquial
5013	12/03/97	Piel
5727	10/02/98	Tejidos
5729	10/02/98	sangre
5728	10/02/98	Punta de catéter I.V.
5732	10/02/98	Sangre
5736	10/02/98	Sangre
5737	10/02/98	Sangre
5804	11/23/1998	Lavado bronquial
5890	07/19/1999	Uñas
5891	07/19/1999	Uñas
5892	07/19/1999	Piel
6234	03/13/2000	Lavado bronquial
2832	27/09/01	Sangre
2830	27/09/01	Sangre
2992	11/10/01	Sangre
3307	05/11/01	Sangre

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

3.3 Cepas control

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Candida parapsilosis ATCC 22019

Candida krusei ATCC 6258

Tabla 2. Rangos de referencia CMI (mg/mL)/48 h de las cepas control

Rango de referencia CMI (mg/mL)/48h		
	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida krusei</i>
Anfotericina B	0.25-1	0.5-2
Fluconazol	2-8	16-64
Itraconazol	0.06-0.25	0.125-0.5

3.4 Equipo

Agitador de matraces (Lab-line orbit shaker No. 3590 Lab-line Instruments), autoclave (Pelton & Crane), balanza analítica (Sartorius handy), balanza granataria, (Sartorius BL 610), campana de bioseguridad (Labconco purifier class II total exhaust), centrífuga (Enclosed servall superspeed), congelador -20°C (REVCO Legaci, refrigeration system GS laboratory equipment), congelador -70 (Cryo-fridge American Scientific Products), cuenta colonias (Darkfield Québec Scientific Instruments), espectrofotómetro (Sequoia-Turner Corporation model 340), espejo para placas de hemoaglutinación, guantes de látex estériles (AMBIDERM), hojas para bisturí 20 (Bard-Parker), incubadora (BOEKEL Industries Inc. model 132000), incubadora (J.M Ortiz), lector de ELISA (BIORAD Benchmark), microplaca de 96 pozos fondo plano (Costar), microplaca de 96 pozos fondo en "U" (Costar), microplaca de 24 pozos fondo plano (Evergreen) microscopio (OLYMPUS CH20), multipipeta automática 40 a 200 μL BenchMate Multi-8 Oxford, olla PRESO (Industrias STEELE de México), pipeta automática (Eppendorf 100 μL), pipeta automática (Eppendorf 1000 μL), pipeta automática (Eppendorf 20 μL), pipeta automática (Biopette Labnet 2 μL), pipetas serológicas (Pirex 1,5,10 mL), plancha de calentamiento (CORNING) , potenciómetro (CORNING pH meter 440), sistema de filtración de 115 mL (Nalge SYBRON), sistema de filtración de 500 mL 0.22 μm CA [(acetato de celulosa) CORNING 430769], tubo falcon de 50 mL con tapón de rosca, tubos falcon 5 mL poliestireno con tapón de presión, vortex mixer (American Scientific Products cat. S8223-1).

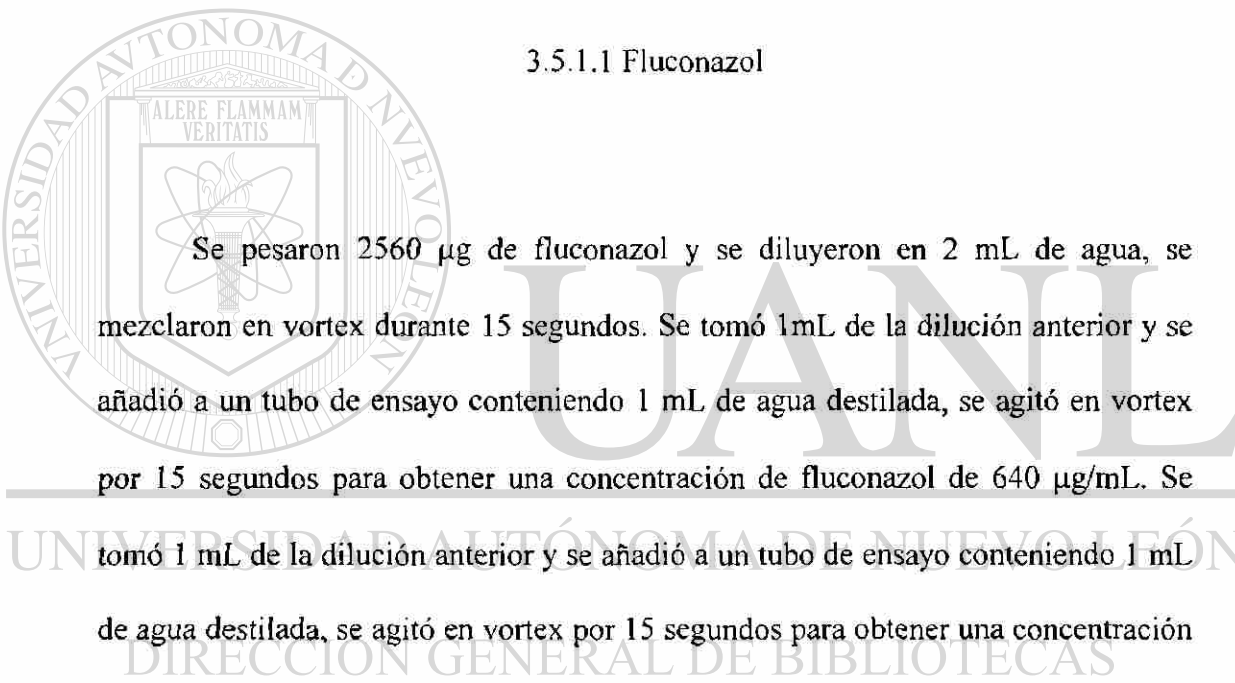
3.5 Pruebas de susceptibilidad *in vitro* con antifúngicos

en células planctónicas de

Candida parapsilosis

3.5.1 Preparación de placas con antifúngico

3.5.1.1 Fluconazol



Se pesaron 2560 μg de fluconazol y se diluyeron en 2 mL de agua, se mezclaron en vortex durante 15 segundos. Se tomó 1 mL de la dilución anterior y se añadió a un tubo de ensayo conteniendo 1 mL de agua destilada, se agitó en vortex por 15 segundos para obtener una concentración de fluconazol de 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se

tomó 1 mL de la dilución anterior y se añadió a un tubo de ensayo conteniendo 1 mL de agua destilada, se agitó en vortex por 15 segundos para obtener una concentración de 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de esta última dilución se tomó 1 mL y se añadió a un tubo con 1 mL de agua destilada para obtener una concentración de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y así sucesivamente se continuó con el mismo procedimiento de dilución seriada 1:2 hasta llegar a una concentración de 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Finalmente se añadieron a los tubos conteniendo las diluciones 320 a 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4 mL de medio RPMI (dilución 1:5), se agitaron cada uno de los tubos en vortex por 15 segundos. Así se obtuvieron 10 concentraciones de 64 a 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 2).

Fluconazol

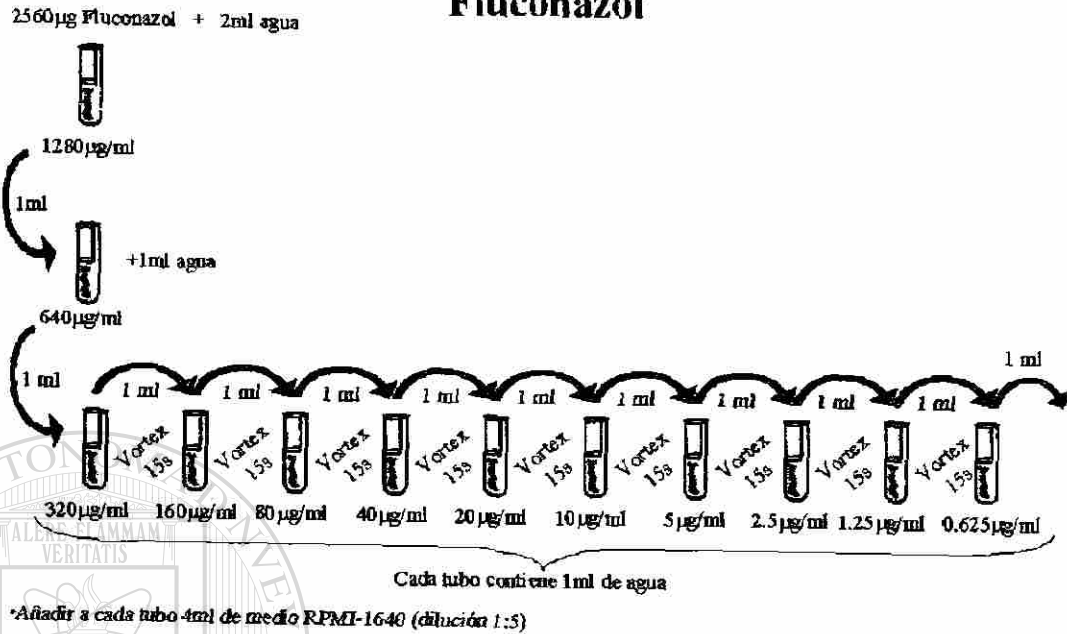


Figura 2. Diagrama que se siguió para preparar las diluciones seriadas de fluconazol

Posteriormente se añadieron 100 µL de cada dilución de antifúngico en los pozos correspondientes de una placa de microtitulación de 96 pozos de fondo curvo como se muestra en el siguiente diagrama:

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 3. Lsqueima de llenado de las placas de poliestireno con diluciones de fluconazol

100µL 64µg/mL	100µL 32µg/mL	100µL 16µg/mL	100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL Agua	100µL RPMI 1640
100µL 64µg/mL	100µL 32µg/mL	100µL 16µg/mL	100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL Agua	100µL RPMI 1640
100µL 64µg/mL	100µL 32µg/mL	100µL 16µg/mL	100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL Agua	100µL RPMI 1640
100µL 64µg/mL	100µL 32µg/mL	100µL 16µg/mL	100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL Agua	100µL RPMI 1640
100µL 64µg/mL	100µL 32µg/mL	100µL 16µg/mL	100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL Agua	100µL RPMI 1640
100µL 64µg/mL	100µL 32µg/mL	100µL 16µg/mL	100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL Agua	100µL RPMI 1640
100µL 64µg/mL	100µL 32µg/mL	100µL 16µg/mL	100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL Agua	100µL RPMI 1640
100µL 64µg/mL	100µL 32µg/mL	100µL 16µg/mL	100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL Agua	100µL RPMI 1640

En la columna 11 se colocaron 100 µL de agua como control de solvente y en la columna 12 se colocaron 100 µL de medio de cultivo RPMI 1640 como control de medio de cultivo. Finalmente estas placas preparadas con el antifúngico se etiquetaron y se guardaron en congelación a -20°C

3.5.1.2 Itraconazol

Se pesaron 0.00320 g de itraconazol y se diluyeron en 2 mL de dimetilsulfóxido al 100%, se mezclaron en vortex durante 15 segundos. Se tomaron 100 µl de la dilución anterior equivalente a 1600 µg/mL y se añadieron a un tubo de ensayo conteniendo 9.9 mL de medio RPMI. Se agitó en vortex por 15 segundos

para obtener una concentración de itraconazol de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se tomaron 5 mL de la dilución anterior y se añadieron a un tubo de ensayo conteniendo 5 mL de medio RPMI, se agitó en vortex por 15 segundos para obtener una concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de esta última dilución se tomaron 5 mL y se añadieron a un tubo con 5 mL de medio RPMI para obtener una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y así sucesivamente se continuó con el mismo procedimiento de dilución seriada 1:2 hasta llegar a una concentración de 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Así se obtuvieron 10 concentraciones de 8 a 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3).

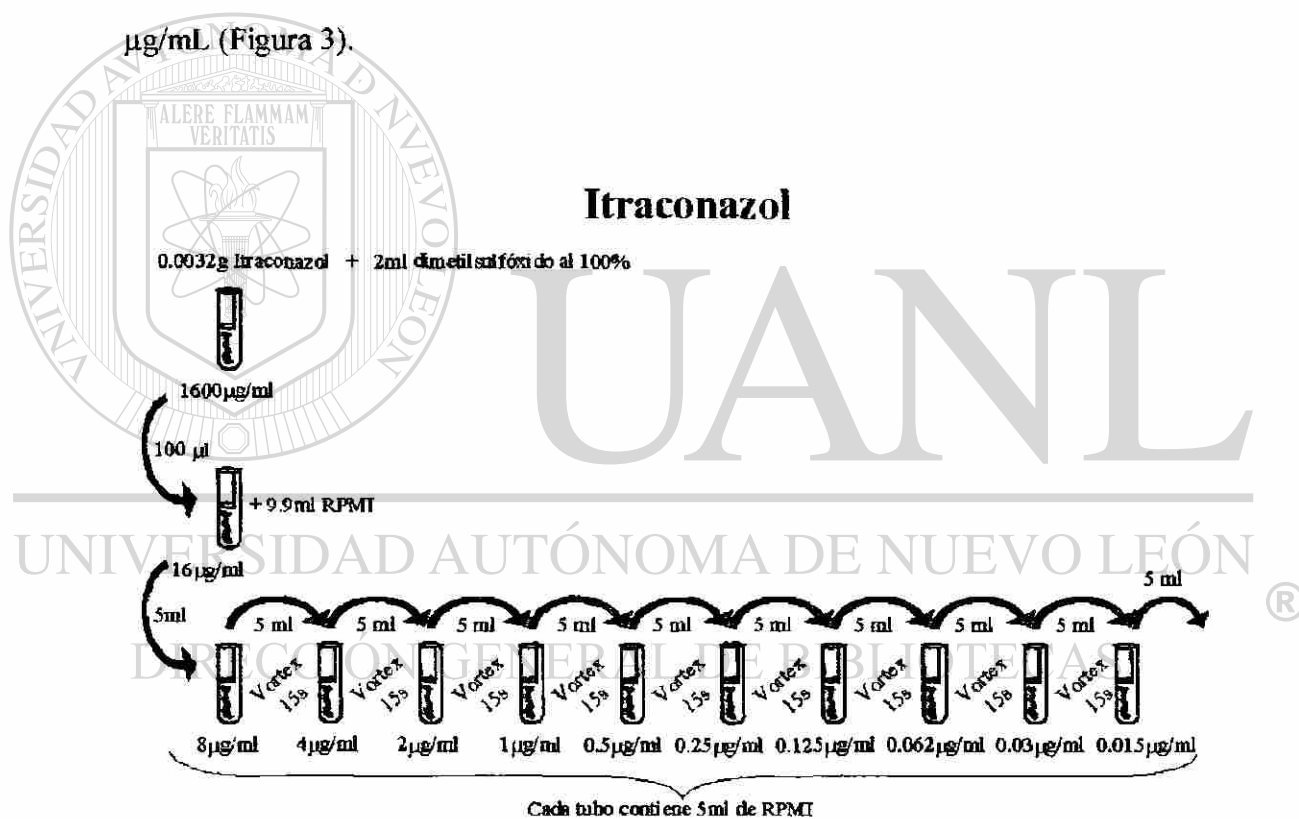


Figura 3. Diagrama que se siguió para preparar las diluciones seriadas de itraconazol

Posteriormente se añadieron 100 μL de cada dilución de antifúngico en los pozos correspondientes de una placa de microtitulación de 96 pozos de fondo curvo como se muestra en el siguiente diagrama:

Tabla 4. Esquema de llenado de las placas de poliestireno con diluciones de itraconazol

100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL 0.062µg/mL	100µL 0.03µg/mL	100µL 0.015µg/mL	100µL Dimetil- sulfoxido	100µL RPMI 1640
100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL 0.062µg/mL	100µL 0.03µg/mL	100µL 0.015µg/mL	100µL Dimetil- sulfoxido	100µL RPMI 1640
100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL 0.062µg/mL	100µL 0.03µg/mL	100µL 0.015µg/mL	100µL Dimetil- sulfoxido	100µL RPMI 1640
100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL 0.062µg/mL	100µL 0.03µg/mL	100µL 0.015µg/mL	100µL Dimetil- sulfoxido	100µL RPMI 1640
100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL 0.062µg/mL	100µL 0.03µg/mL	100µL 0.015µg/mL	100µL Dimetil- sulfoxido	100µL RPMI 1640
100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL 0.062µg/mL	100µL 0.03µg/mL	100µL 0.015µg/mL	100µL Dimetil- sulfoxido	100µL RPMI 1640
100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL 0.062µg/mL	100µL 0.03µg/mL	100µL 0.015µg/mL	100µL Dimetil- sulfoxido	100µL RPMI 1640
100µL 8µg/mL	100µL 4µg/mL	100µL 2µg/mL	100µL 1µg/mL	100µL 0.5µg/mL	100µL 0.25µg/mL	100µL 0.125µg/mL	100µL 0.062µg/mL	100µL 0.03µg/mL	100µL 0.015µg/mL	100µL Dimetil- sulfoxido	100µL RPMI 1640

En la columna 11 se colocaron 100 µL de dimetilsulfóxido al 1% como control de solvente y en la columna 12 se colocaron 100 µL de medio de cultivo RPMI 1640 como control de medio de cultivo. Finalmente estas placas preparadas

con el antifúngico se etiquetaron y se guardaron en congelación a -20°C

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.5.1.3 Anfotericina B

Se pesaron 640 µg de anfotericina B y se diluyeron en 2 mL de agua, se mezclaron en vortex durante 15 segundos. Se tomó 1 mL de la dilución anterior y se añadió a un tubo de ensayo conteniendo 1 mL de agua destilada, se agitó en vortex por 15 segundos para obtener una concentración de Anfotericina B de 160 µg/mL.

Se tomó 1 mL de la dilución anterior y se añadió a un tubo de ensayo conteniendo 1 mL de agua destilada, se agitó en vortex por 15 segundos para obtener una concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$, de esta última dilución se tomó 1 mL y se añadió a un tubo con 1 mL de agua destilada para obtener una concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$ y así sucesivamente se continuó con el mismo procedimiento de dilución seriada 1:2 hasta llegar a una concentración de 0.156 $\mu\text{g/mL}$. Finalmente se añadieron a los tubos conteniendo las diluciones 80 a 0.156 $\mu\text{g/mL}$ 4 mL de medio AM3 (dilución 1:5), se agitaron cada uno de los tubos en vortex por 15 segundos. Así se obtuvieron 10 concentraciones de 16 a 0.03 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4).

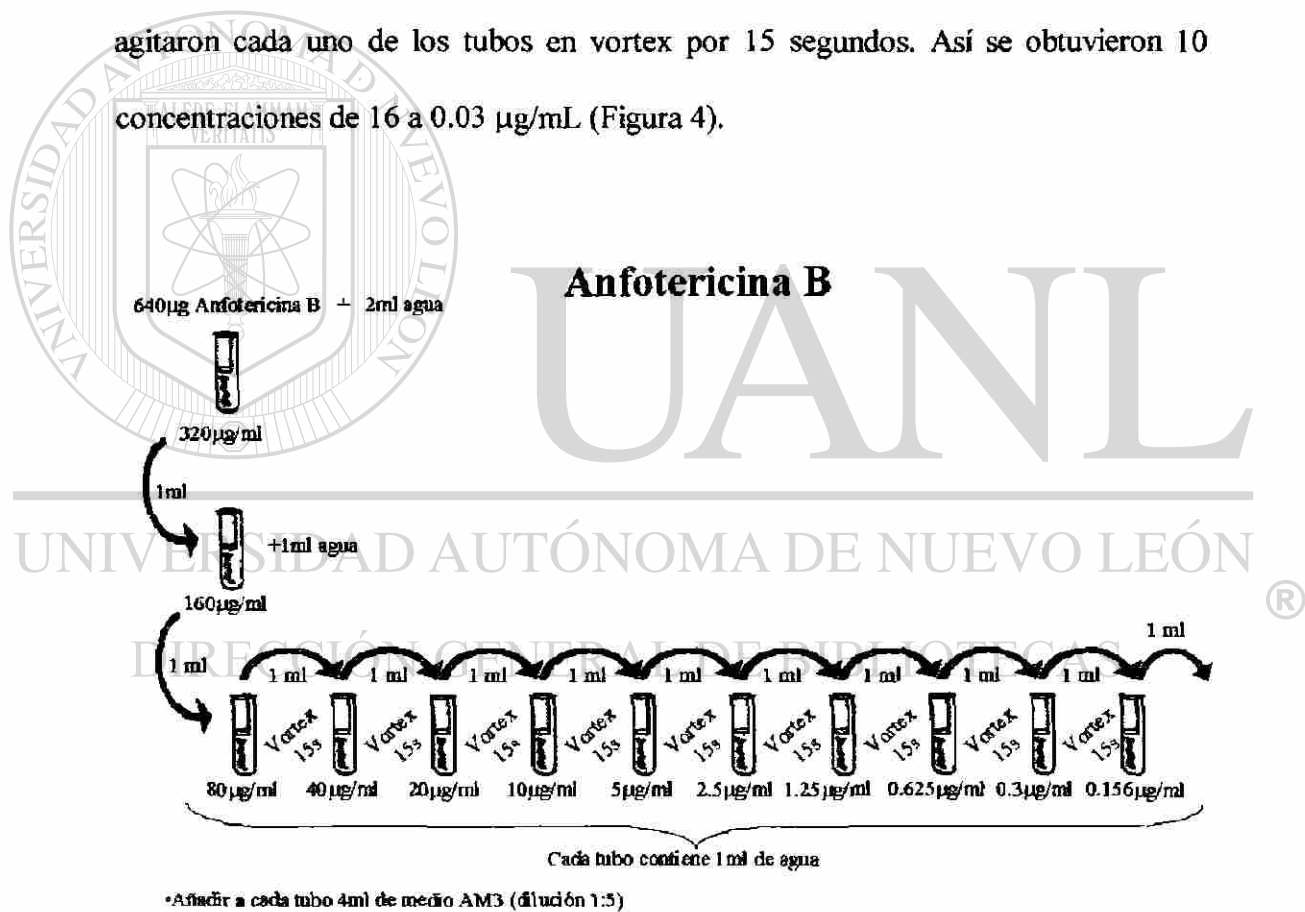


Figura 4. Diagrama que se siguió para preparar las diluciones seriadas de anfotericina B

Posteriormente se añadieron 100 μ L de cada dilución de antifúngico en los pozos correspondientes de una placa de microtitulación de 96 pozos de fondo curvo como se muestra en el siguiente diagrama:

Tabla 5. Esquema de llenado de las placas de poliestireno con diluciones de anfotericina B

100 μ L 16 μ g/mL	100 μ L 8 μ g/mL	100 μ L 4 μ g/mL	100 μ L 2 μ g/mL	100 μ L 1 μ g/mL	100 μ L 0.5 μ g/mL	100 μ L 0.25 μ g/mL	100 μ L 0.125 μ g/mL	100 μ L 0.06 μ g/mL	100 μ L 0.03 μ g/mL	100 μ L Agua	100 μ L M3
100 μ L 16 μ g/mL	100 μ L 8 μ g/mL	100 μ L 4 μ g/mL	100 μ L 2 μ g/mL	100 μ L 1 μ g/mL	100 μ L 0.5 μ g/mL	100 μ L 0.25 μ g/mL	100 μ L 0.125 μ g/mL	100 μ L 0.06 μ g/mL	100 μ L 0.03 μ g/mL	100 μ L Agua	100 μ L M3
100 μ L 16 μ g/mL	100 μ L 8 μ g/mL	100 μ L 4 μ g/mL	100 μ L 2 μ g/mL	100 μ L 1 μ g/mL	100 μ L 0.5 μ g/mL	100 μ L 0.25 μ g/mL	100 μ L 0.125 μ g/mL	100 μ L 0.06 μ g/mL	100 μ L 0.03 μ g/mL	100 μ L Agua	100 μ L M3
100 μ L 16 μ g/mL	100 μ L 8 μ g/mL	100 μ L 4 μ g/mL	100 μ L 2 μ g/mL	100 μ L 1 μ g/mL	100 μ L 0.5 μ g/mL	100 μ L 0.25 μ g/mL	100 μ L 0.125 μ g/mL	100 μ L 0.06 μ g/mL	100 μ L 0.03 μ g/mL	100 μ L Agua	100 μ L M3
100 μ L 16 μ g/mL	100 μ L 8 μ g/mL	100 μ L 4 μ g/mL	100 μ L 2 μ g/mL	100 μ L 1 μ g/mL	100 μ L 0.5 μ g/mL	100 μ L 0.25 μ g/mL	100 μ L 0.125 μ g/mL	100 μ L 0.06 μ g/mL	100 μ L 0.03 μ g/mL	100 μ L Agua	100 μ L M3
100 μ L 16 μ g/mL	100 μ L 8 μ g/mL	100 μ L 4 μ g/mL	100 μ L 2 μ g/mL	100 μ L 1 μ g/mL	100 μ L 0.5 μ g/mL	100 μ L 0.25 μ g/mL	100 μ L 0.125 μ g/mL	100 μ L 0.06 μ g/mL	100 μ L 0.03 μ g/mL	100 μ L Agua	100 μ L M3
100 μ L 16 μ g/mL	100 μ L 8 μ g/mL	100 μ L 4 μ g/mL	100 μ L 2 μ g/mL	100 μ L 1 μ g/mL	100 μ L 0.5 μ g/mL	100 μ L 0.25 μ g/mL	100 μ L 0.125 μ g/mL	100 μ L 0.06 μ g/mL	100 μ L 0.03 μ g/mL	100 μ L Agua	100 μ L M3
100 μ L 16 μ g/mL	100 μ L 8 μ g/mL	100 μ L 4 μ g/mL	100 μ L 2 μ g/mL	100 μ L 1 μ g/mL	100 μ L 0.5 μ g/mL	100 μ L 0.25 μ g/mL	100 μ L 0.125 μ g/mL	100 μ L 0.06 μ g/mL	100 μ L 0.03 μ g/mL	100 μ L Agua	100 μ L M3

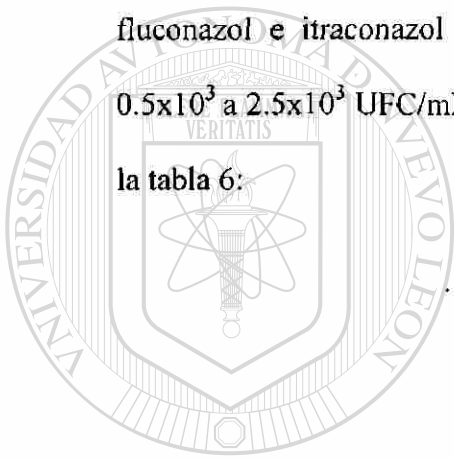
En la columna 11 se colocaron 100 μ l de agua como control de solvente y en

la columna 12 se colocaron 100 μ l de medio de cultivo AM3 como control de medio de cultivo. Finalmente estas placas preparadas con el antifúngico se etiquetaron y se guardaron en congelación a -20°C

3.5.2. Inoculación de las placas de antifúngico

Se hicieron suspensiones equivalentes a la turbidez del tubo 0.5 de McFarland para cada una de las 20 cepas de *Candida parapsilosis* recolectadas y las 2 cepas control *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258, siguiendo el procedimiento descrito en el apéndice B. De cada inóculo estandarizado

espectrofotométricamente se tomaron 20 μL y se añadieron a 980 μL del medio de cultivo correspondiente según el antifúngico utilizado para lograr una dilución 1:50, posteriormente se realizó una dilución más, tomando 250 μL de la dilución anterior y colocándolos en 4,750 μL del medio de cultivo correspondiente para lograr una dilución 1:20 y con esto tener un inóculo estandarizado de aproximadamente 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL. Finalmente se colocaron 100 μL de esta última dilución en cada pozo de la fila correspondiente de las placas preparadas con anfotericina B, fluconazol e itraconazol quedando una concentración final de aproximadamente 0.5×10^3 a 2.5×10^3 UFC/mL en cada pozo. La distribución quedó según se muestra en la tabla 6:



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 6. Esquema de inoculación de las placas de poliestireno previamente preparadas con diluciones de antifúngico.

[A]-1 C-1	[A]-2 C-1	[A]-3 C-1	[A]-4 C-1	[A]-5 C-1	[A]-6 C-1	[A]-7 C-1	[A]-8 C-1	[A]-9 C-1	[A]-10 C-1	Ctrl. Solv. C-1	Ctrl. Medio C-1
[A]-1 C-2	[A]-2 C-2	[A]-3 C-2	[A]-4 C-2	[A]-5 C-2	[A]-6 C-2	[A]-7 C-2	[A]-8 C-2	[A]-9 C-2	[A]-10 C-2	Ctrl. Solv. C-2	Ctrl. Medio C-2
[A]-1 C-3	[A]-2 C-3	[A]-3 C-3	[A]-4 C-3	[A]-5 C-3	[A]-6 C-3	[A]-7 C-3	[A]-8 C-3	[A]-9 C-3	[A]-10 C-3	Ctrl. Solv. C-3	Ctrl. Medio C-3
[A]-1 C-4	[A]-2 C-4	[A]-3 C-4	[A]-4 C-4	[A]-5 C-4	[A]-6 C-4	[A]-7 C-4	[A]-8 C-4	[A]-9 C-4	[A]-10 C-4	Ctrl. Solv. C-4	Ctrl. Medio C-4
[A]-1 C-5	[A]-2 C-5	[A]-3 C-5	[A]-4 C-5	[A]-5 C-5	[A]-6 C-5	[A]-7 C-5	[A]-8 C-5	[A]-9 C-5	[A]-10 C-5	Ctrl. Solv. C-5	Ctrl. Medio C-5
[A]-1 C-6	[A]-2 C-6	[A]-3 C-6	[A]-4 C-6	[A]-5 C-6	[A]-6 C-6	[A]-7 C-6	[A]-8 C-6	[A]-9 C-6	[A]-10 C-6	Ctrl. Solv. C-6	Ctrl. Medio C-6
[A]-1 Ctrl C.p	[A]-2 Ctrl C.p	[A]-3 Ctrl C.p	[A]-4 Ctrl C.p	[A]-5 Ctrl C.p	[A]-6 Ctrl C.p	[A]-7 Ctrl C.p	[A]-8 Ctrl C.p	[A]-9 Ctrl C.p	[A]-10 Ctrl C.p	Ctrl. Solv. Ctrl C.p	Ctrl. Medio ctrl. C.p
[A]-1 Ctrl C.k	[A]-2 Ctrl C.k	[A]-3 Ctrl C.k	[A]-4 Ctrl C.k	[A]-5 Ctrl C.k	[A]-6 Ctrl C.k	[A]-7 Ctrl C.k	[A]-8 Ctrl C.k	[A]-9 Ctrl C.k	[A]-10 Ctrl C.k	Ctrl. Solv. Ctrl C.k	ctrl. Medio ctrl. C.k

C-# = Cepa número.

[A] - concentración de antifúngico.

Ctrl. C.p = cepa control de *Candida parapsilosis*

Ctrl. C.k = cepa control de *Candida krusei*

Ctrl. Solv. = control de solvente

Ctrl. Medio = control de medio de cultivo.

3.5.3. Condiciones de incubación de las placas inoculadas

Se incubaron las placas inoculadas a 37° C durante 24 y 48 horas.

3.5.4. Lectura de CMI y CML

Se tomó lectura (a las 24 y 48 horas) de concentración mínima inhibitoria para todos los antifúngicos utilizados.

Se tomó lectura (a las 24 y 48 horas) de concentración mínima letal en el caso de anfotericina B utilizando estriado en placa para descartar crecimiento.

3.5.4.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Se tomó la placa después de las 24 horas de incubación, y se colocó en espejo para placas de hemoaglutinación para poder observar claramente los cambios de turbidez en el fondo de cada uno de los pozos de la placa. Se tomó como punto de corte aquella concentración en la que se observa una disminución marcada de turbidez, por lo tanto la concentración mínima inhibitoria fue aquella concentración de antifúngico que produce una disminución marcada de crecimiento celular. Esta lectura se corroboró a las 48 horas y fue tomada como lectura final.

3.5.4.2 Determinación de la concentración mínima letal.

Se tomaron 50 μ L a partir del primer pozo de la microplaca donde no se detectó turbidez, luego se depositaron y se estriaron en una caja de petri con agar saboureaud dextrosa. Se siguió el mismo procedimiento para las tres diluciones que le siguieron a la primera en la que no se detectó crecimiento. Luego se incubaron estas placas durante 24 y 48 horas. A las 24 horas se sacaron las placas para comprobar cual es la dilución en la que ya no hubo crecimiento de colonias. La placa en la que ya no se detectó crecimiento de colonias correspondió a la concentración mínima letal o la concentración de antifúngico que impidió el crecimiento celular. Esta lectura se corroboró a las 48 horas y fue tomada como lectura final

3.6 Curva de crecimiento de biofilms de

Candida parapsilosis en placas

de microtitulación

Se tomó un inóculo grande de tres de las 20 cepas recolectadas de *Candida parapsilosis* (2992, 5736, 5892) y de la cepa control de *Candida parapsilosis* y se inocularon 4 matraces Erlen Meyer conteniendo 20 mL de medio soya tripticasa con 1% de extracto de levadura cada uno. Una vez inoculados los matraces, se incubaron a 37°C en agitación constante durante 24 horas con el fin de obtener suficiente masa celular de cultivos jóvenes. Una vez pasado el tiempo de incubación, se vació el contenido de los matraces en tubos falcon de 50 mL con tapón de rosca y se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se añadieron 30 mL de PBS para resuspender la masa celular, luego se centrifugaron

bajo las mismas condiciones que en el paso anterior. Este procedimiento de lavado se efectuó una vez más, se desechó el sobrenadante y se pasó al ajuste de inóculos para obtener un aproximado de 1×10^6 UFC/mL de cada cepa siguiendo el procedimiento explicado en el Apéndice B. Una vez ajustado el inóculo, se tomaron 100 μ l de células y se añadieron a 4.9 mL de medio RPMI 1640 para obtener una dilución 1:50 y con esto 2.0×10^4 UFC/mL. Se tomaron 100 μ l de esta última dilución y se colocaron en cada uno de los pozos correspondientes de las placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano. Tabla 7.

Una vez inoculadas las placas se incubaron a 37°C y se tomaron lecturas de absorbancia en lector de ELISA a 490nm de longitud de onda para la curva de crecimiento a las 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 40, 48, 56, 64 y 72 horas usando el método colorimétrico con XTT.

NOTA: Este experimento se llevó a cabo tres veces por triplicado.

Tabla 7. Esquema de inoculación de las placas de poliestireno con las cepas elegidas para curva de crecimiento

	4h	8h	12h	16h	20h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1
C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1
C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1
Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.
C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2
C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2
C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2
Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.	Bco.

C-# = Cepa número

Bco. = Blanco

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.6.1. Método colorimétrico con XTT

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron las placas y se lavaron los pozos de la fila correspondiente 2 veces con PBS para retirar las células no adherentes. Posteriormente se añadieron 100 µL de XTT/menadiona 1 µM a los pozos lavados y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Concluidas las 2 horas de reacción, se registró la absorbancia producida en el lector de ELISA a 490 nm de

y se colocaron en cada uno de los pozos correspondientes de las placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano. Tabla 8.

Una vez inoculadas las placas se incubaron a 37°C durante 17 horas y se tomaron lecturas para determinar que cepas fueron formadoras de biofilm usando el método colorimétrico con XTT.

NOTA: Este experimento se llevó a cabo tres veces por triplicado.

Tabla 8. Esquema de inoculación de las placas de poliestireno para prueba de formación de biofilms a las 17 horas.

C-1		C-3		C-5		C-7		C-9		C-11	
C-1		C-3		C-5		C-7		C-9		C-11	
C-1		C-3		C-5		C-7		C-9		C-11	
Bco.		Bco.		Bco.		Bco.		Bco.		Bco.	
C-2		C-4		C-6		C-8		C-10		C-12	
C-2		C-4		C-6		C-8		C-10		C-12	
C-2		C-4		C-6		C-8		C-10		C-12	
Bco.		Bco.		Bco.		Bco.		Bco.		Bco.	

C-# - Cepa número

Bco. = Blanco

3.7.1. Método colorimétrico con XTT

Después de transcurridas las 17 horas de incubación, se tomaron las placas y se lavaron los pozos 2 veces con PBS para retirar las células no adherentes. Posteriormente se añadieron 100 µl de XTT/menadiona 1 µM a los pozos lavados y

se incubaron durante 2 horas a 37°C. Concluidas las 2 horas de reacción, se registró la absorbancia producida en el lector de ELISA a 490 nm de longitud de onda.

3.8 Pruebas de susceptibilidad *in vitro* con antifúngicos en biofilms de *Candida parapsilosis* en placas de microtitulación

Se tomó un inóculo grande de las 7 cepas formadoras de biofilm de *Candida parapsilosis* y de la cepas control de *Candida parapsilosis* se inocularon 8 matraces Erlen Meyer conteniendo 20 mL de medio soya tripticasa con 1% de extracto de levadura cada uno. Una vez inoculados los matraces, se incubaron a 37°C en agitación constante durante 24 horas con el fin de obtener suficiente masa celular de cultivos jóvenes. Una vez pasado el tiempo de incubación, se vació el contenido de

los matraces en tubos falcon de 50 mL con tapón de rosca y se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se añadieron 30 mL de PBS para resuspender la masa celular, luego se centrifuga bajo las mismas condiciones que en el paso anterior. Este procedimiento de lavado se efectuó una vez más, se desechó el sobrenadante y se pasó al ajuste de inóculos para obtener un aproximado de 1×10^6 UFC/mL de cada cepa siguiendo el procedimiento explicado en el Apéndice B. Una vez ajustado el inóculo, se tomaron 100 μ L de células y se añadieron a 4.9 mL de medio RPMI 1640 para obtener una dilución 1:50 y con esto 2.0×10^4 UFC/mL. Se tomaron 100 μ L de esta última dilución y se colocaron en cada

uno de los pozos correspondientes de las placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano. Tabla 9.

NOTA: Este experimento se llevó a cabo tres veces por triplicado.

Tabla 9. Esquema de inoculación de las placas de poliestireno para formación de *biofilms* a las 17 horas.

Las placas se prepararon por duplicado.

C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	Bco.
C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	C-1	Bco.
C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	Bco.
C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	C-2	Bco.
C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	Bco.
C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	C-3	Bco.

C-# = Cepa número
Bco. = Blanco

Una vez inoculadas las placas se incubaron a 37°C durante 17 horas. Pasadas las 17 horas de formación de biofilm, se lavaron los pozos 2 veces con 200 µL de PBS, se retiró el PBS mediante aspirado con micropipeta con cuidado de no raspar el biofilm. Una vez secos los biofilms se añadieron 100 µL de la dilución del antifúngico correspondiente en cada una de las placas, Tabla 10 (las diluciones se prepararon siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para la prueba de antifúngicos en células planctónicas).

Tabla 10. Esquema de llenado de las placas de poliestireno con biofilm con antifúngicos para pruebas de susceptibilidad.

[A]-1	[A]-2	[A]-3	[A]-4	[A]-5	[A]-6	[A]-7	[A]-8	[A]-9	[A]-10	RPMI	RPMI
[A]-1	[A]-2	[A]-3	[A]-4	[A]-5	[A]-6	[A]-7	[A]-8	[A]-9	[A]-10	RPMI	RPMI
[A]-1	[A]-2	[A]-3	[A]-4	[A]-5	[A]-6	[A]-7	[A]-8	[A]-9	[A]-10	RPMI	RPMI
[A]-1	[A]-2	[A]-3	[A]-4	[A]-5	[A]-6	[A]-7	[A]-8	[A]-9	[A]-10	RPMI	RPMI
[A]-1	[A]-2	[A]-3	[A]-4	[A]-5	[A]-6	[A]-7	[A]-8	[A]-9	[A]-10	RPMI	RPMI
[A]-1	[A]-2	[A]-3	[A]-4	[A]-5	[A]-6	[A]-7	[A]-8	[A]-9	[A]-10	RPMI	RPMI

[A] – concentración de antifúngico.

RPMI = medio de cultivo RPMI 1640

Una vez aplicadas las diluciones de antifúngico se colocaron las placas en incubación a 37°C, uno de los juegos de placas se incubó durante 24 horas y el otro juego se incubó durante 48 horas.

3.8.1. Método colorimétrico con XTT

Después de transcurridas las 24 o 48 horas de incubación, se tomaron las placas y se lavaron los pozos 2 veces con PBS para retirar todo el antifúngico. Posteriormente se añadieron 100 µL de XTT/menadiona 1 µM a los pozos lavados y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Concluidas las 2 horas de reacción, se registró la absorbancia producida en el lector de ELISA a 490 nm de longitud de onda.

3.9 Curva de crecimiento de biofilms de

Candida parapsilosis

en catéter

3.9.1. Preparación de cortes de catéter

Nota: los catéteres que se utilizaron en este trabajo fueron de tres materiales distintos: cloruro de polivinilo, silicón y látex.

El corte de los catéteres se hizo dentro de la campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas para mantener la esterilidad de fábrica del catéter. Se retiró el catéter de su envoltura original, posteriormente se realizaron los cortes de catéter de 0.5 cm utilizando un bisturí con hoja estéril de 20 procurando uniformidad en la medida de cada corte, finalmente los cortes de catéter se guardaron dentro de frascos estériles etiquetados como “PVC, Silicón o Látex” según correspondía. Estos frascos

se almacenaron a temperatura ambiente hasta el momento en que los cortes de catéter fueron utilizados.

3.9.2. Preparación de los tubos con corte de catéter

Se prepararon 30 tubos falcon para cada material de catéter y para cada cepa. Para colocar el corte de catéter dentro del tubo se trabajó dentro de la campana de flujo laminar. Se tomó uno de los cortes de catéter del frasco usando un aplicador de madera estéril, se abrió el tubo falcon y se colocó dentro el corte de catéter, finalmente se cerró el tubo presionando el tapón al primer tope.

3.9.3. Curva de crecimiento de *Candida parapsilosis* en cortes de catéter

Se tomó un inóculo grande de tres de las 20 cepas recolectadas de *Candida parapsilosis* (2992, 5736, 5892) y se inocularon 4 matraces Erlen Meyer conteniendo 20 mL de medio soya tripticasa con 1% de extracto de levadura cada uno. Una vez inoculados los matraces, se incubaron a 37°C en agitación constante durante 24 horas con el fin de obtener suficiente masa celular de cultivos jóvenes.

Una vez pasado el tiempo de incubación, se vació el contenido de los matraces en tubos falcon de 50 mL con tapón de rosca y se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se añadieron 30 mL de PBS para resuspender la masa celular, luego se centrifugaron bajo las mismas condiciones que en el paso anterior. Este procedimiento de lavado se efectuó una vez más, se desechó el sobrenadante y se pasó al ajuste de inóculos para obtener un aproximado de 1×10^6

UFC/mL de cada cepa siguiendo el procedimiento explicado en el Apéndice B. Una vez ajustado en inóculo, se tomaron 700 μ L de células y se añadieron a 34.3 mL de medio RPMI 1640 para obtener una dilución 1:50 y con esto 2.0×10^4 UFC/mL. Se colocó 1mL de esta última dilución en cada uno de los 30 tubos con catéter de cloruro de polivinilo preparados previamente para la cepa correspondiente.

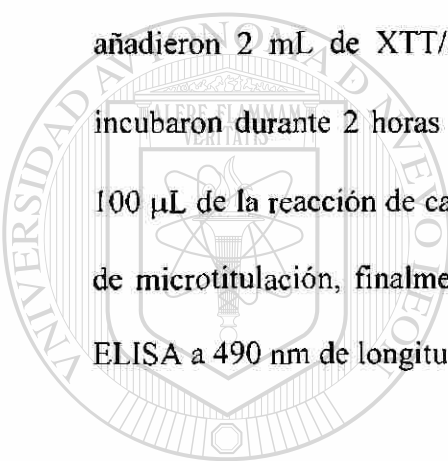
Una vez inoculados los tubos se incubaron a 37°C y se tomaron lecturas para la curva de crecimiento a las 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 40, 48 y 56 horas usando el método colorimétrico con XTT.

NOTA: Este experimento se llevó a cabo tres veces por triplicado.

Esta misma metodología se utilizó para las pruebas en catéteres de silicón y látex.

3.9.4 Método colorimétrico con XTT

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron los tubos y se retiraron los cortes de catéter, los cuales se colocaron en tubos estériles y se realizaron 2 lavados con PBS para retirar todo el antifúngico. Posteriormente se añadieron 2 mL de XTT/menadiona 1 μ M a los cortes de catéter lavados y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Concluidas las 2 horas de reacción, se tomaron 100 μ L de la reacción de cada uno de los tubos y se colocaron en pozos de una placa de microtitulación, finalmente se registró la absorbancia producida en el lector de ELISA a 490 nm de longitud de onda.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

3.10 Formación de biofilms de *Candida parapsilosis*

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

en cortes de catéter a las 24

horas de crecimiento

3.10.1. Preparación de los tubos con corte de catéter

Se prepararon 3 tubos falcon de 5 mL con tapón de presión para cada material de catéter y para cada cepa. Los tubos se prepararon de la misma forma que en el punto 3.9.2

3.10.2. Formación de biofilms a las 24 horas de crecimiento

Se tomó un inóculo grande de las 20 cepas recolectadas de *Candida parapsilosis* y de las cepas control de *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* y se inocularon 22 matraces Erlen Meyer conteniendo 20 mL de medio soya tripticasa con 1% de extracto de levadura cada uno. Una vez inoculados los matraces, se incubaron a 37°C en agitación constante durante 24 horas con el fin de obtener suficiente masa celular de cultivos jóvenes. Una vez pasado el tiempo de incubación, se vació el contenido de los matraces en tubos falcon de 50 mL y se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se añadieron 30 mL de PBS para resuspender la masa celular, luego se centrifugó bajo las mismas condiciones que en el paso anterior. Este procedimiento de lavado se efectuó una vez más, se desechó el sobrenadante y se pasó al ajuste de inóculos para obtener un aproximado de 1×10^6 UFC/mL de cada cepa siguiendo el procedimiento explicado

en el Apéndice B. Una vez ajustado en inóculo, se tomaron 100 μ L de células y se añadieron a 4.9 mL de medio RPMI 1640 para obtener una dilución 1:50 y con esto 2.0×10^4 UFC/mL. Se colocó 1 mL de esta última dilución en cada uno de los 3 tubos con catéter de cloruro de polivinilo preparados previamente para la cepa correspondiente.

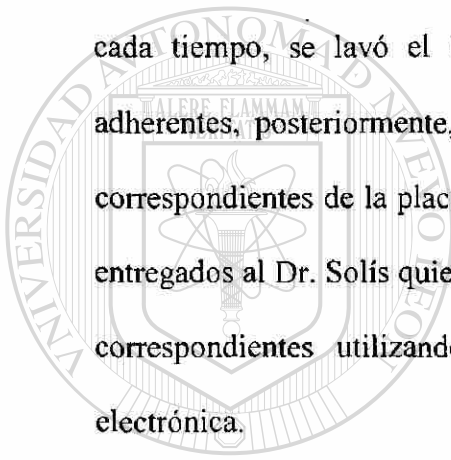
Una vez inoculados los tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas y se tomaron lecturas para determinar que cepas son formadoras de biofilm usando el método colorimétrico con XTT siguiendo el mismo procedimiento del punto 3.9.4

NOTA: Este experimento se llevó a cabo tres veces por triplicado.

3.11 Microfotografía de biofilms

Para lo relativo a microfotografía de los biofilms se contó con la ayuda del Dr. Juan Manuel Solís del departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se utilizaron placas para cultivo de tejidos de 24 pozos para formar biofilms de las cepas 2992, 5736 y 5892, de 4, 6, 12 y 17 horas cada uno. Una vez concluido cada tiempo, se lavó el biofilm 2 veces con PBS para retirar las células no adherentes, posteriormente, se añadieron 2 mL de formaldehído 4% al los pozos correspondientes de la placa con el objetivo de fijar las células. Los biofilms fueron entregados al Dr. Solís quien realizó las tinciones y las tomas de las microfotografías correspondientes utilizando microscopía de contraste de fases y microscopía electrónica.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Pruebas de susceptibilidad *in vitro* con antifúngicos

en células planctónicas de

Candida parapsilosis

4.1.1 ITRACONAZOL (Concentración mínima inhibitoria)

Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria en µg/mL después de 24 y 48 horas de exposición a itraconazol.

Cepa	24 h	Cepa	48 h
1531	0.03125	2992	0.0625
5729	0.03125	5736	0.0625
5808	0.03125	381	0.125
381	0.0625	2830	0.125
2830	0.0625	2832	0.125
2832	0.0625	3202	0.125
2992	0.0625	4775	0.125
3202	0.0625	5013	0.125
4775	0.0625	5727	0.125
5727	0.0625	5728	0.125
5728	0.0625	5729	0.125
5736	0.0625	5737	0.125
5737	0.0625	5808	0.125
5892	0.0625	5890	0.125
3307	0.125	5891	0.125
5013	0.125	5892	0.125
5890	0.125	1531	0.25
5891	0.125	3307	0.25
5732	0.25	5732	0.5
6234	0.5	6234	1.0
Media geométrica	0.0769	Media geométrica	0.1487
CMI 50%*	0.0625	CMI 50%	0.125
CMI 90%**	0.125	CMI 90%	0.25
Rango	0.03125-0.5	Rango	0.0625-1.0

*Concentración mínima necesaria para inhibir el 50% de las cepas de *C. parapsilosis*.

**Concentración mínima necesaria para inhibir el 90% de las cepas de *C. parapsilosis*.

4.1.2 FLUCONAZOL (Concentración mínima inhibitoria)

Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria en µg/mL después de 24 y 48 horas de exposición a fluconazol

Cepa	24 h	Cepa	48 h
5013	0.5	5013	0.5
5729	0.5	5736	1.0
5736	0.5	5892	2.0
1531	1.0	5808	2.0
4775	1.0	5729	2.0
5808	1.0	4775	2.0
5892	1.0	2992	2.0
381	2.0	2830	2.0
2830	2.0	1531	2.0
2992	2.0	5891	4.0
3202	2.0	5737	4.0
5727	2.0	5728	4.0
5728	2.0	5727	4.0
5737	2.0	3202	4.0
5890	2.0	2832	4.0
2832	4.0	381	4.0
5732	4.0	5890	8.0
5891	4.0	5732	8.0
3307	8.0	3307	8.0
6234	8.0	6234	16.0
Media geométrica	1.8025	Media geométrica	3.1383
CMI 50%*	2.0	CMI 50%	4.0
CMI 90%**	4.0	CMI 90%	8.0
Rango	0.5-8.0	Rango	0.5-16.0

*Concentración mínima necesaria para inhibir el 50% de las cepas de *C. parapsilosis*.

**Concentración mínima necesaria para inhibir el 90% de las cepas de *C. parapsilosis*.

4.1.3 ANFOTERICINA B (Concentración mínima inhibitoria)

Tabla 13. Concentración mínima inhibitoria en $\mu\text{g/mL}$ después de 24 y 48 horas de exposición a anfotericina B

Cepa	24 h	Cepa	48 h
2830	0.125	2830	0.25
2832	0.125	2832	0.25
2992	0.125	2992	0.25
5891	0.125	3202	0.25
1531	0.25	4775	0.25
3202	0.25	5727	0.25
4775	0.25	5736	0.25
5013	0.25	5891	0.25
5727	0.25	381	0.5
5729	0.25	1531	0.5
5732	0.25	3307	0.5
5736	0.25	5013	0.5
5737	0.25	5729	0.5
5804	0.25	5732	0.5
5890	0.25	5737	0.5
5892	0.25	5804	0.5
6234	0.25	5890	0.5
381	0.5	5892	0.5
3307	0.5	6234	0.5
5728	1.0	5728	1.0
Media geométrica	0.25	Media geométrica	0.3923
CMI 50%*	0.25	CMI 50%	0.5
CMI 90%**	0.5	CMI 90%	0.5
Rango	0.125-1.0	Rango	0.25-1.0

*Concentración mínima necesaria para inhibir el 50% de las cepas de *C. parapsilosis*.

**Concentración mínima necesaria para inhibir el 90% de las cepas de *C. parapsilosis*.

4.1.4 ANFOTERICINA B (Concentración mínima letal)

Tabla 14. Concentración mínima letal en $\mu\text{g/mL}$ después de 24 y 48 horas de exposición a anfotericina B

Cepa	24 h	Cepa	48 h
2830	0.5	3202	0.5
2832	0.5	4775	0.5
3202	0.5	2830	1.0
4775	0.5	2832	1.0
5891	0.5	3307	1.0
381	1.0	5728	1.0
2992	1.0	5890	1.0
3307	1.0	1531	2.0
5727	1.0	2992	2.0
5728	1.0	5727	2.0
5732	1.0	5732	2.0
5736	1.0	5736	2.0
5737	1.0	5892	2.0
5890	1.0	6234	2.0
6234	1.0	381	4.0
1531	2.0	5013	4.0
5013	2.0	5729	4.0
5804	2.0	5737	4.0
5892	2.0	5804	4.0
5729	4.0	5891	4.0
Media geométrica	1.0353	Media geométrica	1.8025
CML 50%*	1.0	CML 50%	2.0
CML 90%**	2.0	CML 90%	4.0
Rango	0.5-4.0	Rango	0.5-4.0

*Concentración mínima necesaria para matar el 50% de las cepas de *C. parapsilosis*.

**Concentración mínima necesaria para matar el 90% de las cepas de *C. parapsilosis*.

4.2 Curva de crecimiento de biofilms de

Candida parapsilosis en placas

de microtitulación

Tabla 15. Densidades ópticas registradas para curva de crecimiento.

Tiempo en h	2992	5736	5892	Ctrl. C.P.
2	-0.0028	-0.0013	-0.0036	-0.0033
4	-0.0089	-0.0082	-0.0037	-0.0028
6	-0.0122	-0.0082	-0.0016	0.0040
8	0.0048	-0.0001	0.0264	-0.0049
10	0.0193	0.0171	0.0683	-0.0010
12	0.0312	0.0271	0.1040	0.0022
14	0.0687	0.0309	0.1059	-0.0085
16	0.0898	0.0610	0.1160	-0.0123
18	0.1082	0.0853	0.1307	0.0000
20	0.1100	0.1013	0.1220	-0.0192
24	0.1184	0.1067	0.1120	0.0065
32	0.1391	0.0999	0.0922	0.0144
40	0.1265	0.0828	0.0926	0.0197
48	0.0944	0.0822	0.0916	0.0132
56	0.0808	0.0697	0.0743	0.0072
64	0.0688	0.0550	0.0690	0.0207
72	0.0656	0.0734	0.0582	0.0237

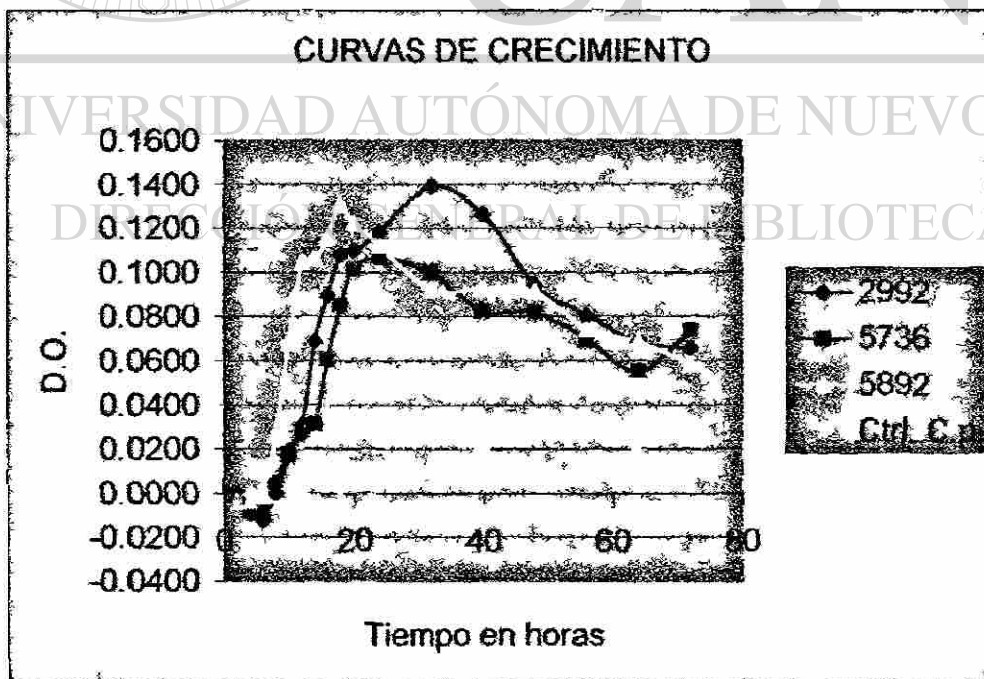


Figura 5. Curvas de crecimiento de las cepas 2992, 5736, 5892 y la cepa control de *Candida parapsilosis* en placas de poliestireno

4.3 Formación de biofilms de *Candida parapsilosis*
en placas de microtitulación a las
17 horas de crecimiento

Tabla 16. Densidades ópticas registradas para formación de biofilm a las 17 horas

Cepa	D.O.	Cepa	D.O.
381	0.0095	5729	0.0003
1531	-0.0087	5732	-0.0027
2830	0.0756	5736	0.0900
2832	0.1183	5737	-0.0070
2992	0.1403	5804	-0.0187
3202	0.1466	5890	-0.0190
3307	-0.0090	5891	-0.0023
4775	0.0910	5892	0.0800
5013	-0.0083	6234	0.0010
5727	-0.0137	C.K.	-0.0087
5728	-0.0123	C.P.	0.0093

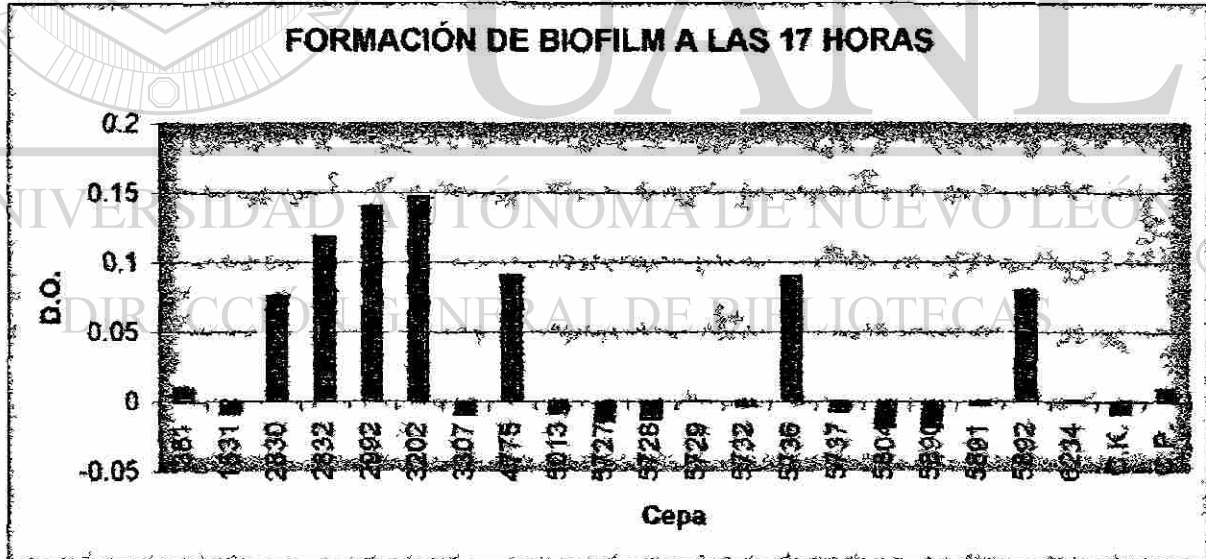


Figura 6. Esquema de formación de biofilms de las 20 cepas de *Candida parapsilosis* y las cepas control de *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* a las 17 horas de incubación en placa de poliestireno

4.4 Pruebas de susceptibilidad *in vitro* con antifúngico

en biofilms de *Candida parapsilosis*

en placas de microtitulación

4.4.1 ITRACONAZOL (Concentración mínima inhibitoria)

Tabla 17. Concentración mínima inhibitoria en µg/mL después de 24 y 48 horas de exposición a itraconazol

Cepa	24 h	Cepa	48 h
2992	0.5	5892	2
5892	1	2830	>16
2830	2	2832	>16
2832	>16	2992	>16
3202	>16	3202	>16
4775	>16	4775	>16
5736	>16	5736	>16
CMI 50%*	>16	CMI 50%	>16
CMI 90%**	>16	CMI 90%	>16
Rango	0.5->16	Rango	2->16

*Concentración mínima necesaria para inhibir el 50% de los biofilms de *C. parapsilosis*.

**Concentración mínima necesaria para inhibir el 90% de los biofilms de *C. parapsilosis*.

4.4.2 FLUCONAZOL (Concentración mínima inhibitoria)

Tabla 18. Concentración mínima inhibitoria en µg/mL después de 24 y 48 horas de exposición a fluconazol

Cepa	24 h	Cepa	48 h
2830	4	2830	4
5892	32	5736	16
2832	>64	5892	32
2992	>64	2832	>64
3202	>64	2992	>64
4775	>64	3202	>64
5736	>64	4775	>64
CMI 50%*	>64	CMI 50%	>64
CMI 90%**	>64	CMI 90%	>64
Rango	4->64.	Rango	4->64

*Concentración mínima necesaria para inhibir el 50% de los biofilms de *C. parapsilosis*.

**Concentración mínima necesaria para inhibir el 90% de los biofilms de *C. parapsilosis*.

4.4.3 ANFOTERICINA B (Concentración mínima inhibitoria)

Tabla 19. Concentración mínima inhibitoria en $\mu\text{g/mL}$ después de 24 y 48 horas de exposición a anfotericina B

Cepa	24 h	Cepa	48 h
2830	0.015	2830	0.015
2832	0.015	2832	0.0312
2992	0.0312	2992	0.0312
3202	0.0312	3202	0.0312
4775	0.125	4775	0.0625
5736	0.125	5736	0.125
5892	0.125	5892	0.125
Media geométrica	0.0459	Media geométrica	0.0461
CMI 50%*	0.0312	CMI 50%	0.0312
CMI 90%**	0.125	CMI 90%	0.125
Rango	0.015-0.125	Rango	0.015-0.125

*Concentración mínima necesaria para inhibir el 50% de los biofilms de *C. parapsilosis*.

**Concentración mínima necesaria para inhibir el 90% de los biofilms de *C. parapsilosis*.

4.5 Curva de crecimiento de biofilms de
Candida parapsilosis
en catéter

Tabla 20. Densidades ópticas registradas para curva de crecimiento en catéter de Cloruro de polivinilo

Catéter de Cloruro de Polivinilo			
Tiempo en horas	2992	5736	5892
4	-0.0027	-0.0052	-0.0072
8	0.0050	0.0145	0.0075
17	0.0040	0.0075	0.0080
24	0.0237	0.0017	-0.0043

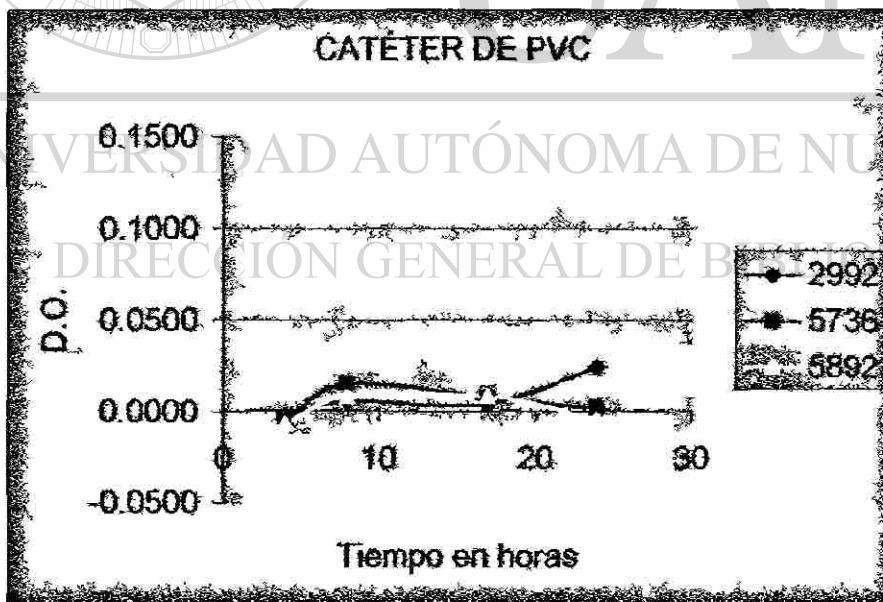


Figura 7. Curvas de crecimiento de las cepas 2992, 5736, 5892 en catéteres de cloruro de polivinilo

Tabla 21. Densidades ópticas registradas para curva de crecimiento en catéter de silicón

Catéter Silicón			
Tiempo en horas	2992	5736	5892
4	-0.0017	-0.0032	-0.0062
8	0.0090	0.0030	0.0050
17	0.0070	0.0105	0.0085
24	0.0152	0.0022	0.0012

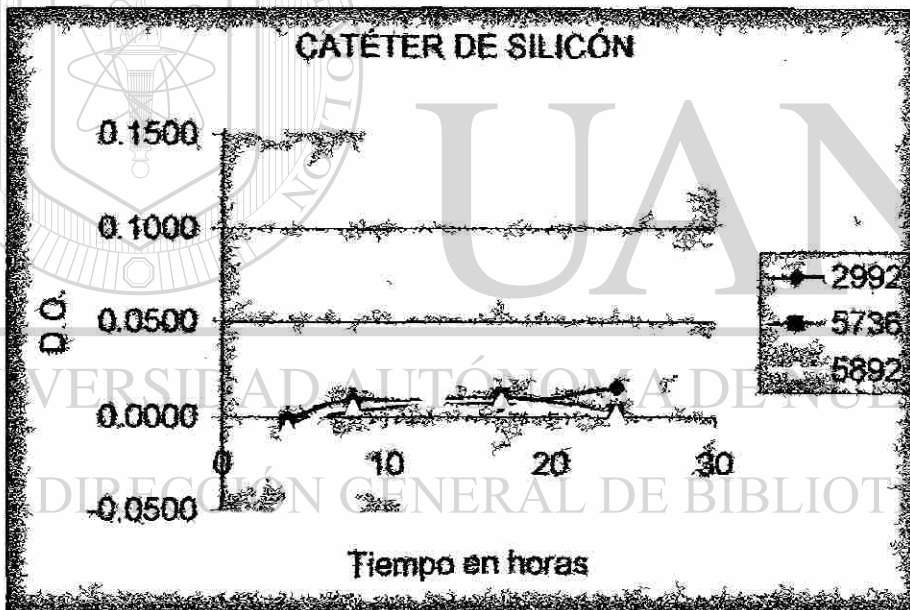


Figura 8. Curvas de crecimiento de las cepas 2992, 5736, 5892 en catéteres de silicón

Tabla 22. Densidades ópticas registradas para curva de crecimiento en catéter de látex.

Catéter Látex			
Tiempo en horas	2992	5736	5892
4	-0.0057	-0.0002	-0.0027
8	0.0045	0.0115	0.0215
17	0.0125	0.0110	0.0230
24	0.0247	0.0117	0.0182

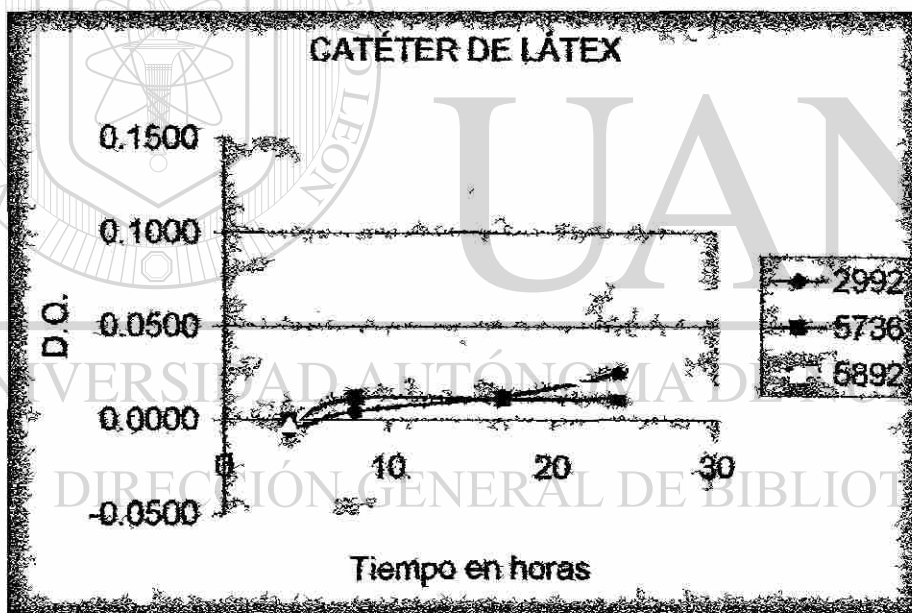


Figura 9. Curvas de crecimiento de las cepas 2992, 5736, 5892 en catéteres de látex.

4.6 Formación de biofilms de *Candida parapsilosis*

en cortes de catéter a las 24

horas de crecimiento

Tabla 23. Densidades ópticas registradas para todas las cepas en los diferentes catéteres

Cepa	PVC	silicón	látex
381	-0.0050	-0.0115	0.0015
1531	-0.0070	-0.0095	-0.0015
2830	0.0170	0.0380	0.0155
2832	0.0450	0.0350	0.0485
2992	0.0197	0.0152	0.0247
3202	0.0120	-0.0015	0.0315
3307	0.0025	0.0205	0.0140
4775	0.0125	0.0205	0.0300
5013	0.0115	-0.0050	0.0010
5727	-0.0020	-0.0060	0.0195
5728	0.0070	-0.0020	0.0105
5729	0.0115	0.0055	0.0145
5732	0.0400	0.0450	0.0430
5736	0.0017	0.0022	0.0117
5737	-0.0035	-0.0115	0.0155
5804	-0.0010	0.0030	0.0000
5890	0.0035	0.0015	0.0085
5891	0.0050	0.0105	0.0120
5892	0.0077	0.0012	0.0182
6234	0.0430	0.0390	0.0350
C.k.	0.0400	0.0430	0.0450
C.p	-0.0177	-0.0127	0.0080

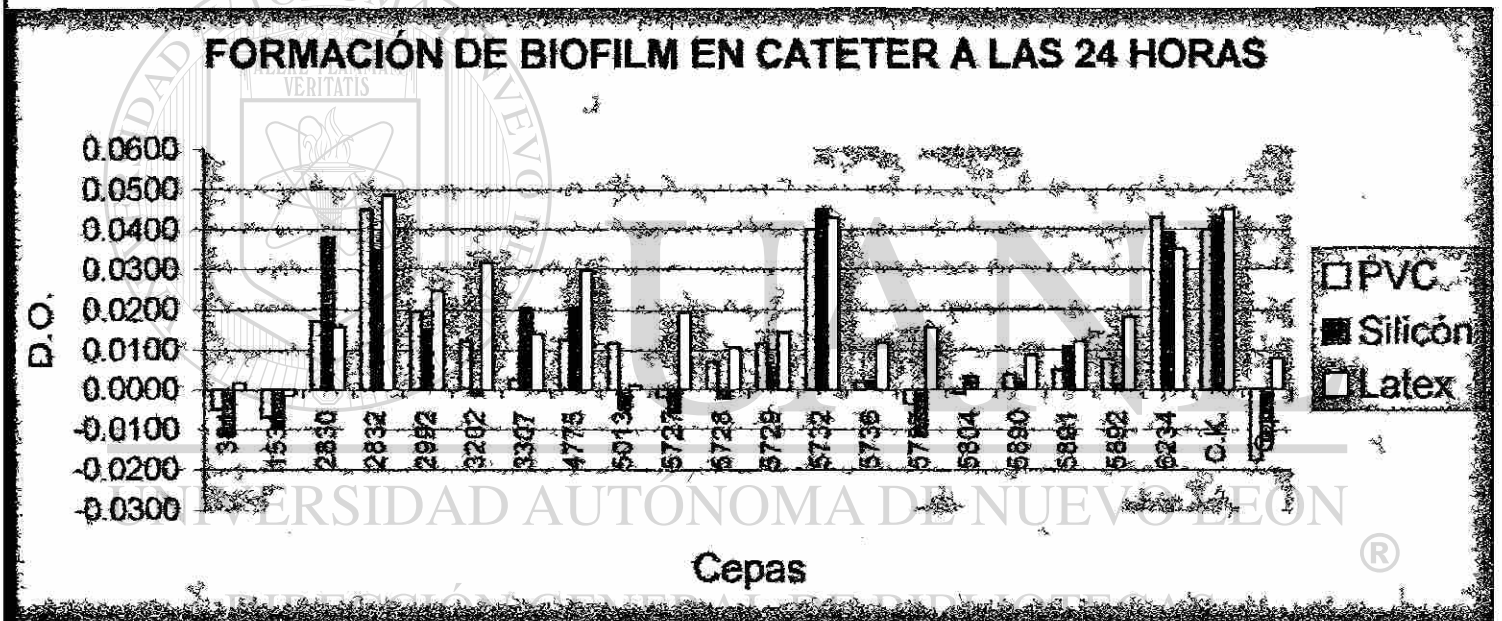


Figura 10. Esquema de formación de biofilms de las 20 cepas de *Candida parapsilosis* y las cepas control de *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* a las 24 horas de incubación en catéteres de PVC, Silicón y Látex.

4.7 Microfotografía de biofilms de *Candida parapsilosis*

4.7.1 Microfotografía de contraste de fases

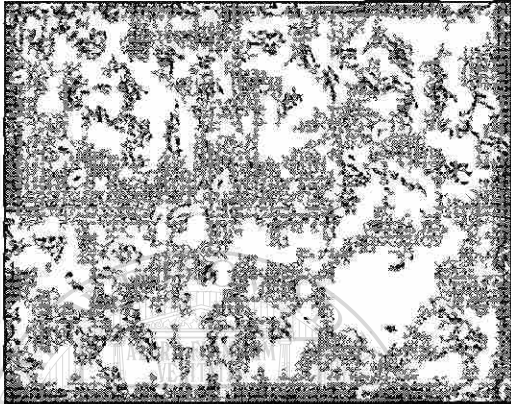


Figura 11. Biofilm de 6h de *C. parapsilosis* cepa 5736

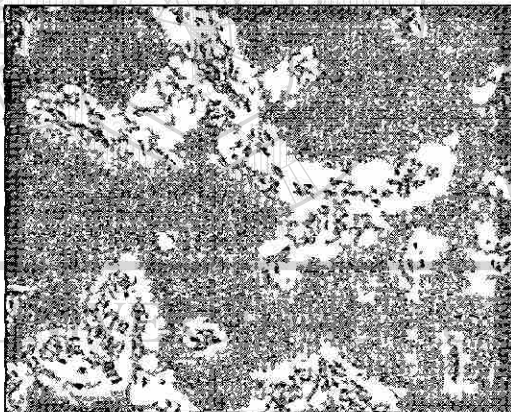


Figura 12. Biofilm de 12h de *C. parapsilosis* cepa 5736

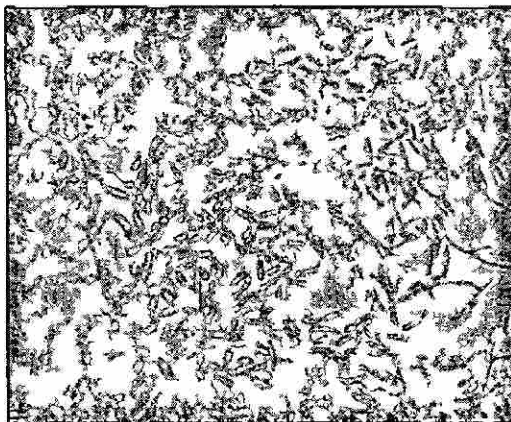


Figura 13. Biofilm de 17h de *C. parapsilosis* cepa 5736

4.7.2 Microfotografía electrónica de transmisión

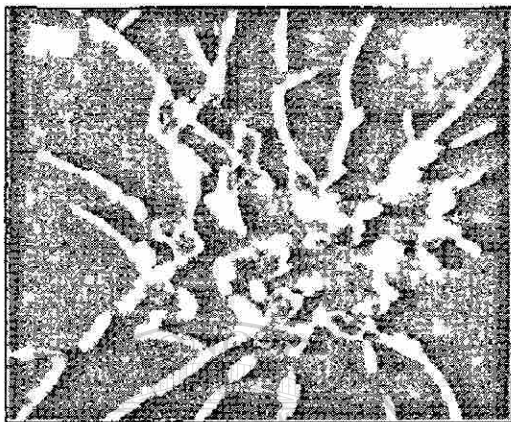


Figura 14. Biofilm de 6h de *C. parapsilosis* cepa 5736

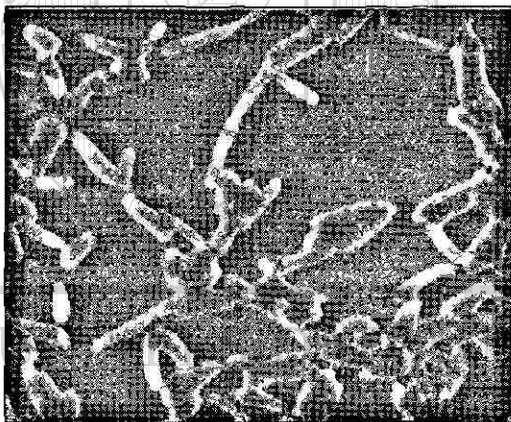


Figura 15. Biofilm de 12h de *C. parapsilosis* cepa 5736

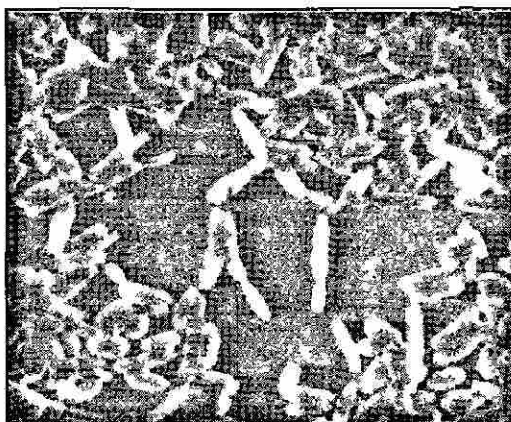


Figura 16. Biofilm de 17h de *C. parapsilosis* cepa 5736

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

La formación de biofilms de *Candida parapsilosis* para prueba de antifúngicos *in vitro* fue de gran utilidad para comprobar que efectivamente la resistencia a antifúngicos en biofilms aumenta con respecto a las formas planctónicas de estas mismas levaduras.

En el presente trabajo se desarrollaron 2 modelos para formación de biofilms utilizando 20 cepas clínicas de *Candida parapsilosis* elegidas arbitrariamente, provenientes de diversas partes del cuerpo y diferentes tipos de infecciones, destacando que de las 20 cepas 7 fueron capaces de formar biofilm en placa de poliestireno, lo que llama la atención debido al impacto que esto provoca a nivel clínico. Cabe destacar que de tales cepas formadoras de biofilm, el 90% resistió elevadas concentraciones de los azoles fluconazol e itraconazol convirtiéndose en un riesgo importante para los pacientes que utilizan implantes médicos.

Nuestro trabajo procuró formar biofilms del modo más simple posible, y así logramos probar la capacidad de adherencia de nuestras cepas sin la presencia de factores que favorezcan la formación de biofilm, sin embargo, existen estudios

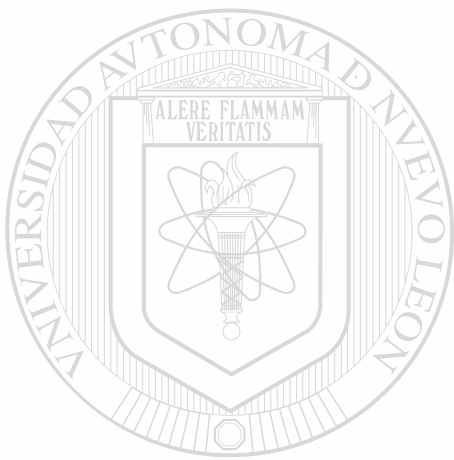
previos que muestran biofilms de varias especies de *Candida* creados bajo condiciones distintas que favorecen una mayor adherencia de las células tales como tratamiento previo del soporte con suero fetal de bovino así como el uso de agitadores que permiten el flujo continuo del medio de cultivo (17). Con nuestra forma simplificada de formación de biofilm logramos pequeños biofilms en microplacas de poliestireno, los cuales bajo microscopía electrónica y de contraste de fases muestran una capa delgada de cúmulos de blastosporas a diferencia de la morfología de biofilms reportados para *Candida albicans*, (17,2) aún así, nuestros biofilms muestran gran resistencia a los azoles fluconazol e itraconazol

No se logró la adherencia de células en catéteres de cloruro de polivinilo, silicón o látex, bajo las condiciones descritas en este trabajo, pero sería interesante revisar cuales de las 20 cepas empleadas son capaces de formar biofilm si se intenta reproducir las condiciones que favorecen la colonización de catéteres *in vivo*. Una

variante interesante podría ser la incubación en condiciones de agitación que produzca el flujo de líquidos sobre los cortes de catéter. (12) Además, se podrían probar diversos medios de cultivo con diferentes concentraciones de carbohidratos para encontrar cual favorece la adherencia de las células al biomaterial. (11)

Hay trabajos previos que reportan resistencia de biofilms de *Candida albicans* a anfotericina B (12,18), sin embargo, bajo las condiciones en las que se desarrolló este trabajo, encontramos que nuestros biofilms de *Candida parapsilosis* son sensibles a dicho fungicida de forma equiparable a las formas planctónicas de

estas levaduras, esto podría deberse a la baja concentración celular de nuestros biofilms.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

- 1 Encontramos que de 20 cepas de *Candida parapsilosis*, siete fueron capaces de formar biofilms en microplacas de poliestireno.
- 2 No se logró la formación de biofilms en catéteres de PVC, silicón o látex con ninguna de las 20 cepas de *Candida parapsilosis*.
- 3 Se encontró que los azoles itraconazol y fluconazol tienen nula o muy poca actividad frente a los biofilms de *Candida parapsilosis* en contraste con sus formas planctónicas las cuales son susceptibles a estos antifúngicos.
- 4 Se encontró que los biofilms de *Candida parapsilosis* formados bajo las condiciones mostradas en este trabajo son susceptibles a Anfotericina B en concentraciones similares a sus formas planctónicas.

REFERENCIAS

- 1 **Ashford BK.** Certain conditions of the gastro-intestinal tract in Porto Rico and their relation to tropical sprue. *Am. J. of Tropical Medicine* 1928;8:507-38.
- 2 **Baillie GS, Douglas LJ.;** Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents; *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Aug;42(8):1900-5
- 3 **Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, Edwards JR, Tolson J, Henderson T, Martone WJ.** Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med* 1991 Sep 16;91(3B):86S-89S

- 4 **Brooun A, Liu S, Lewis K.;** A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*; 2000 Mar;44(3):640-6
- 5 **Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Read R.R., Morck D., Buret A.;** The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J Clin Microbiol* 1999 Jun;37(6):1771-6.
- 6 **Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM.;** Microbial biofilms; *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-45

- 7 **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.;** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections; *Science* 1999 May 21;284(5418):1318-22
- 8 **Critchley IA, Douglas LJ.** Differential adhesion of pathogenic *Candida* species to epithelial and inert surfaces. *FEMS Microbiol Lett* 1985;28:199-203.
- 9 **Donlan R.M.;** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002 Sep;8(9):881-90.
- 10 **Elliott T.S.J.** Intravascular device infections; *J. Med Microbiol* 1988 Nov;27(3):161-7
- 11 **Hawser SP, Douglas LJ.** Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun* 1994 Mar;62(3):915-21.
- 12 **Hawser SP, Douglas LJ.** Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Sep;39(9):2128-31.
-
- 13 **Hawser SP, Norris H, Jessup CJ, Ghannoum MA** (Comparison of a 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2Htetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. *J Clin Microbiol* 1998 May;36(5):1450-2.
- 14 **Joachim H, Polayes S.** Subacute endocarditis and systemic mycosis (monilia). *JAMA* 1940; 115:205-8.

- 15 **Khoury A.E. Lam K. Ellis B.D. Costerton J.W.;** Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *ASAIO J.* 1992 Jul-Sep;38(3):M174-8.
- 16 **Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE;** Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces; *Infect Immun* 1985 Oct;50(1):97-101.
- 17 **Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A.;** Comparison of Biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces.; *Infect Immun* 2002 Feb;70(2):878-88.
- 18 **Kuhn D.M., George T., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A.;** Antifungal Susceptibility of *Candida* Biofilms: Unique efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Jun;46(6):1773-80.
- 19 **Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW.;** Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis.; *Infect Immun* 1980 May;28(2):546-56.
- 20 **Marrie T.J., Nelligan J., and Costerton J.W.;** A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead; *Circulation* 66: 1339-1341.
- 21 **Marrie TJ, Costerton JW;** Scanning and transmission electron microscopy of *in situ* bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters; *J Clin Microbiol* 1984 May;19(5):687-93.
- 22 **McGinley KJ, Larson EL, Leyden JJ;** Composition and density of microflora in the subungual space of the hand.; *J Clin Microbiol* 1988 May;26(5):950-3.

- 23 **Nguyen MH, Peacock JE Jr, Tanner DC, Morris AJ, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Yu VL.;** Therapeutic approaches in patients with candidemia. Evaluation in a multicenter, prospective, observational study.; *Arch Intern Med* 1995 Dec 11-25;155(22):2429-35
- 24 **Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ.;** Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*.; *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995 Jan;21(1):9-14
- 25 **Pfaller MA.;** Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission.; *Clin Infect Dis* 1996 May;22 Suppl 2:S89-94.
- 26 **Plouffe JF, Brown DG, Silva J Jr, Eck T, Stricof RL, Fekety FR Jr.;** Nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia related to intravenous infusions.; *Arch Intern Med* 1977 Dec;137(12):1686-9
- 27 **Polayes SH, Emmons CW.;** Final report on the identification of the previously reported case of subacute endocarditis and systemic mycosis (monilia).; *JAMA* 1941; 117:1533-4.
- 28 **Ramage G, Wickes BL, Lopez-Ribot JL.;** Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents.; *Am Clin Lab* 2001 Aug;20(7):42-4.
- 29 **Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M, Yuen KY.;** Adhesion and colonisation of *Candida krusei* on host surfaces; *J Med Microbiol* 1994 Oct;41(4):250-8
- 30 **Sanchez V, Vazquez JA, Barth-Jones D, Dembry L, Sobel JD, Zervos MJ.;** Nosocomial acquisition of *Candida parapsilosis*: an epidemiologic study.; *Am J Med* 1993 Jun;94(6):577-82

- 31 **Tellier R, Krajden M, Grigoriew GA,; Campbell I.** Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts.; *Antimicrob Agents Chemother* 1992 Aug;36(8):1619-25.
- 32 **Weems JJ Jr;** *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility.; *Clin Infect Dis* 1992 Mar;14(3):756-66
- 33 **Wingard JR.;** Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients.; *Clin Infect Dis* 1995 Jan;20(1):115-25



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APÉNDICES

APENDICE A

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Lactato de Ringer

Para preparar 1 L de Lactato de Ringer pesar:

Cloruro de Sodio 0.6 g

Cloruro de Potasio 0.03 g

Cloruro de Calcio 0.02 g

Disolver cada sal por separado en 100 mL de agua destilada

Mezclar 5.17 mL de lactato de sodio al 60%, en 100 mL de agua destilada.

Mezclar poco a poco cada una de las 4 disoluciones anteriores y aforar a 1L. ®

Almacenar en un frasco bien cerrado a temperatura ambiente.

Solución Salina en buffer de fosfatos

Para preparar 1 L de PBS pesar:

Cloruro de sodio 8 g

Fosfato de sodio dibásico heptahidratado 14.4 g

Cloruro de potasio 2 g

Fosfato potasio monobásico 2.4 g

Disolver las sales anteriores en agua destilada, ajustar a pH 7.4 con ácido clorhídrico 2 M y aforar a 1 L. Esterilizar por 15 minutos a 15 lbs de presión. Almacenar a temperatura ambiente.

Caldo de Soya y tripticasa con 1% de extracto de levadura

Para preparar 100 mL de medio de cultivo pesar 3 g de Medio Soya tripticasa DIBICO, añadir 1 g de extracto de levadura DIFCO, disolver en 100 mL de agua, calentando y agitando hasta ebullición 1 minuto. Esterilizar por 15 minutos a 15lbs de presión. Almacenar a 4°C.

XTT en lactato de Ringer

Para preparar 1 L de XTT/lactato de Ringer pesar 0.5 g de XTT y diluir en 1 L de Lactato de Ringer. Esterilizar por filtración y almacenar a -70°C

Menadiona en acetona

Para preparar 10 mL de menadiona/acetona pesar 17.2 mg de menadiona y diluir en 10 mL de acetona, almacenar a -70°C

XTT/menadiona 1 μ M

Para preparar 20 mL de XTT/menadiona 1 μ M añadir 2 μ L de menadiona/acetona en una alícuota de XTT (20 mL) a la que previamente se le retiran 2 μ L. Este reactivo se prepara inmediatamente antes de ser utilizado.

Formaldehído 4%

Para preparar 100 mL de formaldehído al 4%

Pipetear 4 mL de formaldehído y diluir en 96 mL de agua

Estándar 0.5 de Mc. Farland

Para preparar 100 mL de estándar 0.5 de Mc. Farland hay que preparar una solución de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1.175% P/V. Una vez realizada la disolución anterior, se toman

0.5 mL de esta y se añaden a 99.5 mL de H_2SO_4 0.36 N.

APENDICE B
ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO
DE *Candida parapsilosis*

Se mide la transmitancia que emite a 530 nm una celda conteniendo el estándar 0.5 de Mc. Farland y se registra esta lectura. Por otro lado, se toma la masa celular suficiente del cultivo joven de la cepa control de *Candida parapsilosis* para lograr una turbidez semejante a la del estándar 0.5 de Mc. Farland, posteriormente se mide la transmitancia que emite esta suspensión celular a 530 nm, ajustando con agua o añadiendo una mayor masa celular hasta que la transmitancia sea equivalente a la emitida por el estándar. Con esto tendremos un inóculo de aproximadamente $(1-5 \times 10^6 \text{ UFC/mL})$.

Si se desea comprobar la cantidad de células obtenidas en el procedimiento anterior y con esto tener una idea más exacta de la cantidad de UFC/mL que se estarán manejando, se lleva a cabo el siguiente método de dilución y siembra en placa:

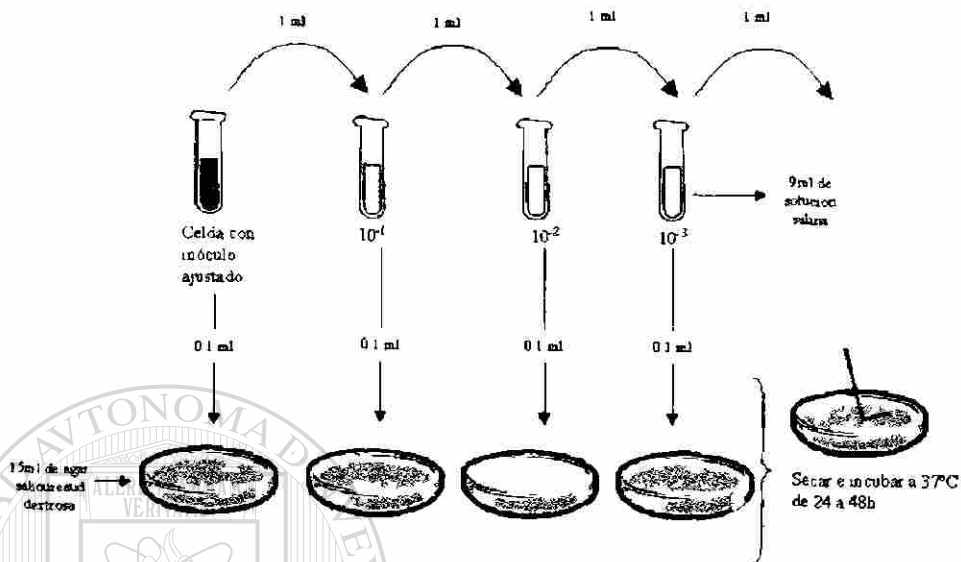


Figura 17. Esquema de dilución y siembra en placa

Una vez que crecen las colonias, se efectúa el conteo utilizando el contador de colonias y los cálculos se realizan de la siguiente manera:

(número de colonias contadas en 5 cuadros)(12)(10)(dilución)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

