

## Artículo Original

### Micología

Kasmera 48(1):e48119122019, Enero-Junio, 2020

ISSN 0075-5222 E-ISSN 2477-9628

 <https://doi.org/10.5281/zenodo.3660110>



# Formación de biopelículas por *Candida parapsilosis sensu stricto* y su perfil de susceptibilidad en Venezuela

## *Biofilm-forming of Candida parapsilosis sensu stricto and its susceptibility profile in Venezuela*

Moreno-Calderón Xiomara  <sup>1</sup>, Marcano-Vásquez Mirexia Eva <sup>2</sup>, Ferrara-Valvano Giuseppe Antonio <sup>3</sup>, Panizo-Domínguez María Mercedes <sup>4</sup>, García-Centeno Nataly Johana <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Médico la Floresta. Departamento de Microbiología. Caracas. Venezuela. <sup>2</sup>Laboratorio Biomédico Dr. Rapela. Departamento de Microbiología Clínica. Buenos Aires. Argentina. <sup>3</sup>Laboratorio de Referencia Referlab. Caracas. Venezuela. <sup>4</sup>Sociedad Venezolana de Microbiología. Caracas. Venezuela.

### Resumen

Una de las principales consecuencias del desarrollo de biopelículas es la resistencia a los antifúngicos. Se determinó la formación de biopelículas por *Candida parapsilosis sensu stricto* aisladas de sangre y su perfil de susceptibilidad. Se evaluaron 30 cepas de *C. parapsilosis sensu stricto* de la Red de Candidemias del Dpto. de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel-Venezuela, por el método cuantitativo en microplaca con tinción de cristal violeta y el método cualitativo en agar Sabouraud dextrosa suplementado con rojo Congo. Se utilizó el método de microdilución según el documento M-27 del Clinical and Laboratory Standards Institute. La formación de biopelículas de *C. parapsilosis sensu stricto* por el método cuantitativo fue de 63% y por el método cualitativo de 50%. El método cualitativo presentó valores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de 61,1%, 23%, 78,6%, 43,8% respectivamente frente al método cuantitativo. Los aislados en forma planctónica fueron 100% sensibles a anfotericina B y caspofungina, con susceptibilidad variable a los azoles. El método cuantitativo es una técnica confiable para determinar la formación de biopelículas. El método cualitativo puede usarse como método pantalla inicial. No se encontró relación entre la susceptibilidad de las formas planctónicas y la capacidad de producción de biopelículas.

**Palabras claves:** biopelículas, *Candida parapsilosis*, Candidemia, Antifúngicos, Violeta de Genciana, Rojo Congo

### Abstract

One of the main consequences of biofilm development is resistance to antifungals. Biofilm-forming by *Candida parapsilosis sensu stricto* isolated from blood and its susceptibility profile was determined. Thirty strains of *C. parapsilosis sensu stricto* belonging to the Candidemia Network of the Mycology Department of the Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel-Venezuela, were evaluated by microplate quantitative method with violet crystal staining, and Sabouraud dextrose agar supplemented with Congo red qualitative method. The microdilution method was used to determine the susceptibility, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute M-27 document. Biofilm formation of *C. parapsilosis sensu stricto* by both quantitative and qualitative method was 63% and 50%, respectively. Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of the qualitative method were 61.1%, 23%, 78.6%, and 43.8% respectively, when compared with quantitative method. Planktonic isolates were 100% sensitive to amphotericin B and caspofungin, with variable susceptibility to azoles. Quantitative method is a reliable assay to determine biofilm formation, while qualitative method can be used as an initial screening assay. No relationship was found between susceptibility of planktonic isolates and the ability to biofilm-forming.

**Keywords:** biofilm-forming, *Candida parapsilosis*, Candidemia, Antifungals, Gentian violet, Congo red

**Recibido:** 19-12-2019

**Aceptado:** 06-01-2020

**Publicado:** 12-02-2020

**Como Citar:** Moreno-Calderón X, Marcano-Vásquez ME, Ferrara-Valvano GA, Panizo-Domínguez MM, García-Centeno NJ. Formación de biopelículas por *Candida parapsilosis sensu stricto* y su perfil de susceptibilidad en Venezuela. Kasmera. 2020;48(1): e48119122020. doi: 10.5281/zenodo.3660110

**Autor de Correspondencia:** Moreno-Calderón X. E-mail: [x.morenoc@hotmail.com](mailto:x.morenoc@hotmail.com)

Una lista completa con la información detallada de los autores está disponible al final del artículo.

©2020. Los Autores. **Kasmera**. Publicación del Departamento de Enfermedades Infecciosas y Tropicales de la Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons atribución no comercial (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) que permite el uso no comercial, distribución y reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre y cuando la obra original sea debidamente citada.



## Introducción

Las biopelículas constituyen una forma importante de crecimiento microbiano y son fundamentales para el desarrollo de gran variedad de infecciones clínicas. Muchos hongos de importancia médica, de los géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Coccidioides* y *Pneumocystis*, tienen la capacidad de producirlas (1).

Recientemente, se ha estimado que alrededor del 65% de todas las infecciones microbianas humanas involucran la formación de biopelículas. Se relacionan con el uso de dispositivos médicos tales como catéteres, válvulas cardíacas y prótesis de reemplazo articulares, entre otros (2). Sin embargo, estas biopelículas pueden formarse también sobre tejidos vivos, válvulas cardíacas, la mucosa del oído medio o los alvéolos pulmonares (2,3). El estudio de las biopelículas fúngicas es esencial para comprender su naturaleza, relación con la resistencia a los antifúngicos y papel en la enfermedad, y así poder desarrollar nuevas estrategias preventivas y terapéuticas que disminuyan la elevada morbilidad y el gran gasto económico asociado a este tipo de infecciones (4).

*Candida parapsilosis* suele ser la segunda especie del género *Candida* más frecuentemente aislada de las manos del personal de salud y de muestras clínicas normalmente estériles provenientes de pacientes hospitalizados (4-6).

Cuando se ha comparado de manera general la capacidad de producir biopelículas entre las diferentes especies del género *Candida*, diversos estudios concluyen que *C. albicans* es la especie con mayor capacidad de producción de biopelículas, sin embargo, *C. parapsilosis* es conocida por su capacidad de crecer en soluciones de nutrición parenteral y formar biopelículas en catéteres y otros dispositivos implantados, por lo que se ha convertido en uno de los principales agentes fúngicos causales de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) (3-5).

En Venezuela no se conocen cifras oficiales acerca de la frecuencia de las infecciones causadas por las distintas especies de *Candida*, así como del estudio de biopelículas en *C. parapsilosis*; sin embargo, diversos estudios han reportado la alta frecuencia de candidiasis invasora causada por esta especie, siendo considerada actualmente como la más común en infecciones del torrente sanguíneo (7). Debido a lo expuesto anteriormente, este estudio se diseñó para determinar la capacidad de formación de biopelículas de *C. parapsilosis sensu stricto* y su relación con el perfil de susceptibilidad frente a los antifúngicos.

## Métodos

**Tipo y diseño de la investigación:** estudio descriptivo, prospectivo de carácter transversal y experimental.

**Procedencia de los aislamientos:** se analizaron 30 aislados de sangre seleccionados de forma intencional

(muestra no probabilística) del Complejo C. *parapsilosis*, provenientes de la Red de Vigilancia de Candidemias del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Caracas-Venezuela dentro del período 2012-2017, identificados como *Candida parapsilosis sensu stricto* por estudios moleculares (8). Los aislados estuvieron conservados bajo el método de preservación en agua destilada estéril de Castellani (9), hasta el momento de su análisis.

**Procesamiento de los aislamientos:** se tomó una alícuota de cada vial de preservación de los aislados y se inoculó en caldo infusión cerebro-corazón (BHI, Oxoid-USA), el cual fue incubado durante 24-48 horas a 28 °C en agitación a 120 revoluciones por minuto (rpm) en un agitador orbital Innova 4000 (New Brunswick Scientific). Posteriormente, se realizó un pase a agar Sabouraud dextrosa (SBD, Oxoid), agar cromogénico (Oxoid), Mycosel® (Oxoid) y agar harina de maíz (Corn Meal Agar, Oxoid), a fin de verificar la pureza y viabilidad de los aislados seleccionados; los mismos fueron incubados a 28 °C por 48 horas.

**Determinación de la capacidad de formación de biopelículas en placa de microtitulación de poliestireno mediante tinción con cristal violeta (CV):**

- Preparación del inóculo para el análisis de biopelículas:** de los aislados obtenidos, previa verificación de viabilidad y pureza, se preparó una suspensión en solución salina estéril al 0,85%, a una concentración de 0,5 McFarland ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL). Se tomaron 200 µL de dicha suspensión y se colocaron en 19,8 mL de caldo SBD, obteniendo una dilución 1:100.
- Método en microplacas de poliestireno:** para esta técnica se utilizaron microplacas de titulación de poliestireno (MPS), en cuyos pocillos se añadieron 200 µL de la dilución en caldo SBD 1:100; las microplacas se cubrieron con papel Parafilm® (Bemis™ HS234526C) y se incubaron a 35 °C por 48 horas. Posteriormente, el caldo inoculado se decantó y los pocillos se lavaron 3 veces con buffer fosfato tamponado (PBS) a pH 7,4. Se añadieron 200 µL de metanol a cada pocillo para fijar, por 30 minutos. El metanol se decantó y se repitió el lavado con PBS tres veces. A continuación, se agregaron 200 µL de CV al 1% por 30 minutos. Luego, el CV fue decantado y se realizaron 3 lavados con PBS. Posteriormente, se agregó a cada pocillo 200 µL de etanol al 96%, se dejó reposar por 5 minutos (10) y se procedió a leer la densidad óptica (DO) a 490 nm en un lector de ELISA (iMark™, Microplate Reader). Cada aislado se estudió por triplicado. Para la interpretación de los resultados, se utilizó la clasificación establecida por Stepanovic, et al., (11) para la formación de biopelículas: no formadoras ( $DO \leq DOc$ ); poco formadoras ( $DOc < DO < 2DOc$ ); moderadamente formadoras ( $2DOc < DO < 4DOc$ ) y fuertemente formadoras ( $4DOc < DO$ ). El DOc se define como el promedio de diez valores del control negativo.

**Determinación cualitativa de la formación de biopelículas (matriz de exopolisacáridos) en agar SBD con rojo Congo:** se preparó una suspensión en solución salina al 0,85%, con un patrón de turbidez de 0,5 McFarland, de los aislados provenientes de 24 horas de incubación en agar SBD. De esta suspensión se tomaron 100  $\mu$ L y se inocularon en las placas de agar SBD suplementadas con 0,025% del indicador rojo Congo; se estriaron por agotamiento y se incubaron a 35°C por 48 horas. Las pruebas se interpretaron de acuerdo a lo establecido por Bravo et al. (12): colonias que absorbieron el color rojo del indicador se consideraron positivas y las que se mantuvieron de color blanco se consideraron negativas.

**Estudio de la sensibilidad a los antifúngicos:** la prueba de microdilución en caldo se realizó de acuerdo con el documento CLSI M27 (13). Se utilizó un inóculo a una concentración final de  $1,5 \pm 1,0 \times 10^3$  cel/mL en medio RPMI-1640 + 2% de glucosa incubado a 35 °C durante 24-48 horas. El valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para fluconazol (FL), voriconazol (VO) y caspofungina (CS) se interpretó como inhibición de crecimiento  $\leq 50\%$  y para anfotericina B (AB) como inhibición de crecimiento del 100%, respecto al control de crecimiento. Los criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad fueron: susceptible (S), susceptible dosis dependiente (SDD), intermedio (I) y resistente (R), de acuerdo a los puntos de corte clínicos establecidos por el documento en  $\mu$ g/mL. Para FL: S =  $\leq 2$ ; SDD = 4; R =  $\geq 8$ . Para VO: S =  $\leq 0,125$ ; SDD = 0,25 - 0,5; R =  $\geq 1$ . Para CS: S =  $\leq 2$ ; I = 4; R =  $\geq 8$  (14). Para AB (se utilizaron los puntos de corte epidemiológicos sugeridos por Pfaller et al) (15): S =  $\leq 1$ ; R =  $\geq 2$ .

**Control de calidad:** para el control de calidad de medios, identificación y sensibilidad de los aislados se utilizaron las cepas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC®): *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) y *Candida krusei* (ATCC 6258).

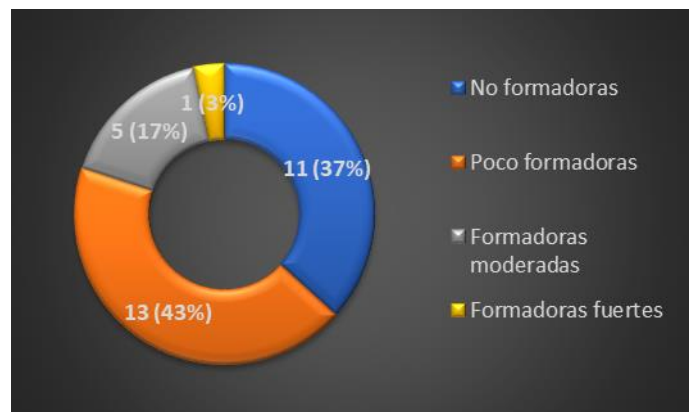
**Análisis estadístico:** los datos obtenidos se ordenaron en tablas de Excel y se determinaron las frecuencias y porcentajes de la prueba de susceptibilidad. Para la evaluación del método de SBD suplementado con rojo Congo se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y la concordancia categórica, tomando como método de referencia el método en microplaca con tinción de CV. Para comprobar la significancia estadística entre ambos métodos y evidenciar la capacidad de formación de biopelículas, así como para determinar la relación entre la capacidad de formación de biopelículas y el perfil de susceptibilidad, se utilizó la prueba de Chi-cuadrado ( $X^2$ ) con corrección de Yates, con un nivel de significancia de 95% y un valor de  $p < 0,05$ . Todos los análisis se realizaron con el programa Statgraphics Centurion XVII.

**Consideraciones bioéticas:** el diseño de este estudio no contempló procedimientos experimentales con seres humanos ni animales, ni con muestras biológicas derivadas directamente de estos; se trabajó con cepas

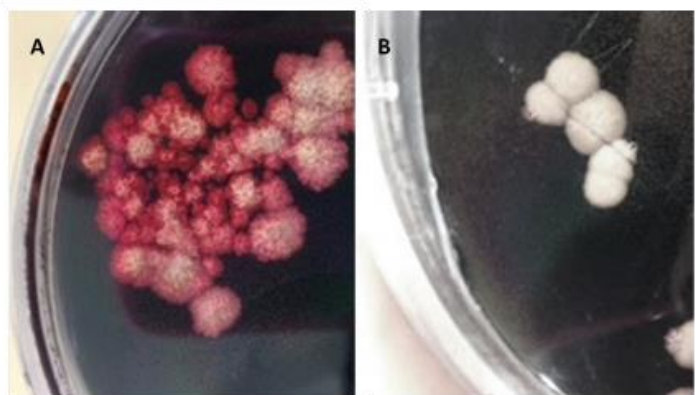
fúngicas. Sin embargo, por ser estas cepas provenientes de muestras humanas, los investigadores se comprometen a mantener la confidencialidad de la identidad de los sujetos fuente de estudio, así como la información suministrada y obtenida durante el proceso de la investigación, cumpliendo de esta manera con los principios de la Declaración de Helsinki.

## Resultados

**Capacidad de formación de biopelículas:** de los 30 aislados analizados, por el método de microplaca con tinción de CV, 19 (63%) fueron capaces de formar biopelículas en sus diferentes clasificaciones y 11 (37%) no fueron capaces de formar biopelículas (Figura 1). Por el método cualitativo en SBD suplementado con rojo Congo, 15 (50%) de los aislados produjeron exopolisacáridos y los 15 (50%) restantes no produjeron (Figura 2).



**Figura 1.** Capacidad de formación de biopelículas según el método en microplaca con tinción de cristal violeta



**Figura 2.** Agar Sabouraud dextrosa más rojo Congo, prueba cualitativa que pone de manifiesto la morfología colonial y cambio de color de aislados productores o no de exopolisacáridos como indicadores de la formación o no de biopelículas. (A) prueba positiva: colonias rojas indicando la absorción y metabolización del rojo Congo. (B) prueba negativa: colonias blancas indicando la no absorción y metabolización del rojo Congo.

Para el método de SBD suplementado con rojo Congo se obtuvo una sensibilidad de 61,1%, especificidad de



25%, y valores predictivos positivo y negativo de 78,6% y 43,8% respectivamente, frente al método en microplaca con tinción de CV. La concordancia entre ambos métodos fue de 66,7%. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el método de SBD suplementado con rojo Congo y el método de microplaca con tinción de CV ( $X^2$ : 3,772;  $p=0,0521$ ).

*Evaluación de la susceptibilidad a los antifúngicos de los aislados de C. parapsilosis sensu stricto capaces de formar o no biopelículas:* los resultados de susceptibilidad

a FL, VO, AB y CS de los 30 aislados se muestran en la [Tabla 1](#). Los puntos de corte clínicos de AB para *C. parapsilosis* no están establecidos por el CLSI, por lo que los resultados obtenidos se analizaron según los puntos de corte epidemiológicos (PCE) establecidos por Pfaller et al., (15) donde una CMI  $\leq 1$  se considera sensible y una CMI  $\geq 2$  resistente. Los PCE de Pfaller et al., coinciden con los puntos de corte clínico (PCC) de la EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), que establece que para *C. parapsilosis* la AB es sensible con una CMI  $\leq 1$  y resistente con una CMI  $> 1$  (16).

**Tabla 1.** Perfil de susceptibilidad de los aislados de *Candida parapsilosis sensu stricto* frente a los antifúngicos utilizados (n=30)

ATF	Rango	Media	Media G	Moda	CMI <sup>50*</sup>	CMI <sup>90*</sup>	N (% de aislados)		
							S	I	R
FL	2-64	9,3	4,9	4	4	8	8 (27)	14(47)**	8 (27)
VO	0,03-4	0,33	0,13	0,06	0,125	0,5	22 (73)	6 (20)	2 (7)
AB	0,125-1	0,4	0,33	0,25	0,25	1	30(100)	0	0
CS	1-2	1,5	1,4	2	1,5	2	30 (100)	0	0

ATF: antifúngicos; FL: fluconazol; VO: voriconazol; AB: anfotericina B; CS: caspofungina; N: número de aislados

\*CMI (Concentración mínima Inhibitoria): en  $\mu\text{g}/\text{mL}$

\*\*Para fluconazol, se emplea el término Susceptible Dosis Dependiente (SDD), en lugar de Intermedio.

Por otra parte, con la finalidad de determinar si existía relación entre la capacidad de formación de biopelículas de los aislados estudiados con el perfil de susceptibilidad a los antifúngicos obtenido a partir de las formas planctónicas, se realizó una comparación entre los valores obtenidos para cada categoría. Los resultados se muestran en la [Tabla 2](#). No se pudo determinar si existía relación entre la capacidad de formación de biopelículas y la susceptibilidad a AB y CS ya que todas las cepas evaluadas fueron sensibles a estos dos antifúngicos independientemente de su capacidad de formación de biopelículas. No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la capacidad de formación de biopelículas y la susceptibilidad a VO y FL de las formas planctónicas ( $X^2$  para VO: 3,318;  $p=0,7679$ .  $X^2$  para FL: 2,684;  $p=0,4430$ ).

## Discusión

En el presente estudio, al clasificar la formación de biopelículas de *C. parapsilosis sensu stricto*, según la cuantificación de la biomasa producida en cada biopelícula, se encontró que la mayoría de los aislados fueron débilmente formadores de las mismas (43%), resultado similar al encontrado por Marcos-Zambrano et al., (17) donde el 41% de los aislados de *C. parapsilosis* resultaron débilmente formadores de biopelículas.

Un estudio realizado por Melo et al.,(18) en 16 aislamientos de *C. parapsilosis* provenientes de muestras de sangre, empleando el método de microplaca con tinción de CV y reducción con XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-hidróxido de tetrazolio), mostraron resultados consistentes con la formación de biopelículas. Sin embargo, por el método de microplaca con CV se observó que *C. parapsilosis sensu stricto* presentó una mayor escala de producción con

respecto a las otras 2 especies del complejo (*C. methapsilosis* y *C. orthopsilosis*), resultados similares al presente estudio al relacionarlos con *C. parapsilosis sensu stricto*, ya que las otras especies del complejo no fueron analizadas en esta investigación. El método en microplaca con CV tiñe las células metabólicamente activas e inactivas en las biopelículas maduras, y esto probablemente indica que es la prueba más apropiada y confiable para determinar la formación de las mismas. En cambio, el método XTT es el más apropiado para ensayar la exposición a fármacos y no la formación de biomasa y viabilidad de las biopelículas, debido a que el XTT es reducido por las deshidrogenasas mitocondriales de las células metabólicamente activas.

**Tabla 2.** Capacidad de formación de biopelículas y perfil de susceptibilidad a los antifúngicos de los aislados de *Candida parapsilosis sensu stricto* (n=30)

ATF	IPS	Capacidad de formación de biopelículas N(%)				N (%)
		NF	PF	MF	FF	
VO	S	8	8	5	1	22 (73)
	I	2	4	-	-	6 (20)
	R	1	1	-	-	2 (7)
CS	S	11	13	5	1	30 (100)
	I	-	-	-	-	0
	R	-	-	-	-	0
AB	S	11	13	5	1	30 (100)
	I	-	-	-	-	0
	R	-	-	-	-	0
FL	S	4	2	2	0	8 (27)
	SDD	3	7	3	1	14 (47)
	R	4	4	-	-	8 (27)

ATF: antifúngicos; VO: voriconazol; CS: caspofungina; AB: anfotericina B; FL: fluconazol; IPS: interpretación de las pruebas de susceptibilidad; S: sensible; I: intermedio; R: resistente; SDD: sensible dosis dependiente (para FL se emplea SDD en lugar de I); NF: No formadoras; PF: Poco Formadoras; MF: Moderadamente Formadoras; FF: Fuertemente Formadoras

Tumbarello et al., (19) analizaron 64 aislamientos de *C. parapsilosis*, y solo 14 (21,8%) fueron capaces de formar biopelículas, utilizando el método XTT. El resultado concordante con este estudio fue que se utilizó SBD suplementado con glucosa para cultivar las biopelículas, lo que facilita su formación, y esto podría sugerir el potencial de estos aislamientos para causar candidemia en pacientes que reciben nutrición parenteral, donde la solución administrada generalmente tiene una alta concentración de glucosa.

Otro método utilizado en este estudio para determinar capacidad de formación de biopelículas cualitativamente fue el medio de SBD suplementado con rojo Congo, el cual induce una morfología colonial y cambio de color en los aislados según produzcan o no exopolisacáridos. De acuerdo a lo sugerido por Bravo et al., (12) en aislados bacterianos, y adaptado a aislados fúngicos en este estudio, se encontró que el 50% de los aislados del complejo *C. parapsilosis* estudiados fueron capaces de formar biopelículas.

El método de SBD con rojo Congo no presentó valores de sensibilidad y especificidad adecuados para determinar la capacidad de producción de biopelículas al compararlo con el método de referencia (microtitulación en placa); sin embargo, es probable que este resultado pudiera ser distinto al evaluar un mayor número de cepas de *C. parapsilosis sensu stricto* por ambos métodos, ya que el valor de *p* estuvo muy cercano al valor considerado como significativo ( $p=0,0521$ ). Estos resultados sugieren que este método podría ser una alternativa útil para poner en evidencia, como método de pantalla inicial, la formación de exopolisacáridos de manera indirecta, debido a la sencillez de la técnica. Esto permitiría evaluar de forma rápida la capacidad de un aislado de producir o no biopelículas, teniendo en cuenta que, ante un resultado negativo, la cepa debe ser evaluada por el método de referencia para determinar la capacidad de formación de las mismas.

La producción de biopelículas en pacientes con enfermedades infecciosas tiene un mal pronóstico y un gran impacto clínico, ya que la mortalidad es mayor en pacientes infectados por cepas formadoras de biopelículas respecto a los infectados por cepas no formadoras, por lo que la clasificación de los aislamientos basados en este aspecto pudiera utilizarse para predecir la patogenicidad y el comportamiento clínico del aislado. Tal situación demuestra que la producción de biopelículas en aislados invasivos requiere un estudio más detallado (17,19,20).

Al evaluar la susceptibilidad a los antifúngicos, se observó una excelente susceptibilidad *in vitro* de los aislados frente a AB y CS mientras que para FL y VO se observó un porcentaje variable de resistencia, con mayor frecuencia para FL, el cual es indicado en profilaxis y tratamiento empírico o alterno en candidiasis sistémica (21). En este estudio, el perfil de susceptibilidad de los aislados se evaluó en su forma planctónica (forma libre), las cuales muestran propiedades fenotípicas radicalmente diferentes de sus contrapartes sésiles,

quienes son más resistentes a los agentes antifúngicos (22). Muchas infecciones asociadas a catéteres están relacionadas con biopelículas intraluminales, y son notoriamente difíciles de tratar, ya que las CMI de las formas sésiles a menudo son más elevadas que las CMI de las formas planctónicas (22,23).

Como ya se explicó anteriormente, el método en microplaca con tinción de CV es uno de los más utilizados para cuantificar la producción de biopelículas *in vitro*, más no permite medir la actividad metabólica de las células viables inmersas en las biopelículas, como tampoco puede medir la actividad de los antimicrobianos frente a dichas células (24,25). El método XTT, es empleado para analizar el desarrollo de biopelículas y la susceptibilidad a los antimicrobianos (5,26), sin embargo, en el presente estudio la susceptibilidad se realizó por microdilución en caldo y la formación de biopelículas por el método de microplaca con CV para determinar si existía alguna relación entre la capacidad de formación de biopelículas en su forma planctónica y el perfil de susceptibilidad a los antifúngicos. El resultado fue independiente de la sensibilidad o resistencia de las cepas de *C. parapsilosis sensu stricto* frente a los antifúngicos ensayados específicamente a FL y VO. La variabilidad en la susceptibilidad frente a estos antifúngicos también va a depender de factores como, el pH, la temperatura, la disponibilidad de oxígeno, entre otros. Alterando la arquitectura de la biopelícula y posiblemente la susceptibilidad antifúngica (3,4,26). Además, este hecho indica que la resistencia no sólo depende de la velocidad de crecimiento sino del grado de maduración de la biopelícula (27,28). Los valores de susceptibilidad que emiten los laboratorios de microbiología no se ajustan necesariamente a la realidad de cada paciente; esto hace que las infecciones asociadas a biopelículas sean difíciles de tratar y de diagnosticar. Sin embargo, las diferencias que existen entre las células microbianas planctónicas y sésiles podrían aprovecharse en la búsqueda de nuevos objetivos de diagnóstico, para superar las limitaciones de las terapias actuales contra infecciones fúngicas asociadas a biopelículas resistentes.

### Conflicto de Relaciones y Actividades

Los investigadores declaran no presentar conflicto de relaciones y actividades.

La MSc. María Mercedes Panizo se desempeña actualmente como co-editora del área de Micología de la revista, por lo que se inhibe totalmente del proceso editorial, selección de expertos para el arbitraje, evaluación y aceptación del presente trabajo; dichas actividades serán asumidas por el Director-Editor de la revista. La MSc. María Mercedes Panizo declara no haber ejercido ningún tipo de presión o influencia para la publicación del trabajo. El proceso de evaluación y arbitraje del trabajo se desarrolló de manera normal siguiendo todos los procesos y requisitos estándar de manera que su posición como co-editora no afectó el proceso de evaluación y aceptación, todo a fin de

garantizar que los principios de calidad científica, honestidad y transparencia no sean violados de ninguna forma.

### Financiamiento

Los autores declaran que la presente investigación no recibió financiamiento para su ejecución.

### Referencias Bibliográficas

- Fanning S, Mitchell AP. Fungal Biofilms. PLOS Pathog [Internet]. 2012;8(4):e1002585. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002585> DOI: [10.1371/journal.ppat.1002585](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585) PMID [22496639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22496639/) PMCID [PMC3320593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3320593/) [Google Académico](#)
- Del Pozo JL, Cantón E. Candidiasis asociada a biopelículas. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2016;33(3):176-83. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-candidiasis-asociada-biopelículas-S1130140615000571> DOI: [10.1016/j.riam.2015.06.004](https://doi.org/10.1016/j.riam.2015.06.004) PMID [27395021](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27395021/) [Google Académico](#)
- Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol [Internet]. 2003;11(1):30-6. Disponible en: [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(02\)00002-1?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X02000021%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(02)00002-1?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X02000021%3Fshowall%3Dtrue) DOI: [10.1016/S0966-842X\(02\)00002-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)00002-1) PMID [12526852](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12526852/) [Google Académico](#)
- Chandra J, Mukherjee PK. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. Microbiol Spectr [Internet]. 2015;3(4). Disponible en: <https://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015> DOI: [10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015) PMID [26350306](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26350306/) PMCID [PMC4566167](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4566167/) [Google Académico](#)
- Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2008;21(4):606-625. Disponible en: <http://cmr.asm.org/content/21/4/606.abstract> DOI: [10.1128/CMR.00013-08](https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08) PMID [18854483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18854483/) PMCID: [PMC2570155](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2570155/) [Google Académico](#)
- Moreno X. Biopelículas en el Complejo *Candida parapsilosis*. Act Científica SVBE [Internet]. 2017;20(1):33-40. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Xiomara\\_Calderon/publication/336229830\\_Biopelículas\\_en\\_el\\_Complejo\\_Candida\\_parapsilosis/links/5d954caf299bf1c363f2c794/Biopelículas-en-el-Complejo-Candida-parapsilosis.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Xiomara_Calderon/publication/336229830_Biopelículas_en_el_Complejo_Candida_parapsilosis/links/5d954caf299bf1c363f2c794/Biopelículas-en-el-Complejo-Candida-parapsilosis.pdf)
- Moreno X, Reviákina V, Panizo MM, Ferrara G, García N, Alarcón V, et al. Frecuencia y perfil de sensibilidad in vitro de aislamientos del Complejo *Candida parapsilosis* provenientes de pacientes con candidemias. Rev la Soc Venez Microbiol [Internet]. 2015;35(2):103-10. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199444210008> [Google Académico](#)
- Moreno X, Reviákina V, Panizo MM, Ferrara G, García N, Alarcón V, et al. Identificación molecular y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos de sangre del complejo *Candida parapsilosis* en Venezuela. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2017;34(3):165-70. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140617300220> DOI: [10.1016/j.riam.2016.11.005](https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.11.005) PMID [28457646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28457646/) [Google Académico](#)
- Panizo MM, Reviákina V, Montes W, González G. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. Rev la Soc Venez Microbiol. 2005;25:35-40. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1994/199416547007.pdf> [Google Académico](#)
- Passerini de Rossi B, Calenda M, Vay C, Franco M. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from device-associated nosocomial infections. Rev Argent Microbiol. 2007;39(4):204-12. Disponible en: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18390153-biofilm-formation-by-stenotrophomonas-maltophilia-isolates-from-device-associated-nosocomial-infections/?from\\_single\\_result=18390153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18390153-biofilm-formation-by-stenotrophomonas-maltophilia-isolates-from-device-associated-nosocomial-infections/?from_single_result=18390153) PMID [18390153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18390153/) [Google Académico](#)
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GDI, Djukić S, Čirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007;115(8):891-9. DOI: [10.1111/j.1600-0463.2007.apm.630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm.630.x) PMID [17696944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17696944/) [Google Académico](#)
- Bravo Fariñas L, Salazar Noble D, Arce MA, García H, Ramírez M, Cabrera LE, et al. Estudio de factores de virulencia en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de animales domésticos y afectivos. REDVET Rev Electrónica Vet [Internet]. 2005;VI(10):1-12. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63617978021> [Google Académico](#)
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4 th ed. CLSI Standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 1st ed. CLSI Supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema DJ, et al. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Amphotericin B, Flucytosine, and Itraconazole and *Candida* spp. as Determined by CLSI Broth Microdilution. J Clin Microbiol [Internet]. 2012;50(6):2040-6. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/50/6/2040.abstract> DOI: [10.1128/JCM.00248-12](https://doi.org/10.1128/JCM.00248-12) PMID [22461672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22461672/) PMCID [PMC3372147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3372147/) [Google Académico](#)
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs [Internet]. 2015 [citado 25 de noviembre de 2019]. Disponible en: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Clinical\\_breakpoints/Antifungal\\_breakpoints\\_v\\_9.0\\_180212.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/Antifungal_breakpoints_v_9.0_180212.pdf)
- Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. 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. Int J Med Microbiol [Internet]. 2014;304(8):1192-8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422114001118> DOI: [10.1016/j.ijmm.2014.08.012](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.08.012) PMID [25224357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25224357/) [Google Académico](#)
- Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. Med Mycol [Internet]. 2011;49(3):253-62. Disponible en: <https://academic.oup.com/mmy/article/49/3/253/1093714> DOI [10.1039/13693786.2010.530032](https://doi.org/10.1039/13693786.2010.530032) PMID [21039308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21039308/) [Google Académico](#)

19. Tumbarello M, Fiori B, Trecarichi EM, Posteraro P, Losito AR, De Luca A, et al. Risk Factors and Outcomes of Candidemia Caused by Biofilm-Forming Isolates in a Tertiary Care Hospital. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(3):e33705. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0033705> DOI: [10.1371/journal.pone.0033705](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033705) PMID [22479431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22479431/) PMCID [PMC3316499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3316499/) [Google Académico](#)
20. Sanguinetti M, Posteraro B. Diagnostic of Fungal Infections Related to Biofilms. En: Imbert C, editor. *Fungal Biofilms and related infections: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*. Volume 3 [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 63-82. Disponible en: [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F5584\\_2016\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F5584_2016_9) DOI: [10.1007/5584\\_2016\\_9](https://doi.org/10.1007/5584_2016_9) PMID [27300347](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27300347/) PMCID [PMC3316499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3316499/) [Google Académico](#)
21. Colombo A, Cortés A, Finkelievich J, Riera F, Rojas R, Thompson L, et al. Candidemia (Candidiasis invasora en adultos). Capítulo 3. En: Riera F, Editor. *Manual de Infecciones Fúngicas Sistémicas*. 3era ed. Asociación Panamericana de Infectología. Córdoba: Recfot, 2019. p. 35-55.
22. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal Biofilm Resistance. *Int J Microbiol* [Internet]. 2012;2012:528521. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2012/528521> DOI: [10.1155/2012/528521](https://doi.org/10.1155/2012/528521) PMID [22518145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22518145/) PMCID [PMC3299327](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3299327/) [Google Académico](#)
23. Venkatesh M, Rong L, Raad I, Versalovic J. Novel synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. *J Med Microbiol* [Internet]. 2009;58(7):936-44. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.009761-0> DOI: [10.1099/jmm.0.009761-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.009761-0) PMID [19502361](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19502361/) [Google Académico](#)
24. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2008;72(2):157-65. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701207003909> DOI: [10.1016/j.jmimet.2007.11.010](https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2007.11.010) PMID [18155789](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18155789/) [Google Académico](#)
25. Costa-Orlandi CB, Sardi JCO, Pitangui NS, de Oliveira HC, Scorzoni L, Galeane MC, et al. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *J Fungi* [Internet]. 2017;3(2):22. Disponible en: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/2/22> DOI: [10.3390/jof3020022](https://doi.org/10.3390/jof3020022) PMID [29371540](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29371540/) PMCID [PMC5715925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5715925/) [Google Académico](#)
26. Krom BP, Willems HME. In Vitro Models for *Candida* Biofilm Development. En: Calderone R, Cihlar R, editores. *Candida Species: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2016. p. 95-105. Disponible en: [https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-3052-4\\_8](https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-3052-4_8) DOI: [10.1007/978-1-4939-3052-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3052-4_8) PMID [26519068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26519068/) [Google Académico](#)
27. Castrillón Rivera LE, Palma Ramos A, Padilla Desgarennes M del C. Biopelículas fúngicas. *Dermatol Rev Mex* [Internet]. 2013;57(5):350-61. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2013/rmd135g.pdf> [Google Académico](#)
28. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis* [Internet]. 2016;74(4). Disponible en: <https://academic.oup.com/femspd/article/74/4/ftw018/2389141> DOI: [10.1093/femspd/ftw018](https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018) PMID [26960943](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26960943/) PMCID: [PMC5975230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5975230/) [Google Académico](#)

**Autores:**

**Correspondencia:** Moreno-Calderón Xiomara. <https://orcid.org/0000-0002-5924-6158>. Instituto Médico la Floresta. Departamento de Microbiología. Dirección Postal: Av. Ppal de la Floresta Calle Santa Ana. Sótano 2. Caracas. Venezuela. Teléfonos: +58-0212-2846897; +58-0426-1213570. E-mail: [x.morenoc@hotmail.com](mailto:x.morenoc@hotmail.com)

Marcano-Vásquez Mirexia Eva. <https://orcid.org/0000-0003-2164-7914>. Laboratorio Biomédico Dr. Rapela. Departamento de Microbiología Clínica. Buenos Aires. Argentina. E-mail: [eva\\_marcano20@hotmail.com](mailto:eva_marcano20@hotmail.com)

Ferrara-Valvano Giuseppe Antonio. <https://orcid.org/0000-0002-4403-4574>. Laboratorio de Referencia Referlab. Caracas. Venezuela. E-mail: [gferrara1971@gmail.com](mailto:gferrara1971@gmail.com)

Panizo-Domínguez María Mercedes. <https://orcid.org/0000-0001-8438-4993>. Sociedad Venezolana de Microbiología. Caracas. Venezuela. E-mail: [mmpanizo@gmail.com](mailto:mmpanizo@gmail.com)

García-Centeno Nataly Johana. <https://orcid.org/0000-0003-2189-3728>. Laboratorio de Referencia Referlab. Caracas. Venezuela. E-mail: [natalygarci08@gmail.com](mailto:natalygarci08@gmail.com)

**Contribución de los Autores:**

**MCX:** conceptualización, investigación, análisis formal, redacción-preparación del borrador original, redacción-revisión y edición. **MVM:** investigación, redacción-preparación del borrador original, **FVGA:** investigación, análisis formal, redacción-revisión y edición. **PDMM:** análisis formal, redacción-revisión y edición. **GCNJ:** investigación.

Para definir y establecer la participación de los autores se utiliza la Taxonomía CRediT (para mayor información consulte <https://casrai.org/credit/>).