



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Medicina

Maestría en Micología Médica

**Efecto del tiempo de preservación empleando el
método de Castellani y la criopreservación sobre
la actividad enzimática en *Candida albicans***

Alumna

Bioq. María Alejandrina Giordano

Directora y Co-directora

Mg. María de los Ángeles Sosa

Bioq. Adriana del Valle Telechea

Año 2019

*Esta tesis está dedicada con todo mi cariño
a mi familia y de manera especial a mi esposo,
quienes han puesto toda su confianza
para lograr un objetivo más en mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis no lo puedo catalogar como algo fácil pero lo que sí puedo hacer es afirmar que durante todo este tiempo pude disfrutar de cada momento y de cada etapa, y eso se lo agradezco a todas las personas que me acompañaron antes y durante este trayecto.

Gracias a mi directora Tina porque, a pesar de la distancia, siempre supo ayudarme en todo lo que necesité; gracias por resolverme dudas y por haberme orientado al correcto desarrollo y culminación de este trabajo.

Gracias a mi co-directora Adriana por abrirme las puertas de su laboratorio y recibirme de la mejor manera, por brindarme todo, por los días compartidos, por la paciencia, apoyo, dedicación y aliento.

Gracias a todo el personal del Área de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo, por haberme permitido realizar la parte práctica de la tesis allí. Particularmente quiero agradecer al técnico José Luis, por su colaboración, buena predisposición y voluntad.

Gracias a los profesores y compañeros de la Maestría en Micología de la Universidad Nacional del Nordeste, por todo lo que nos enseñaron y por hacernos pasar tan lindos momentos cada vez que nos tocó cursar. Gracias a las chicas de Salta, con las cuales compartimos la pensión, gracias Ruth, Yone, Emi y muy especialmente quiero agradecer a Flor, por contagiarme la pasión hacia los hongos, por la paciencia y tolerancia cuando coincidimos en la misma habitación, por las largas charlas compartidas.

Gracias a la Fundación Williams, quién me otorgó una beca para poder afrontar los viajes desde Mendoza hacia Chaco para el cursado de la Maestría. Asimismo, quiero agradecer a la Asociación Bioquímica de Mendoza y a AMPROS por haberme brindado ayuda económica para el pago de los módulos. Gracias porque, de otra manera, no hubiese sido posible la finalización de esta carrera.

Gracias a los que de una manera u otra han sido claves en mi vida profesional. A todo el personal del servicio de Micología del Hospital Muñiz, porque iniciaron mi interés en esta especialidad, por todos los conocimientos que me transmitieron y lo mucho que aprendí de ellos. Gracias por haberme hecho vivir una experiencia muy positiva los cuatro meses que roté por allá, durante la residencia en Bioquímica. Gracias al Doctor Negroni, Alicia, Gabi, Laura, Roxi, Mario, y muy especialmente quiero agradecer a Mercedes, por haberme acompañado y dedicado tiempo, por compartir todos sus conocimientos y valiosa experiencia y por hacerme ver lo hermoso de esta profesión.

Gracias a la Doctora Raquel por haberme dado la oportunidad de trabajar en lo que me gusta, por facilitarme la rotación externa durante la residencia, así como por su apoyo en el desarrollo del área de Micología del Hospital del Carmen de Mendoza, lugar donde actualmente trabajo. Gracias a todos mis compañeros, particularmente a Nadya, por la compañía, colaboración y buena predisposición en el trabajo diario.

Gracias a mi familia por estar incondicionalmente conmigo durante todos estos años. Gracias a mi papá y a mi mamá, por los consejos, valores y principios que me han inculcado. Gracias a mi hermana Guille por ser un pilar fundamental en mi vida, por sus sabios consejos y por demostrarme día a día todo su cariño y amor.

Gracias a mis amigos, primos, cuñados, tíos y suegros porque con cada uno de ellos he vivido momentos hermosos y han sabido darme entusiasmo a lo largo de todo este tiempo. Gracias a mis sobrinos y a mis dos pequeños ahijados, Benjamín y Emiliano, por llenarme los días de alegría.

Gracias a mi esposo Pablo, por su amor incondicional, por creer en mis capacidades, por haberme ayudado infinitamente en esta tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
1. <i>Candida</i> y su rol como patógeno.....	5
2. Factores de virulencia en <i>Candida albicans</i>	7
3. Métodos de conservación de microorganismos.....	12
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Cepas estudiadas.....	21
2. Conservación de las cepas.....	24
3. Estudio de las actividades enzimáticas.....	26
4. Viabilidad de las cepas y medición de la actividad enzimática.....	29
5. Consideraciones del diseño experimental.....	32
6. Análisis estadísticos.....	35
RESULTADOS	36
1. Viabilidad de las cepas de <i>C. albicans</i>	36
2. Influencia del tiempo de lectura sobre la determinación de la actividad enzimática.....	37
3. Efecto del tiempo de conservación de las cepas sobre la actividad enzimática.....	42
4. Variación cuantitativa del índice Pz con el tiempo de conservación por ambos métodos.....	44
DISCUSIÓN	48
1. Viabilidad de las cepas de <i>C. albicans</i>	48
2. Influencia del tiempo de lectura sobre la determinación de la actividad enzimática.....	50

3. Actividad enzimática porcentual	52
4. Variación de la actividad enzimática con el tiempo de conservación por ambos métodos	54
CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXOS	67
1. Procedencia de las cepas de <i>C. albicans</i> aisladas de pacientes del Hospital del Carmen	67
2. Composición de medios de cultivos para identificación de levaduras	68
3. Composición de medios de cultivos para medir actividad enzimática	69
4. Funcionamiento del espectrómetro de masas: MALDI-TOF	71
5. Planilla de registro de las actividades enzimáticas	73
6. Estadística descriptiva de las actividades enzimáticas para cada método de conservación	74
7. Tabla con la prueba de Kruskal Wallis para cada actividad enzimática según los métodos de Castellani y congelación	80
8. Análisis estadístico y figuras para cada actividad enzimática según tipo de muestra clínica	81

RESUMEN

Debido al incremento en la incidencia de las infecciones causadas por levaduras del género *Candida*, hay un gran interés en la investigación de sus factores de virulencia con la finalidad de establecer una relación entre estos factores y la patogenicidad, diseñar estrategias de control y prevención de las candidiasis, así como desarrollar nuevos agentes terapéuticos con estos factores como posibles blancos de acción.

A pesar de que existen numerosas publicaciones en las cuales se examina la producción de enzimas hidrolíticas en aislados de *C. albicans* y su papel en la patogénesis de las candidiasis, la preservación de la secreción enzimática a lo largo del tiempo de conservación aún no ha sido exhaustivamente estudiada. La conservación de cepas de *Candida* es indispensable en un laboratorio de Micología debido a que son consideradas material necesario para enseñanza, investigación y como testigos para estudios especiales. Un método muy utilizado y que aporta altos porcentajes de viabilidad, es la suspensión en agua destilada estéril.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto del tiempo de preservación empleando los métodos de Castellani y congelación sobre la actividad esterasa, fosfolipasa y proteinasa de *Candida albicans*. Se utilizaron 30 cepas aisladas a partir de muestras clínicas provenientes de pacientes tanto intra como extra hospitalarios del Hospital del Carmen de Mendoza. El aislamiento de cada cepa, se realizó en agar glucosado Sabouraud y en medio CHROMagar™ *Candida*. El estudio micromorfológico se realizó en el medio agar harina de maíz y la identificación definitiva se realizó por espectrometría de masas por sistema MALDI-TOF.

Todas las cepas fueron conservadas según los métodos de Castellani y congelación durante 0, 2, 4, 6 y 12 meses. Luego de transcurrido cada uno de esos tiempos, se registró la viabilidad y midió la actividad enzimática. Para determinar la producción de proteinasas, fosfolipasas y esterásicas se utilizaron los medios

albúmina sérica bovina, Sabouraud yema de huevo y el test de opacidad del Tween 80, respectivamente. Las lecturas de cada actividad se realizaron a las 24, 48 y 72 horas de incubación midiendo el diámetro de la colonia y el diámetro de la colonia más el halo o la zona de hidrólisis. A partir de la relación entre estos valores se calcularon los índices Pz.

Al evaluar el porcentaje de supervivencia de las cepas de *C. albicans* conservadas durante un año con el método de congelación, se pudo comprobar la eficacia de este método, ya que, de las 30 cepas evaluadas se recuperó el 100% al año de conservación. Mientras que, con el método de Castellani, la viabilidad que se obtuvo fue del 66,67%.

Los resultados obtenidos en esta tesis conforman las primeras estimaciones sobre el efecto del tiempo de conservación empleando los métodos de Castellani y el de congelación sobre la actividad enzimática en cepas de *C. albicans* y demostraron que la evolución de las tres actividades enzimáticas a lo largo de todo el ensayo, fue diferente. Mientras que la actividad esterásica mostró menor actividad enzimática que se mantuvo constante durante los 12 meses, la actividad fosfolipasa en la primera medición temporal, presentó mayor actividad enzimática que disminuyó con el transcurrir del tiempo. En tanto que, la actividad proteolítica tuvo un comportamiento opuesto a la fosfolipasa, incrementando su actividad al final del ensayo. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos de conservación.

Es importante continuar con los estudios que evalúen actividades enzimáticas (proteasas, fosfolipasas, esterases, hemolisinas y coagulasas) así como otros factores de virulencia, como son: adherencia, cambio fenotípico, morfología celular y producción de biopelículas en cepas de *C. albicans* y en otros microorganismos, para determinar su estabilidad a lo largo del tiempo de conservación por distintos métodos e identificar hasta qué momento se pueden preservar las cepas aisladas para garantizar la reproducibilidad de las investigaciones.

INTRODUCCIÓN

1. *Candida* y su rol como patógeno

El género *Candida* pertenece al Reino Fungi y al Phylum Ascomycota. Se describen dentro de este género alrededor de 314 especies (1). *C. albicans* continúa siendo la especie más frecuente y es considerada, además, la más virulenta (2–11); sin embargo, en los últimos años se ha observado un incremento en la incidencia de especies de *Candida* no *albicans* como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, en orden de frecuencia (1,12).

Candida spp. se presenta como células levaduriformes que se reproducen asexualmente por un proceso de división celular conocido como gemación. Algunas especies, presentan estados teleomórficos conocidos (ascosporados) (13). Son microorganismos eucarióticos y unicelulares, que miden de 2-4 micras y tienen paredes finas (4). Pueden presentar distintas formas: globosas, elipsoidales, cilíndricas o elongadas. Algunas especies presentan pseudohifas y ocasionalmente pueden presentar hifas septadas (1).

La pared celular de *C. albicans* está constituida por β -(1,3)-D-glucano, manano, quitina, proteínas y lípidos (6). Además de servir para su crecimiento, la pared le otorga rigidez y protección a la célula; es el lugar de contacto entre la superficie del microorganismo y el medio ambiente y es esencial para su patogenicidad (4).

Estos hongos, son ubicuos y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. En el ser humano, diversas especies de *Candida* forman parte de la microbiota habitual del tracto gastrointestinal, la piel y las mucosas oral y vaginal. Son agentes oportunistas, que pueden causar enfermedad en el hospedador inmunocomprometido (6,12,14).

Las candidiasis o candidosis se desarrollan cuando ocurre un desequilibrio en la relación hospedador-parásito, que favorezca al hongo y le permita invadir el mismo sitio donde se encuentra u otros tejidos más allá de las mucosas donde se mantiene

como comensal (2). Sin embargo, la gravedad de la infección depende sobre todo de las alteraciones primarias del hospedador más que de las propiedades patógenas del microorganismo (6).

En las últimas décadas, se ha producido un aumento global de las candidiasis invasivas nosocomiales, y a pesar del incremento de especies de *Candida* no *albicans*, *C. albicans* sigue siendo el agente etiológico predominante. Por diversos factores, su incidencia tuvo un crecimiento sostenido representando un problema de salud pública por las altas tasas de morbilidad y mortalidad, el aumento de los costos de la atención y la duración de la hospitalización (1,15).

La mayor parte de las candidiasis intrahospitalarias son de origen endógeno, es decir, causada por levaduras integrantes de la microbiota habitual del paciente. La supresión de la microbiota bacteriana habitual del tracto intestinal, por la acción de antibacterianos de amplio espectro, facilita la proliferación de levaduras en el tubo digestivo, y con ella aumenta el riesgo del paso al torrente sanguíneo a través del epitelio intestinal por fenómenos de translocación (12,16).

En otras ocasiones, el origen de la infección es exógeno, por levaduras provenientes de manos del personal hospitalario y de productos de aplicación intravenosa contaminados como el uso de catéteres endovenosos para la aplicación de medicamentos y de soluciones parenterales, prótesis cardíacas, entre otros factores (12,17).

Aunque la invasión inicial depende de los mecanismos inmunes del hospedador, *C. albicans* posee características intrínsecas que promueven su habilidad de causar enfermedad (14). La determinación de la producción de factores de virulencia permite determinar, de manera más precisa, cómo se modifica su papel como comensal para transformarse en microorganismos patógenos (18,19).

2. Factores de virulencia en *Candida albicans*

Los factores principales que contribuyen a la patogénesis de *C. albicans* son: el cambio fenotípico, la morfología celular, la adherencia, la secreción de enzimas y la formación de biopelículas (6,7,10,20–24). La expresión de estos factores, pueden variar de acuerdo con el lugar y el grado de invasión, así como por la naturaleza de las defensas del hospedador (4,7,18,19,24).

a) Adhesión

La colonización e infección por *C. albicans* comienza por una adherencia, a través de su pared celular, a las células epiteliales de la superficie. La presencia de receptores específicos sobre la membrana citoplasmática, son necesarios para la fijación y penetración del hongo a los tejidos y a las células del hospedador (3,4).

El reconocimiento de las células epiteliales se realiza a través de manoproteínas de superficie de *C. albicans* que se unen a queratinocitos, células endoteliales y proteínas de la matriz, como fibronectina, laminina y colágeno (25). Existen diferentes tipos de adhesinas en *C. albicans*, como Als1p, Als5p, Hwp1p, Int1p y Mnt1p (13,18).

b) Morfología celular

Después del fenómeno de adherencia, se establecen interacciones entre el hongo y el hospedador que son críticas para el balance entre la enfermedad y la salud. *C. albicans* es capaz de adoptar diversas formas y así pasar de levadura, redonda u ovoide a filamentosa y elongada (hifa y pseudohifa) (6,13,14). Esta propiedad, constituye un mecanismo de adaptación a su ambiente ya que, le confiere mayor virulencia permitiéndole penetrar en los tejidos e invadir los vasos sanguíneos, además, le brinda capacidad de evadir el sistema inmune y de suprimir la respuesta proinflamatoria del hospedador (6,26).

C. albicans se comporta como hongo dimórfico; la forma de levadura se presenta en el medio ambiente o durante el comensalismo (estado saprófito), en cambio la forma filamentosa existe en el hospedador durante el proceso de la enfermedad (estado parasitario) (4,27). Este fenómeno de morfogénesis es reversible (8,18).

c) Switching fenotípico

Es la capacidad que tiene *C. albicans* de hacer grandes cambios fenotípicos, como son diferencias en la macromorfología de la colonia: lisas y rugosas y cambios en la antigenicidad: como aumento o disminución en la producción de enzimas y toxinas. Este fenómeno, se expresa como una estrategia del microorganismo frente a las diferentes células del hospedador y medios que soporta (13).

d) Formación de biopelículas

Las biopelículas de *C. albicans* consisten en una estructura de levaduras e hifas embebidas en una matriz extracelular producida por sí misma, que contribuyen a la dificultad en el tratamiento de pacientes con infecciones sistémicas, debido a la alta resistencia a la respuesta inmune, a los medicamentos antifúngicos y a que genera una falla en artefactos médicos como catéteres y válvulas cardíacas que le sirven al hongo como superficie de adhesión. La formación de la biopelícula está regulada por el factor de transcripción Bcr1p y la adhesina Hwp1 (26).

e) Secreción de enzimas

Las enzimas juegan un rol fundamental en la virulencia de este hongo, ya que tienen la capacidad de romper polímeros causando daño en las membranas celulares, así como de inactivar las moléculas útiles en la defensa del organismo. Las principales enzimas son: proteasas, fosfolipasas y lipasas (18,23).

Proteasas

La actividad proteolítica en *C. albicans* se atribuye a las enzimas aspartil proteinasas que catalizan la hidrólisis de las cadenas peptídicas de las proteínas que forman parte de las membranas celulares del hospedador. La presencia de los genes de la familia de aspartil proteinasas (SAP) es única en las especies patógenas de *Candida* y están ausentes en la levadura no patógena *Saccharomyces cerevisiae*, lo cual manifiesta que estas enzimas están implicadas en su virulencia (18,19,23).

Las enzimas de secreción aspártico proteinasas (Saps) están codificadas por una familia de genes de, al menos, diez miembros, localizados en 5 cromosomas distintos. SAP 1-8 codifican proteinasas que son secretadas al espacio extracelular (20,28), mientras que SAP 9 y 10 codifican para proteínas de membrana, que están conectadas con la pared celular fúngica al poseer un sitio de unión glicosilfosfatidilinositol (GPI) (23,26,28,29).

Las Saps juegan un papel importante en la degradación de los componentes de la mucosa del hospedador como: mucina, queratina, colágeno, laminina, fibronectina y lactoferrina. También hidrolizan componentes inmunes, como citoquinas, anticuerpos y complemento; de esta manera facilitan la adhesión, la invasión a tejidos y la digestión de moléculas del sistema inmunitario del hospedador para evitar o resistir el ataque antimicrobiano de éste (8,18,20).

Existen diferencias en la expresión de las Saps, cada una de las cuales desempeña diferente papel en el establecimiento de la enfermedad y en la invasión de los tejidos. Saps 1-3 y Saps 8-10 son secretadas sólo por levaduras y contribuyen al daño tisular e invasión del epitelio oral y mucosa vaginal, mientras que Saps 4-6, producidas por las hifas, son importantes para la infección sistémica (23,30). Además, el papel de Sap 1 y Sap 3 es esencial en las infecciones de las mucosas en las fases iniciales, mientras que, Sap2 y Sap 8 juegan un rol importante en las fases más avanzadas de la infección (11).

La principal enzima proteolítica expresada por *C. albicans* es Sap 2, que está regulada por un mecanismo de retroalimentación positiva donde los péptidos resultantes de su acción inducen su síntesis. Los genes de Sap 1 y Sap 3 se expresan diferencialmente durante el cambio de fenotipo de ciertas cepas, en cambio, la expresión de Sap 8 está regulada por la temperatura (18,19).

Se ha demostrado que las diferentes Saps tienen un valor de pH óptimo para su actividad. La Sap 2 actúa sobre todo en valores de pH ácidos (cerca de 4.0), las Saps 4 a 6 son activas al pH fisiológico y la Sap 3 al pH de 2.0. Esta característica proporciona a *C. albicans* un rango muy amplio de actividad proteolítica, que va de 2.0 a 7.0, lo que es esencial para la adaptación específica hacia diferentes condiciones ambientales del hospedador (19).

Se reportan en la bibliografía distintos medios de cultivos para medir la actividad de las Saps, entre ellos se pueden mencionar: agar albúmina sérica bovina (BSA) ideado por Staib en 1966 (31); yeast carbon base agar con albúmina bovina (YCB-BSA), usado por Rùchel y col., en 1982 (32) y Cassone y col., en 1987 (33); y agar caseína empleado por Carrillo-Dover y col., 2009 (17).

Fosfolipasas

Las fosfolipasas son consideradas un importante factor de patogenicidad para *C. albicans* ya que hidrolizan los enlaces éster presentes en los fosfolípidos que componen la membrana celular del hospedador, trayendo como consecuencia la disfunción de la misma y la consecuente invasión del hongo a través de los tejidos (23).

La familia de enzimas fosfolipasas está compuesta por cuatro clases: A, B, C y D y está regulada por 7 genes: PLA, PLB1, PLB2, PLC1, PLC2, PLC3 y PLD1 (8,34). Aunque todas reconocen a los fosfolípidos como sustratos, cada una tiene la capacidad de romper una unión éster específica (35).

Sólo PLB1 y en menor medida PLB2, contribuyen a la patogenicidad de *C. albicans* (11,27). La expresión del gen PLB1, está regulada por factores nutricionales, medioambientales (temperatura, pH), y por la fase de crecimiento de la levadura (20).

Para determinar la actividad fosfolipasa de *C. albicans* se reportan en la bibliografía dos medios de cultivo diferentes: agar Sabouraud yema de huevo (SEA) ideado por Price y col., en 1982 (36) y agar malta yema de huevo (MEA).

Lipasas

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilglicerol a glicerol y ácidos grasos libres. *C. albicans* tiene la habilidad de secretar enzimas hidrolíticas con actividad esterásica que pueden romper polímeros para proveer nutrientes, así como también, inactivar las defensas del hospedador (23). Las lipasas secretadas por *C. albicans* se codifican por una familia de genes con, al menos, 10 miembros (LIP 1- LIP 10) (18,27).

3. Métodos de conservación de microorganismos

Los objetivos primordiales que persigue la conservación de cepas microbianas son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de preservación; que durante este tiempo sobrevivan al menos el 70-80% de las células, y, por último, que estas células permanezcan morfológica y genéticamente estables (37–40). Todos estos factores hacen que mantener en buenas condiciones una colección de hongos por largos periodos de tiempo, sea una tarea que demande constante atención y vigilancia (41).

El método de conservación se selecciona teniendo en cuenta distintos factores como: las características de los microorganismos que se desean preservar, el tiempo que se desea mantener conservados los cultivos (periodos de tiempos cortos o largos) la cantidad de cepas que se quieren mantener, con qué finalidad serán utilizadas y cuáles son los recursos, tanto humanos como materiales, que dispone el laboratorio para dedicarse a esta tarea. Varios métodos se han descrito a lo largo del tiempo para lograr estos objetivos y ninguno de ellos es de utilización general (37,38).

Las técnicas de conservación se pueden agrupar en: a) métodos de conservación a largo plazo o de elección, b) métodos alternativos y c) métodos restringidos (37,39,42).

a) Métodos de conservación a largo plazo o de elección

Los métodos de conservación más utilizados pertenecientes a este grupo son dos: criopreservación y liofilización. Permiten detener el crecimiento de las células sin producir su muerte, de esta manera, al evitarse la aparición de generaciones sucesivas, se garantiza al máximo la estabilidad genética (37,42,43). Esto los transforma en los métodos más recomendables y se emplean fundamentalmente cuando se desea mantener las cepas por periodos de tiempo muy prolongados (44).

La crioconservación consiste en guardar una suspensión de células a temperaturas inferiores a cero grados Celsius, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento (37). Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de crioconservación debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, esto le confiere un alto grado de fragilidad (45,46).

La lesión celular se explica en función de la formación de hielo intracelular (consecuencia de una velocidad de enfriamiento inadecuada) y la acción combinada de factores físicos, como el stress osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares a consecuencia de la formación de hielo y la fuerza física constituida por el frente de hielo en expansión que presiona sobre las células. Esto resultaría en deformación de las células (45).

La temperatura de almacenamiento debe ser lo más baja posible. Lo mejor es guardar las cepas en tubos sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de -195°C , o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140°C . También existen armarios congeladores, de los cuales los más aconsejables son los que alcanzan temperaturas por debajo de -70°C (42).

Dentro de las ventajas de la crioconservación se pueden nombrar la alta viabilidad de las cepas conservadas con períodos de sobrevivencia de más de 30 años, el alto grado de estabilidad y que es un método muy simple (39). Sin embargo, tiene el inconveniente de requerir aparatos especiales, existe el peligro de que algún fallo del sistema produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento y, además, resulta ser un método poco práctico para realizar envío de cepas (42).

La conservación por liofilización se basa en paralizar el metabolismo por deshidratación celular sometiendo la muestra a congelación y sublimación. La disminución en el contenido de humedad residual da lugar a un material compacto que

se disuelve posteriormente con facilidad. Una vez liofilizadas las cepas, éstas se pueden almacenar a temperatura ambiente (44).

La liofilización es un método de conservación muy recomendable por su comodidad en el almacenamiento y el envío de cepas (37,47). Además, los hongos pueden conservarse durante años manteniendo las propiedades morfológicas y bioquímicas originales. Su principal inconveniente es que requiere de un equipamiento especial y es un proceso complejo (48).

Los fenómenos fisicoquímicos que se producen durante la congelación y liofilización pueden afectar la viabilidad de la célula, por lo que resulta imprescindible trabajar con un agente protector que impida la lisis celular debido a la disminución de la temperatura, es decir, aumenta la resistencia de las cepas al estrés sometido protegiéndolas de la formación de cristales de hielo (43,44,49).

Los crioprotectores son sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad. Se pueden clasificar en agentes penetrantes y no penetrantes. Los primeros, son sustancias de bajo peso molecular y por ello permeables a través de la membrana, que protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta, los más utilizados son: glicerol, dimetilsulfóxido y propanediol. Los agentes crioprotectores no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano (45,46).

La elección del crioprotector, va a depender del tipo de microorganismo que se va a conservar; el más conveniente para criopreservar estructuras fúngicas es el glicerol, y el más favorable para liofilizarlas es la leche descremada (37,42).

b) Métodos alternativos

Los métodos alternativos se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de elección, bien por carecer de los equipos necesarios, o bien porque la cepa microbiana no resiste a los tratamientos de conservación por estos métodos (37,44).

Los métodos alternativos más comunes son: conservación por transferencia periódica, bajo aceite mineral, por congelamiento y por suspensión en agua destilada. Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar uno solo, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando varios de estos métodos (39,42).

La conservación por transferencia periódica es un método tradicional en el que se replica periódicamente el microorganismo a un medio de cultivo fresco, antes de la pérdida del cultivo predecesor (44). Este método tiene la limitante de incrementar el riesgo de contaminación y de permitir el crecimiento del microorganismo, lo que puede hacer cambiar espontáneamente sus características. Además, se requiere un espacio grande de almacenamiento (39,43).

Un complemento para la transferencia periódica es atenuar el metabolismo de los microorganismos adicionando aceite mineral lo que disminuiría la velocidad de transferencia de oxígeno y además evitaría en la medida de lo posible, la desecación del medio de cultivo. Adicionalmente, el almacenamiento a 4°C favorece la estabilidad y minimiza la frecuencia de resiembra (42,44).

La conservación bajo capa de aceite mineral consiste en sembrar trozos de cultivos de hongos ya desarrollados, en tubos que contienen agar extracto de malta dispuesto en forma de taco y posteriormente se cubren con una capa de aceite mineral estéril. Los cultivos son viables por dos años a temperatura ambiente o refrigerados. Es un método rápido, económico y poco laborioso (37,38,47).

La conservación por congelamiento mantiene una temperatura entre -10°C y -25°C. Los cultivos se preparan de la misma manera que en el caso de la crioconservación y son colocados en congelador. Este método permite la

sobrevivencia de bacterias y levaduras en algunos casos por años y en la mayoría de las veces por al menos 6 a 12 meses (47).

La conservación por suspensión en agua destilada estéril fue propuesta por Castellani hace más de 4 décadas (48) y de allí proviene su nombre. Ha demostrado ser una técnica que garantiza porcentajes elevados de viabilidad, pureza y estabilidad fenotípica de las cepas ya que disminuye la tendencia al pleomorfismo (50). Además, es una técnica de bajo costo y sencillez, que no requiere de personal especializado. Esto lo convierte en una ventajosa alternativa para el mantenimiento de pequeñas colecciones de hongos en laboratorios con recursos limitados (38,40,41,43,47,51,52).

c) Métodos restringidos

Los métodos restringidos no son empleados habitualmente, pero es necesario recurrir a ellos a la hora de conservar grupos de microorganismos muy determinados que no resisten los métodos de elección. Estos métodos se basan en detener el crecimiento de las células por eliminación del agua disponible. Los más comunes son: desecación en papel de filtro y la desecación en tierra, arena o sílica gel o algún otro soporte apropiado (37,42).

Estos métodos de conservación son particularmente útiles para preservar microorganismos productores de esporas y su acción se debe a la drástica reducción de su metabolismo. Sin embargo, no todos los microorganismos sobreviven a estos métodos de secado, por lo que se hace necesario añadir agentes protectores (leche descremada o glutamato sódico al 10%). Una vez secos es importante mantener el producto sellado para evitar el contacto con el aire ya que son higroscópicos (39).

La desecación en papel de filtro se basa en utilizar un papel de filtro absorbente y estéril que se impregna en una solución muy densa de células y se deja secar al aire en condiciones de esterilidad. Una vez secos los discos se colocaron en tubos Eppendorf estériles a 4°C hasta su nuevo uso (42,53).

También es posible desecarlos por desecación líquida, se utiliza para ello un liofilizador, pero sin que haya habido congelación previa de las células. El vacío producido por el liofilizador deseca las células, pero hay que evitar que un vacío excesivo provoque evaporación brusca con ebullición o que la temperatura disminuya demasiado, ocasionando la congelación incontrolada de las células (39,42).

La desecación en suelo, arena o sílica gel, se basa en añadir las células a estos sustratos que las protegerán al desecar. Los microorganismos productores de esporas se pueden conservar durante bastante tiempo por este método (39,42).

JUSTIFICACIÓN

Candida albicans es la especie tipo y la más extensamente estudiada, tanto en su aspecto oportunista como en los factores de virulencia, epidemiología, perfil de sensibilidad a los antifúngicos y como modelo de patógeno fúngico (1). La conservación de cepas es indispensable en un laboratorio de Micología debido a que son consideradas material necesario para enseñanza, investigación y como testigos para estudios especiales (41,51). Un método de conservación muy utilizado y que aporta altos porcentajes de viabilidad, es la suspensión en agua destilada estéril (38,40,41,43,47,52). Sin embargo, aún no se ha comprobado que mantenga la estabilidad en caracteres específicos, como los factores de patogenicidad (39,42).

Debido al incremento en la incidencia de las candidiasis de las últimas décadas, hay un gran interés en la investigación de sus factores de virulencia con la finalidad de establecer una relación entre estos factores y la patogenicidad, diseñar estrategias de control y prevención, así como desarrollar nuevos agentes terapéuticos con estos factores como posibles blancos de acción (24,27,54). A pesar de que existen numerosas publicaciones en las cuales se examina la producción de enzimas hidrolíticas en aislados de *C. albicans* y su papel en la patogénesis de las candidiasis (20,22,54–56), la preservación de la secreción enzimática a lo largo del tiempo de conservación aún no ha sido exhaustivamente estudiada (39,42).

Debido a que existen escasos reportes en la literatura, resulta importante analizar la actividad enzimática a través del tiempo de conservación para comprobar si los métodos de Castellani y congelación son útiles para mantener estable la producción de esterasa, proteinasa y fosfolipasa en cepas de *C. albicans*. El análisis de esta información es una herramienta valiosa a la hora de identificar hasta qué tiempos se pueden preservar las cepas aisladas de distintas muestras clínicas, para garantizar la reproducibilidad de las investigaciones microbiológicas y conocer cuál de los dos métodos de conservación es más eficaz.

HIPÓTESIS

La producción de las enzimas: proteinasa, fosfolipasa y esterasa de cepas de *Candida albicans* disminuyen con el tiempo de conservación empleando los métodos de Castellani y el de congelación, sin encontrar diferencias entre ambas técnicas.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del tiempo de preservación empleando los métodos de Castellani y congelación sobre la actividad proteolítica, fosfolipasa y esterásica de cepas de *Candida albicans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Tipificar cepas de *Candida* spp. aisladas de muestras clínicas, por la metodología convencional y por espectrometría de masa. Seleccionar las cepas de *C. albicans*.

- Conservar las cepas de *C. albicans* durante un año según los métodos de Castellani y congelación.

- Comprobar la viabilidad de las cepas de *C. albicans* durante un año en ambos métodos de conservación.

- Analizar la variación de la actividad proteolítica, fosfolipasa y esterásica de las cepas de *C. albicans* a las 24, 48 y 72 horas de incubación durante un año con ambos métodos de conservación.

- Establecer el porcentaje de actividad proteolítica, fosfolipasa y esterásica de las cepas de *C. albicans* durante un año con ambos métodos de conservación.

- Comparar la actividad enzimática de *C. albicans* a diferentes tiempos de conservación (0, 2, 4, 6 y 12 meses) empleando ambos métodos.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se detallan las actividades realizadas y la metodología empleada:

1. Cepas estudiadas

Se trabajó con 30 cepas de *Candida albicans* aisladas a partir de muestras clínicas provenientes de pacientes internados y ambulatorios. Las muestras fueron remitidas al laboratorio de Microbiología del Hospital del Carmen de Mendoza, durante el periodo de tiempo comprendido entre diciembre del 2016 a diciembre del 2017. Se registraron datos acerca de la edad y sexo de cada paciente, tipo de muestra, servicio de procedencia, así como de la existencia de alguna patología subyacente si la hubiese (Anexo 1).

Los especímenes que se eligieron fueron, en su mayoría, secreciones vaginales y orinas debido a que, según estudios previos, las levaduras aisladas de estas muestras clínicas, presentan mayor actividad enzimática comparadas con otras, como: respiratorias, sangre y líquido peritoneal (5,54).

a) Aislamiento e identificación microbiológica presuntiva

El cultivo primario de las distintas muestras clínicas se efectuó en agar glucosado Sabouraud incubado en condiciones aerobias a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, las colonias obtenidas fueron sembradas en el medio CHROMagar™ *Candida*, que contiene sustancias cromógenas que confieren coloración particular a algunas colonias de especies del género *Candida*. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, este medio fue incubado en condiciones aerobias durante 48 horas a 37°C (Anexo 2).

Las cepas de *C. albicans* fueron presuntivamente identificadas por la coloración verde de las colonias (6,13,57) (Foto 1). Aquellas muestras que luego de ser

sembradas en este medio, mostraron mezcla de colores (indicando más de una especie de *Candida*) no fueron seleccionadas para el ensayo.



Foto 1. Medio de cultivo CHROMagar™ *Candida*. Se observan colonias de color verde, identificadas presuntivamente como *C. albicans*.

El estudio micromorfológico se realizó en el medio agar harina de maíz, donde se pudo observar la presencia de blastoconidios esféricos o subesféricos, solitarios, en pares, en cadena o agrupados. Pseudohifas ramificadas con blastoconidios agrupados o en cadenas y además la producción de característicos clamidoconidios (clamidosporas) grandes, redondos, terminales y de paredes gruesas (1) (Anexo 2) (Foto 2).

b) Identificación microbiológica definitiva

La identificación definitiva de *C. albicans* se realizó por espectrometría de masas por sistema MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). Las lecturas se realizaron con un espectrómetro de masas Microflex LT y el software Flex Control (versión 3.0, Bruker Daltonics). El equipo se calibró utilizando un extracto de proteínas de *Escherichia coli* (Bacterial Test Standard).

La espectrometría de masa es una técnica que permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosómicas, a

través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada especie. Posteriormente, este espectro se compara automáticamente con la base de datos y el resultado se emite junto a un puntaje o score. Es una técnica específica, rápida y confiable (58).

Existen tres principales niveles de fiabilidad: A, identificación fiable a nivel tanto de género como de especie (score ≥ 2); B, identificación fiable a nivel de género (score 1,7-2); C, identificación poco fiable (score $<1,7$) (59). En este trabajo, se seleccionaron cepas de *C. albicans* que presentaron un score $\geq 1,7$ (Anexo 4).

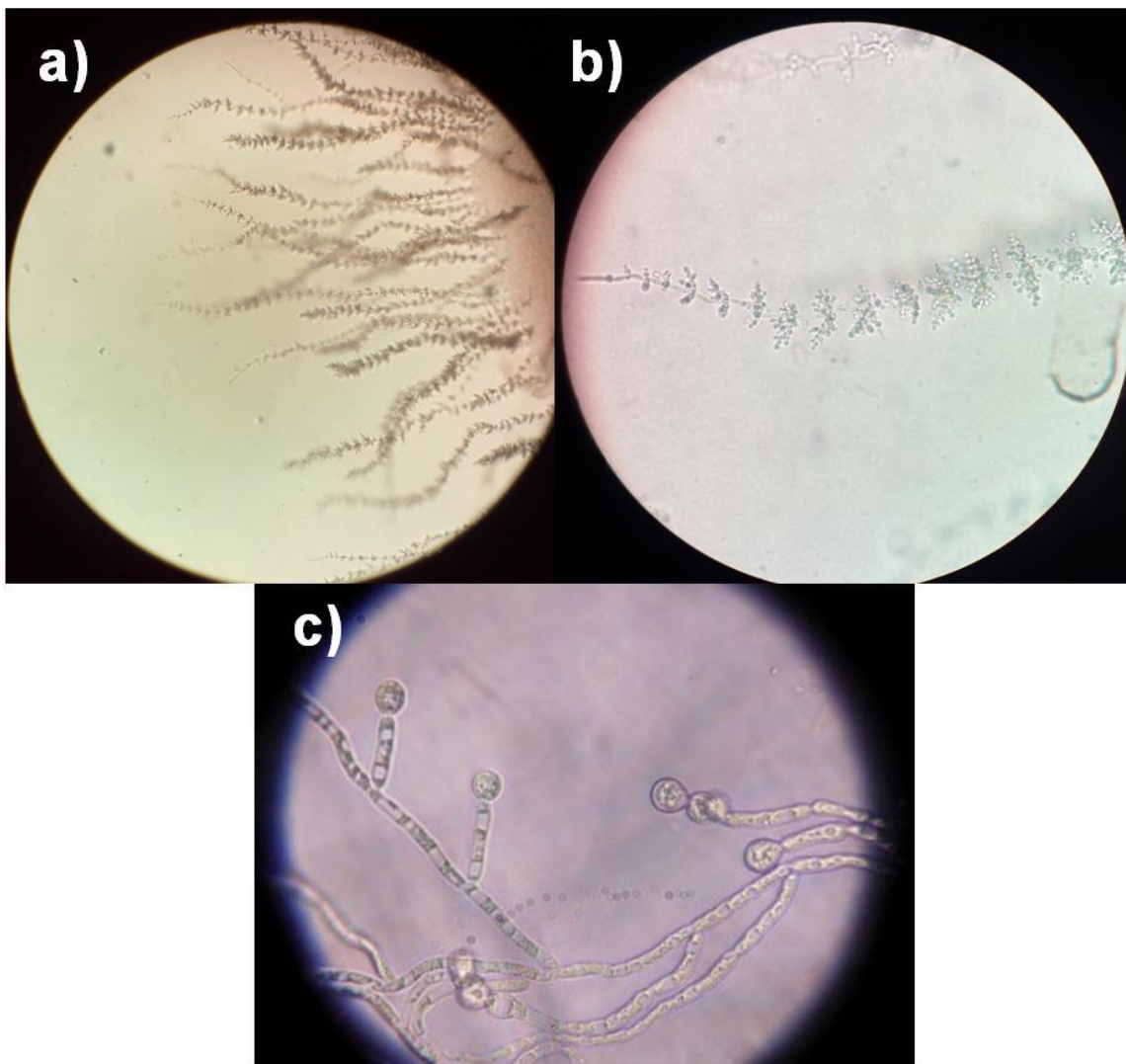


Foto 2. Medio agar harina de maíz. Se observan pseudohifas ramificadas con blastoconidios esféricos o subesféricos, solitarios, en pares, en cadena y agrupados a 4X (a) y 10X (b) y clamidosporas grandes, redondas, terminales y de paredes gruesas a 40X (c).

2. Conservación de las cepas

Debido a que todos los métodos de conservación poseen ventajas y desventajas, es recomendable utilizar más de uno y trabajar con réplicas del microorganismo que se desea conservar como medida de seguridad (44,53). Los métodos elegidos en este experimento fueron el de Castellani y el de congelación, teniendo en cuenta el equipamiento que dispone el laboratorio de Micología del Área de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo, lugar donde se llevó a cabo esta segunda parte del trabajo. Además, ambos métodos son sencillos, económicos, poco laboriosos y requieren poco espacio para el almacenamiento de las cepas (38,40,41,47,52).

Después de 72 horas del primer aislamiento de cada una de las cepas en agar Sabouraud, se realizaron 20 alícuotas para cada una, utilizando tubos Eppendorf estériles (viales), para su posterior preservación durante un año según los métodos de Castellani y congelación. La edad del cultivo es muy importante a la hora de conservar cualquier microorganismo; se deben utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento ya que, las células son más resistentes a la congelación-descongelación que en la etapa exponencial (39,42,49).

a) Método de Castellani

Los primeros 10 viales seleccionadas para este método, contenían 3 mL de agua destilada estéril y una ansada de la colonia a estudiar, de manera de obtener una densidad superior a la del tubo N° 2 del estándar de Mac Farland. Luego, se almacenaron en refrigeración a 4°C (52,60,61) durante un año y se utilizaron al cumplir los siguientes tiempos de conservación: 2 semanas (considerado como mes 0), 2, 4, 6 y 12 meses. Para cada tiempo de conservación fueron previstas 2 alícuotas.

b) Método de congelación

Los otros 10 viales contenían 3 mL de agua destilada estéril, una gota de glicerol al 10% estéril, utilizado como crioprotector y una ansada de la colonia a estudiar de manera de obtener una densidad superior a la del tubo N° 2 del estándar de Mac Farland. Luego, se almacenaron en freezer a -18°C (37,39,44) durante un año y se utilizaron al cumplir los mismos tiempos de conservación planteados con el método de Castellani.

El pasaje de cada tubo Eppendorf de temperatura ambiente a menor temperatura fue realizado de manera gradual para evitar la formación de cristales de hielo y así alcanzar alta viabilidad de los microorganismos. Inversamente, para descongelar cada uno de los tubos Eppendorf se hizo mediante el calentamiento de la suspensión en baño María a 37°C durante 15 minutos de manera de obtener un descongelado rápido (37,39,44).

3. Estudio de las actividades enzimáticas

a) Actividad proteolítica en medio sólido

El medio que se eligió para la determinación de la producción de proteinasas de las cepas de *C. albicans* fue el agar albúmina sérica bovina (BSA), con el fin de estimular la producción de aspartil-proteasas, necesarias para la utilización de la albúmina como fuente de nitrógeno (22,31,62) (Anexo 3) (Foto 3).

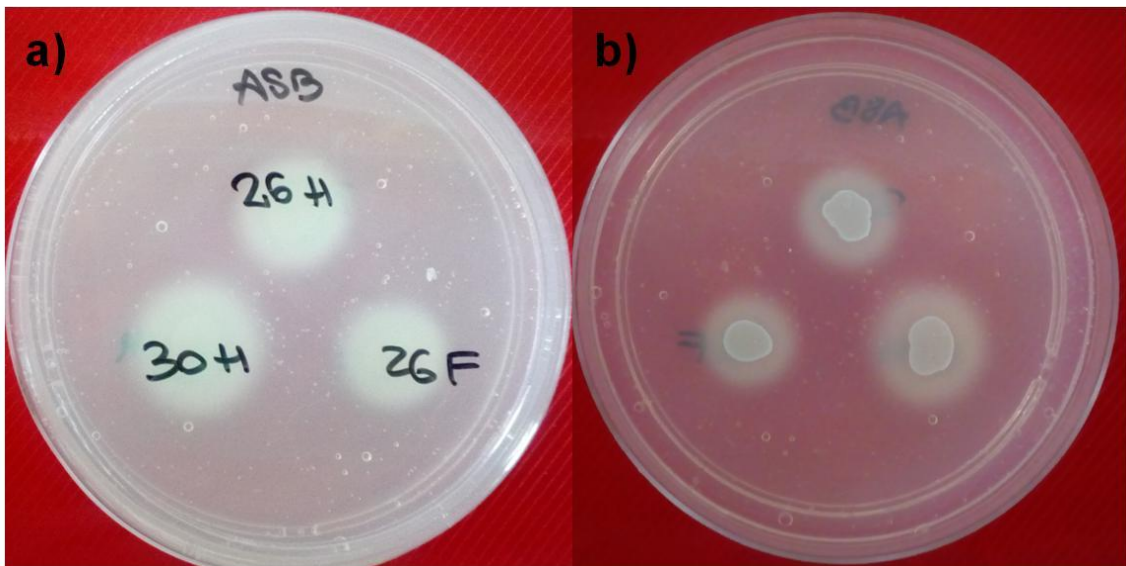


Foto 3. Placa con agar albúmina sérica bovina con cepas de *C. albicans*, en su lado anverso (a) y reverso (b). Se observa un característico halo alrededor de cada colonia a las 72 horas de incubación. “H” indica conservación en heladera (método de Castellani) y “F” indica conservación en freezer (método de congelación).

a) Actividad fosfolipasa en medio sólido

Para determinar la actividad fosfolipasa de las cepas de *C. albicans* se utilizó el agar Sabouraud yema de huevo (SEA) (Anexo 3). Debido a la acción de las enzimas fosfolipasas secretadas al medio, se produce la hidrólisis de los fosfolípidos presentes en el mismo, liberándose ácidos grasos, que al unirse a los iones de calcio del medio forman complejos insolubles que precipitan en el agar, formando un característico halo alrededor de la colonia cuya medida sería un reflejo de la actividad enzimática de la cepa estudiada (35) (Foto 4).

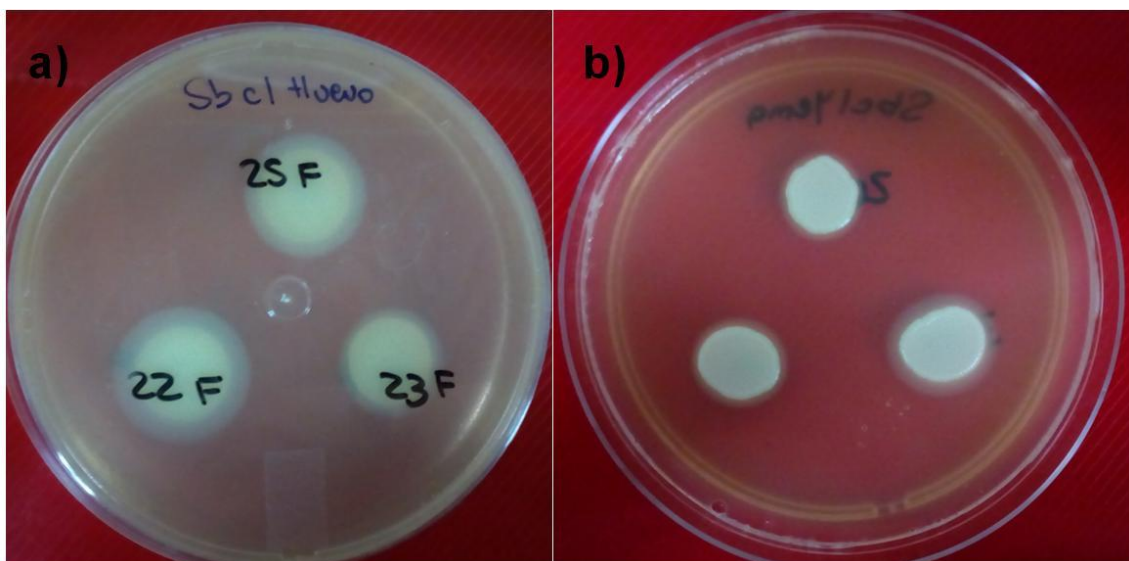


Foto 4. Placa de agar Sabouraud yema de huevo con cepas de *C. albicans*, en su lado anverso (a) y reverso (b). Se observa un característico halo alrededor de cada colonia a las 72 horas de incubación. "F" indica conservación en freezer (método de congelación).

c) Actividad esterásica en medio sólido

Para la determinación de la actividad esterásica de las cepas de *C. albicans*, se utilizó el test de opacidad del Tween 80, descrito por Rudek en 1978 (63), y usado con posterioridad por múltiples autores (24,55,64–67) (Anexo 3).

La hidrólisis del Tween 80 está mediada por enzimas lipolíticas secretadas por *C. albicans*. Como consecuencia de su actividad, se liberan ácidos grasos que al unirse al calcio incorporado en el medio forman complejos insolubles que producen el característico halo de precipitación alrededor de la colonia (64,65) (Foto 5).

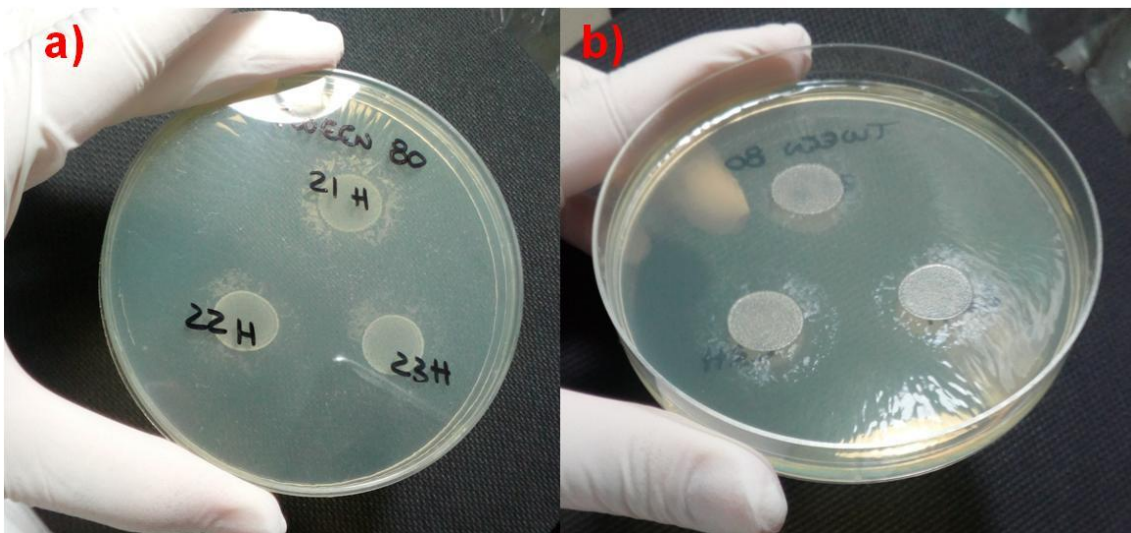


Foto 5. Placa con Medio Tween 80 con cepas de *C. albicans*, en su lado anverso (a) y reverso (b). Se observa un característico halo alrededor de cada colonia a las 78 horas de incubación.

“H” indica conservación en heladera (método de Castellani).

4. Viabilidad de las cepas y medición de la actividad enzimática

En todas las cepas conservadas por los métodos de Castellani y congelación durante 2 semanas, 2, 4, 6 y 12 meses, se determinó su viabilidad y midió la actividad proteolítica, fosfolipasa y esterásica por triplicado calculando el índice de actividad enzimática de manera simultánea. Para ello, los viales se descongelaron y agitaron en vórtex durante un minuto. Posteriormente, se sembraron en tubos que contenían medio Sabouraud en pico de flauta y se incubaron a 28°C durante 24 horas. Cabe destacar que los viales no se utilizaron directamente ya que provenían de una situación de estrés, no siendo adecuado para realizar ningún tipo de prueba (39,42,47).

Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se observaron los cultivos y determinó la viabilidad de las cepas: considerándose viables aquellas en las cuales se observó desarrollo visible, por el contrario, como cepas no viables quedaron incluidas aquellas donde, luego de dos intentos, no se obtuvo crecimiento.

Para medir la actividad enzimática, se preparó una suspensión con cada una de las cepas en solución fisiológica estéril hasta obtener una turbidez semejante al tubo 0,5 del estándar de Mac Farland (17). Se sembraron 10 µL de cada una de las suspensiones, por triplicado, en distintas placas con los medios BSA, SEA y Tween 80 (con un máximo de tres muestras por placa) (Foto 6). Los medios se incubaron a 37°C durante 24, 48 y 72 horas. Sólo para la actividad esterásica, la incubación se extendió hasta las 78 horas debido a un retardo en la expresión de esta actividad (Anexo 5).

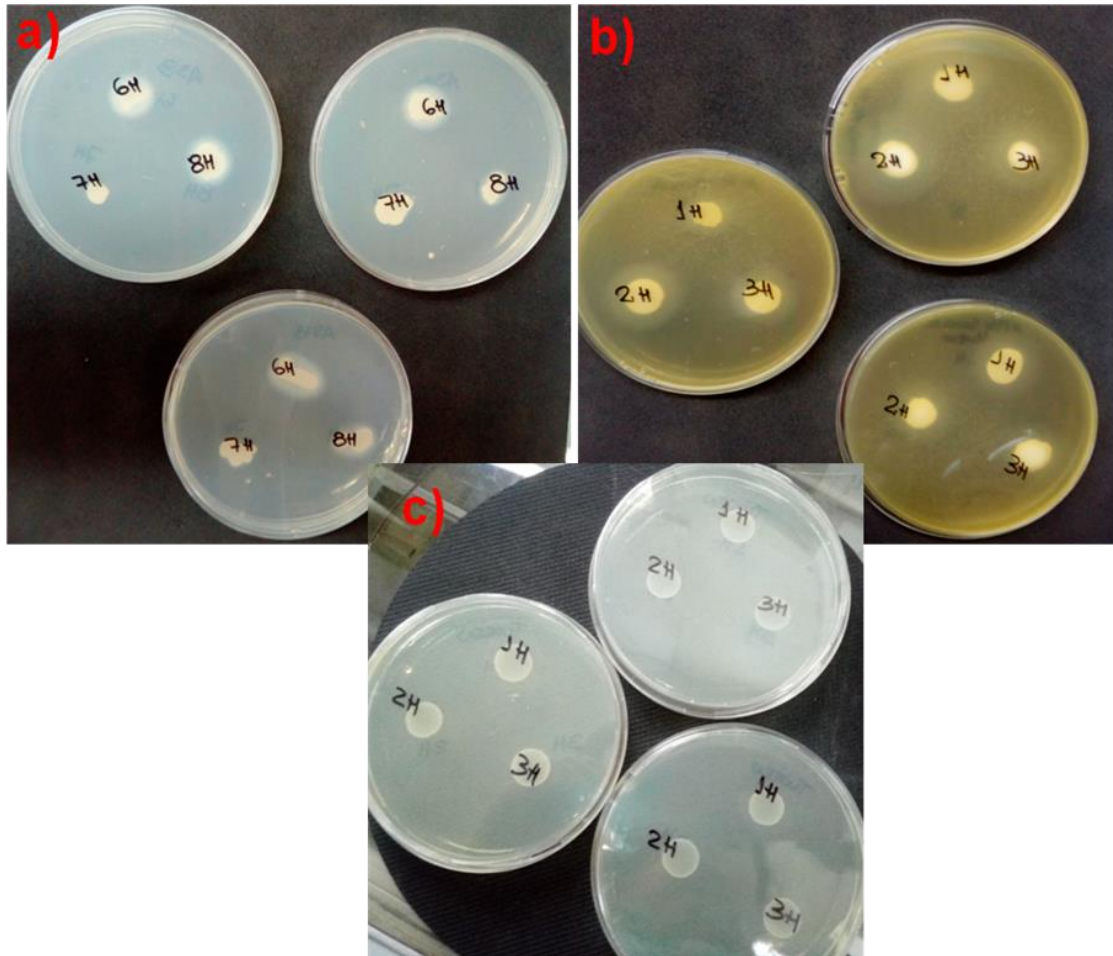


Foto 6. Cepas de *C. albicans* sembradas por triplicado y en distintas placas, en los medios agar albúmina sérica bovina (a), Sabouraud yema de huevo (b) y Tween 80 (c). “H” indica conservación en heladera (método de Castellani).

Las lecturas de cada actividad enzimática se realizaron a las 24, 48 y 72 horas de incubación (y 78 horas para la esterásica) midiendo, con un calibre, el diámetro de la colonia y el diámetro de la colonia más el halo o la zona de hidrólisis. A partir de la relación entre estos valores se procedió a determinar las diferentes actividades enzimáticas de las cepas de *C. albicans*, expresando los resultados mediante la valoración del índice Pz (“Precipitation zone”) (36,68) (Foto 7).

$$\text{Índice Pz} = \frac{\text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro de la colonia} + \text{Halo de hidrólisis}}$$

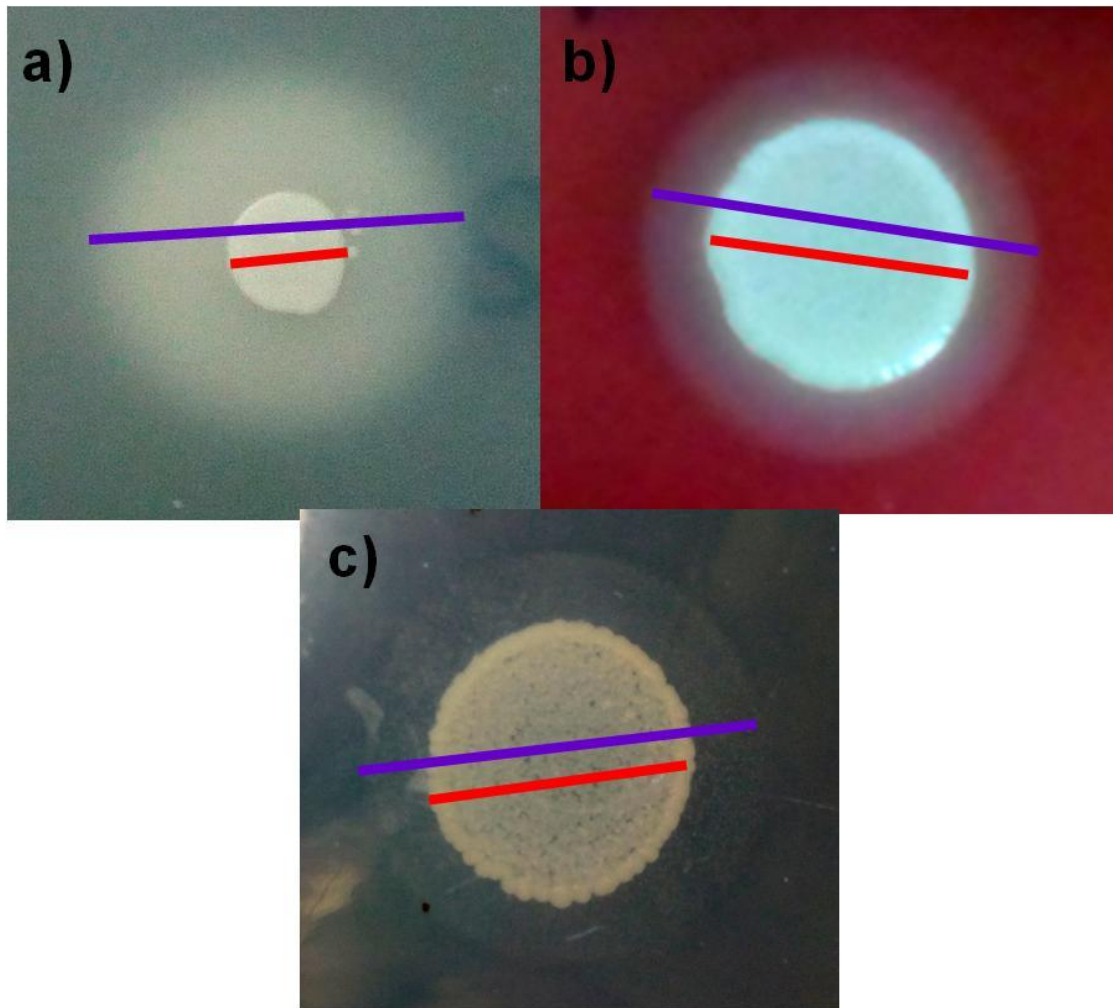


Foto 7. Cepa de *C. albicans* en los medios agar albúmina sérica bovina (a), Sabouraud yema de huevo (b) y Tween 80 (c). Las líneas rectas rojas y violetas indican el diámetro de la colonia y el diámetro de la colonia más el halo o la zona de hidrólisis, respectivamente. A partir de la relación entre estos valores se calculan los índices Pz.

El índice Pz puede tomar valores que van desde 0 a 1, correspondiendo aquellos más próximos a 0 a niveles máximos de actividad enzimática. Inversamente aquellos índices con valores próximos a 1 fueron indicativos de un bajo nivel en dicha actividad (17,54,69). Se establecieron los siguientes rangos de actividad: alta ($Pz \leq 0,4$), media ($Pz 0,41-0,6$), baja ($Pz 0,61-0,8$), muy baja ($Pz 0,81-0,99$) y nula ($Pz 1$) (55).

5. Consideraciones del diseño experimental

El diseño experimental se esquematizó en la foto 8, donde se muestran 20 alícuotas (2 tubos Eppendorf por 5 tiempos por 2 métodos de conservación) preparadas para cada cepa de *C. albicans* (N=30, total: 600 alícuotas). Estas alícuotas, se usaron en la medida en que fueron cumpliendo los tiempos planteados. Cada tubo Eppendorf, después de ser utilizado, fue descartado para garantizar la efectividad del método de conservación.

Se estudió la actividad enzimática en tandas de 5 cepas debido a motivos logísticos (capacidad de la estufa de incubación, preparación de medios de cultivos y obtención de aislamientos positivos para *C. albicans* de pacientes del Hospital del Carmen). Además, siempre se cumplió el requisito de obtener 5 aislamientos de distintas muestras en un tiempo no mayor a una semana. A medida que se fueron aislando, se fueron tipificando y conservando según los métodos propuestos.

Una vez que se cumplieron 2 semanas desde la primera cepa aislada, se realizó el ensayo con la primera medición temporal (0 mes) de las tres actividades enzimáticas. Luego, se esperó a que las cepas cumplieran los 2 meses de conservación y así sucesivamente. Mientras tanto, se siguieron juntando otras 5 cepas (hasta llegar a las 30) y repitiendo el procedimiento anterior.

Cada vez que se realizó el experimento se necesitaron 5 días consecutivos. El 1º día, se plaquearon los medios de cultivos BSA, SEA y Tween 80 (realizados con anterioridad) obteniendo 10 placas por cada uno de ellos. Además, se descongelaron 10 viales con las cepas de *C. albicans* (5 por cada método de conservación), se sembraron en tubos con medio Sabouraud e incubaron a 28°C durante 24 horas.

El 2º día, se observó la viabilidad de cada una de las cepas. En aquellas donde no hubo crecimiento se volvió a descongelar otro vial y se repitió el procedimiento anterior. Con las cepas en donde sí hubo crecimiento, se prepararon los inóculos y se sembraron en los distintos medios por triplicado. Las placas se incubaron en estufa a

37°C. El 3º día, (a las 24 horas de incubación) se midieron los diámetros de las colonias y los diámetros de las colonias más los halos. Repitiéndose este último procedimiento a las 48, 72 y 78 horas (para el caso de la actividad esterásica) de incubación.

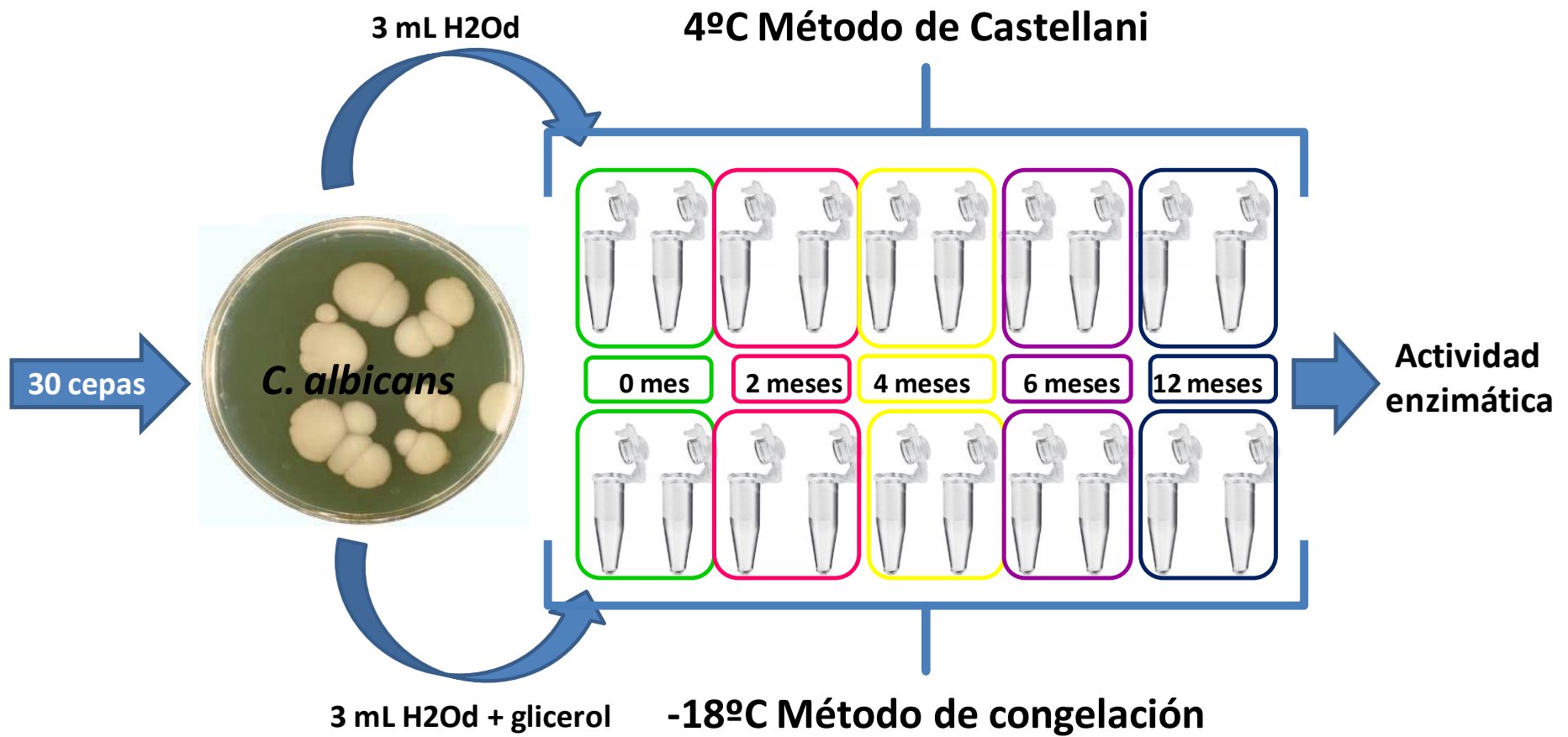


Foto 8. Esquema que resume el diseño experimental para cada cepa de *C. albicans* (20 alícuotas por 30 cepas).

6. Análisis estadísticos

La viabilidad de las cepas de *C. albicans* se expresó a partir del recuento de cepas vivas en función del total de cepas analizadas (%) en los 5 tiempos de conservación según los métodos de Castellani y congelación. De la misma manera se expresó el porcentaje de cepas con actividad proteolítica, fosfolipasa y esterásica luego de las 72 horas de incubación.

Las actividades enzimáticas, para cada método y tiempo de conservación, se describieron utilizando medidas de tendencia central de los índices Pz, como: promedio, desviación estándar, error estándar, coeficiente de variación, valor mínimo y máximo, mediana, percentil 25 y 75. La estadística descriptiva se realizó para las 24, 48, 72 y 78 horas de incubación.

Para cada actividad enzimática se realizó la comparación de los índices Pz entre los métodos y tiempos de conservación utilizando análisis no paramétricos (prueba de Kruskal Wallis) debido a que los datos no cumplieron los supuestos de normalidad (prueba de Shapiro Wilks modificado). Sin embargo, se cumplió con el supuesto de homogeneidad de varianzas mediante la prueba F. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. En todos los análisis estadísticos se utilizó el programa InfoStat versión 2018 (70).

RESULTADOS

1. Viabilidad de las cepas de *C. albicans*

Las 30 cepas de *C. albicans* analizadas mantuvieron su vitalidad hasta el sexto mes de conservación con ambos métodos. Las diferencias en la supervivencia se observaron al año de conservación; mostrando con el método de Castellani una reducción del 33,33%, mientras que con el de congelación, se mantuvo la viabilidad del 100% (Figura 1).

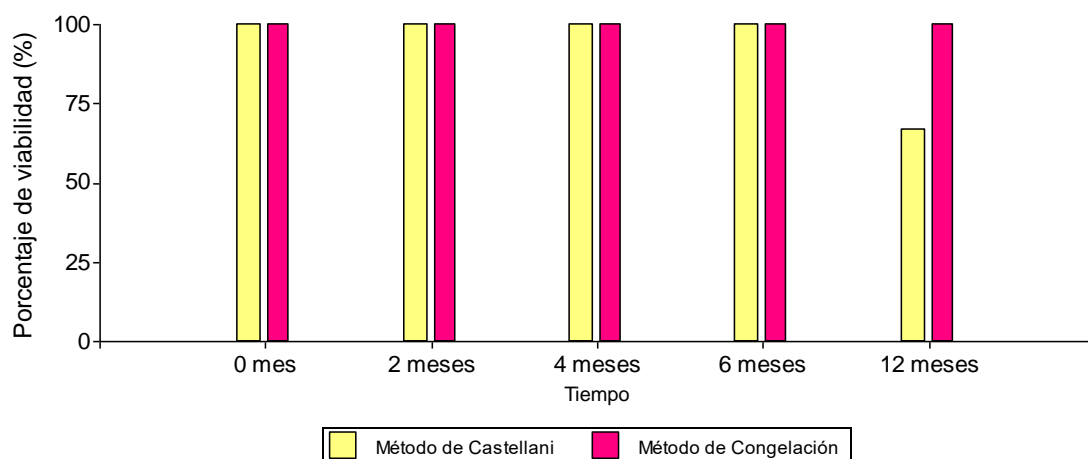


Figura 1. Porcentaje de viabilidad de 30 cepas de *C. albicans* a través del tiempo de conservación según los métodos de Castellani y congelación.

2. Influencia del tiempo de lectura sobre la determinación de la actividad enzimática

a) Actividad proteolítica

A partir de las 24 horas de incubación, en la primera medición temporal, el mayor porcentaje de las cepas presentó actividad proteolítica media; esto se mantuvo a lo largo de las 48 y 72 horas con ambos métodos de conservación, a excepción de la lectura a las 24 horas con el método de congelación, donde la mayor proporción presentó actividad nula.

A partir del 2º mes, a las 24 horas de incubación, el mayor porcentaje de las cepas presentó actividad proteolítica alta, manteniéndose a lo largo de las 48 y 72 horas con ambos métodos de conservación y durante el resto del ensayo, a excepción de la lectura a las 48 horas, a los 12 meses con el método de Castellani, donde el 50% de las cepas presentó actividad media (Tabla 1).

b) Actividad fosfolipasa

En la lectura de las 24 y 48 horas de incubación, con ambos métodos de conservación y a lo largo de todo el ensayo, el mayor porcentaje de las cepas expresó actividad fosfolipasa nula y baja, respectivamente. A las 72 horas, se observó que la mayor proporción de las cepas presentó actividad media hasta el 4º mes y baja a partir del 6º mes, con ambos métodos de conservación (Tabla 2).

c) Actividad esterásica

En la lectura de las 24 y 48 horas de incubación, con ambos métodos de conservación y a lo largo de todo el ensayo, el mayor porcentaje de las cepas expresó actividad esterásica nula. A las 72 horas, se observó que la mayor proporción de las cepas presentó actividad baja hasta el 4º mes y nula a partir del 6º mes, con ambos métodos de conservación.

A todas las cepas del ensayo se las dejó incubar seis horas más para facilitar la lectura de los halos. Así, a las 78 horas, el mayor porcentaje de las cepas expresó actividad media, esto se mantuvo con ambos métodos y a lo largo de todo el ensayo, a excepción de los 12 meses con el método de Castellani donde la mayor proporción presentó actividad nula (Tabla 3).

Tabla 1. Actividad proteolítica de cepas viables de *C. albicans* a 24, 48 y 72 horas de incubación en cinco tiempos de conservación según los métodos de Castellani y congelación. N° y % indican frecuencia absoluta y relativa respectivamente.

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA														
Tiempo de conservación	Índice Pz	Rangos	Método de conservación											
			Castellani						congelación					
			24 hs		48 hs		72 hs		24 hs		48 hs		72 hs	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0 mes	Alto	< 0,41	3	10	4	13	3	10	6	20	6	20	2	7
	Medio	0,41-0,6	13	43	13	43	13	43	9	30	13	43	15	50
	Bajo	0,61-0,8	1	3	7	23	7	23	2	7	4	13	5	17
	Muy bajo	0,81-0,99	1	3	3	10	4	13	1	3	3	10	4	13
	Nulo	1	12	40	3	10	3	10	12	40	4	13	4	13
2 meses	Alto	< 0,41	11	37	14	47	11	37	12	40	14	47	12	40
	Medio	0,41-0,6	9	30	8	27	11	37	8	27	8	27	9	30
	Bajo	0,61-0,8	2	7	3	10	2	7	2	7	1	3	1	3
	Muy bajo	0,81-0,99	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	1	3
	Nulo	1	8	27	5	17	5	17	8	27	7	23	7	23
4 meses	Alto	< 0,41	12	40	13	43	10	33	14	47	13	43	12	40
	Medio	0,41-0,6	6	20	6	20	9	30	4	13	5	17	5	17
	Bajo	0,61-0,8	3	10	1	3	1	3	1	3	2	7	2	7
	Muy bajo	0,81-0,99	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	1	3
	Nulo	1	9	30	10	33	10	33	10	33	10	33	10	33
6 meses	Alto	< 0,41	17	57	17	57	17	57	17	57	18	60	15	50
	Medio	0,41-0,6	6	20	9	30	7	23	8	27	7	23	9	30
	Bajo	0,61-0,8	2	7	0	0	2	7	1	3	2	7	2	7
	Muy bajo	0,81-0,99	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0
	Nulo	1	5	17	4	13	4	13	4	13	2	7	4	13
12 meses	Alto	< 0,41	12	60	9	45	10	50	19	63	20	67	19	63
	Medio	0,41-0,6	6	30	10	50	7	35	10	33	10	33	8	27
	Bajo	0,61-0,8	1	5	0	0	2	10	1	3	0	0	3	10
	Muy bajo	0,81-0,99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nulo	1	1	5	1	5	1	5	0	0	0	0	0	0

Tabla 2. Actividad fosfolipasa de cepas viables de *C. albicans* a 24, 48 y 72 horas de incubación en cinco tiempos de conservación según los métodos de Castellani y congelación. N° y % indican frecuencia absoluta y relativa respectivamente.

ACTIVIDAD FOSFOLIPASA														
Tiempo de conservación	Índice Pz	Rangos	Método de conservación											
			Castellani						congelación					
			24 hs		48 hs		72 hs		24 hs		48 hs		72 hs	
			N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
0 mes	Alto	< 0,41	0	0	0	0	7	23	0	0	0	0	8	27
	Medio	0,41-0,6	0	0	9	30	16	53	0	0	9	30	17	57
	Bajo	0,61-0,8	0	0	13	43	4	13	0	0	17	57	4	13
	Muy bajo	0,81-0,99	0	0	3	10	1	3	0	0	1	3	0	0
	Nulo	1	30	100	5	17	2	7	30	100	3	10	1	3
2 meses	Alto	< 0,41	0	0	0	0	5	17	0	0	0	0	2	7
	Medio	0,41-0,6	0	0	12	40	17	57	0	0	12	40	20	67
	Bajo	0,61-0,8	0	0	14	47	7	23	0	0	13	43	8	27
	Muy bajo	0,81-0,99	1	3	2	7	1	3	0	0	1	3	0	0
	Nulo	1	29	97	2	7	0	0	30	100	4	13	0	0
4 meses	Alto	< 0,41	0	0	0	0	6	20	0	0	0	0	10	33
	Medio	0,41-0,6	0	0	9	30	13	43	0	0	11	37	10	33
	Bajo	0,61-0,8	0	0	15	50	9	30	0	0	14	47	8	27
	Muy bajo	0,81-0,99	0	0	2	7	1	3	0	0	1	3	1	3
	Nulo	1	30	100	4	13	1	3	30	100	4	13	1	3
6 meses	Alto	< 0,41	0	0	0	0	4	13	0	0	0	0	3	10
	Medio	0,41-0,6	0	0	6	20	8	27	0	0	4	13	10	33
	Bajo	0,61-0,8	0	0	13	43	13	43	0	0	15	50	15	50
	Muy bajo	0,81-0,99	0	0	6	20	2	7	0	0	6	20	1	3
	Nulo	1	30	100	5	17	3	10	30	100	5	17	1	3
12 meses	Alto	< 0,41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Medio	0,41-0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7
	Bajo	0,61-0,8	1	5	10	50	13	65	0	0	12	40	17	57
	Muy bajo	0,81-0,99	1	5	3	15	5	25	0	0	7	23	11	37
	Nulo	1	18	90	7	35	2	10	30	100	11	37	0	0

Tabla 3. Actividad esterásica de cepas viables de *C. albicans* a 24, 48, 72 y 78 horas de incubación en cinco tiempos de conservación según los métodos de Castellani y congelación. N° y % indican frecuencia absoluta y relativa respectivamente.

ACTIVIDAD ESTERÁSICA																		
Tiempo de conservación	Índice Pz	Rangos	Método de conservación															
			Castellani								congelación							
			24 hs		48 hs		72 hs		78 hs		24 hs		48 hs		72 hs		78 hs	
			N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
0 mes	Alto	< 0,41	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0	2	10
	Medio	0,41-0,6	0	0	1	3	8	27	10	50	0	0	1	3	8	27	13	65
	Bajo	0,61-0,8	0	0	5	17	13	43	6	30	0	0	6	20	14	47	4	20
	Muy bajo	0,81-0,99	2	7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0
	Nulo	1	28	93	24	80	9	30	3	15	30	100	22	73	8	27	1	5
2 meses	Alto	< 0,41	0	0	0	0	0	0	2	7	0	0	0	0	0	0	2	7
	Medio	0,41-0,6	0	0	1	3	5	17	17	57	0	0	2	7	5	17	19	63
	Bajo	0,61-0,8	0	0	5	17	14	47	7	23	0	0	2	7	15	50	2	7
	Muy bajo	0,81-0,99	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0
	Nulo	1	30	100	24	80	10	33	4	13	30	100	25	83	10	33	7	23
4 meses	Alto	< 0,41	0	0	0	0	0	0	2	7	0	0	0	0	0	0	1	3
	Medio	0,41-0,6	0	0	2	7	8	27	17	57	0	0	2	7	9	30	20	67
	Bajo	0,61-0,8	0	0	7	23	12	40	4	13	0	0	8	27	11	37	2	7
	Muy bajo	0,81-0,99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nulo	1	30	100	21	70	10	33	7	23	30	100	20	67	10	33	7	23
6 meses	Alto	< 0,41	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	2	7
	Medio	0,41-0,6	0	0	2	7	10	33	14	47	0	0	1	3	8	27	11	37
	Bajo	0,61-0,8	0	0	7	23	8	27	6	20	0	0	9	30	9	30	5	17
	Muy bajo	0,81-0,99	0	0	1	3	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	3	10
	Nulo	1	30	100	20	67	12	40	8	27	30	100	20	67	13	43	9	30
12 meses	Alto	< 0,41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7
	Medio	0,41-0,6	0	0	1	5	3	15	7	35	0	0	1	3	6	20	13	43
	Bajo	0,61-0,8	0	0	2	10	7	35	5	25	0	0	5	17	11	37	10	33
	Muy bajo	0,81-0,99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nulo	1	20	100	17	85	10	50	8	40	30	100	24	80	13	43	5	17

3. Efecto del tiempo de conservación de las cepas sobre la actividad enzimática

La descripción de los resultados del apartado 3 y 4 se realizaron a las 72 horas de incubación (y 78 horas sólo para el caso de la actividad esterásica). Se consideró producción de actividad enzimática cuando el índice Pz fue < 1 .

a) Actividad proteolítica

En la primera medición temporal, se observó que el 90% y 87% de los aislamientos presentó actividad proteolítica con los métodos de Castellani y congelación, respectivamente. En el 2º y 4º mes este porcentaje disminuyó respecto al inicio del ensayo, con ambos métodos. No obstante, a los 12 meses, se obtuvo un aumento del 95% y 100%, respectivamente (Figura 2).

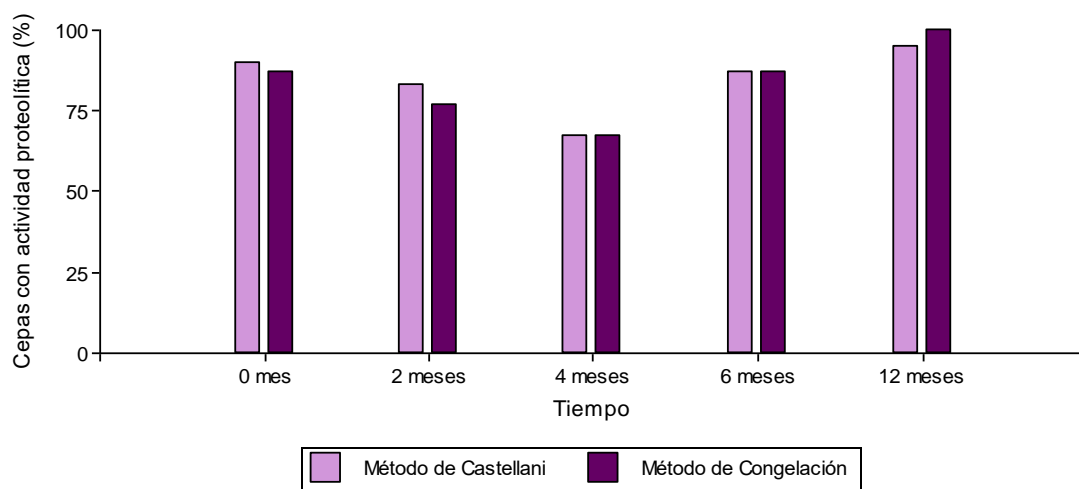


Figura 2. Porcentaje de cepas viables de *C. albicans* con actividad proteolítica a través del tiempo de conservación con los métodos de Castellani y congelación, a las 72 horas de incubación.

b) Actividad fosfolipasa

Entre el 90% y 100% de las cepas presentó actividad fosfolipasa, con ambos métodos de conservación y a lo largo de todo el ensayo (Figura 3).

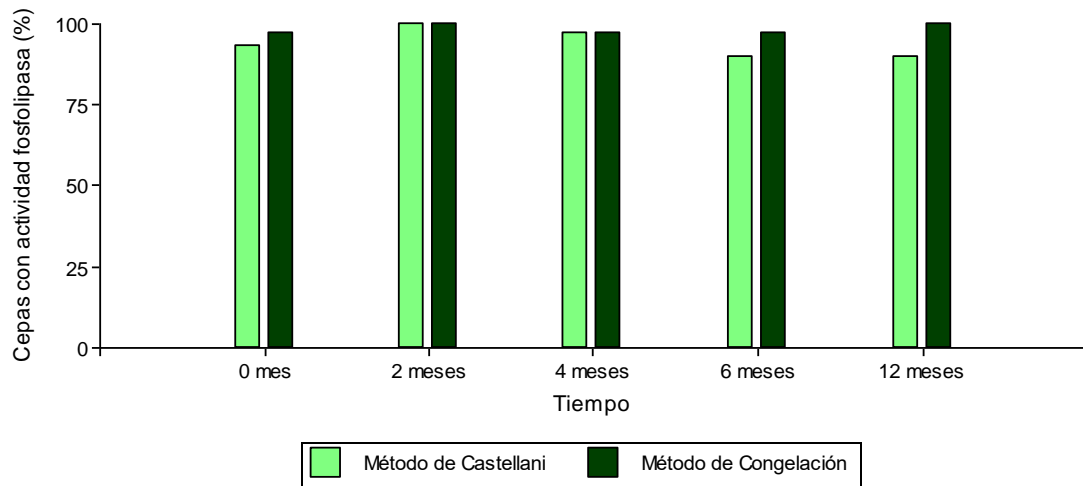


Figura 3. Porcentaje de cepas viables de *C. albicans* con actividad fosfolipasa a través del tiempo de conservación con los métodos de Castellani y congelación, a las 72 horas de incubación.

c) Actividad esterásica

En la primera medición temporal, a las 72 horas de incubación, el 70% y 73% de las cepas presentó actividad esterásica, con los métodos de Castellani y congelación, respectivamente. A las 78 horas se produjo un aumento de estos porcentajes siendo del 85% y 95% respectivamente. A los 12 meses de conservación de las cepas, estos porcentajes disminuyeron respecto al inicio del ensayo, siendo a las 72 horas de incubación del 50% y 57% y a las 78 horas del 60% y 83% respectivamente (Figura 4).

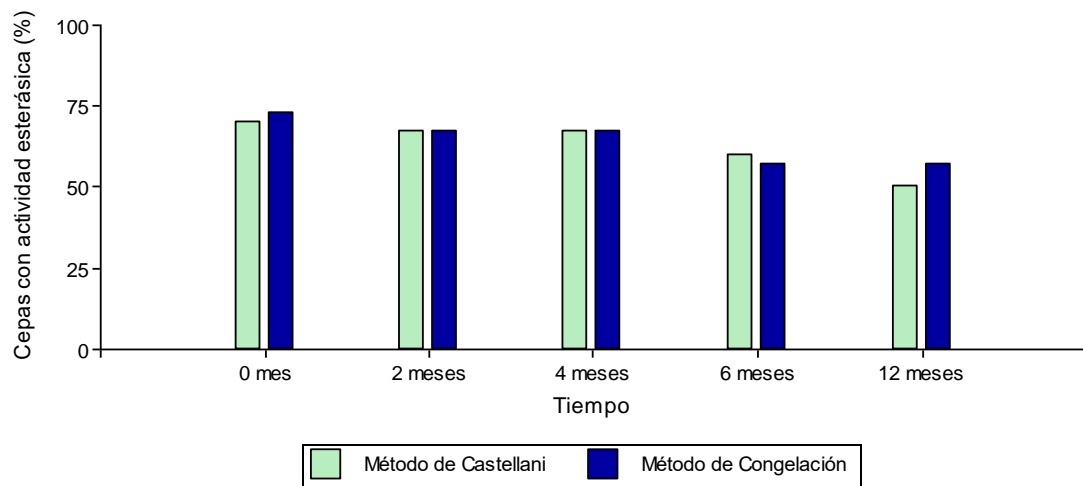


Figura 4. Porcentaje de cepas viables de *C. albicans* con actividad esterásica a través del tiempo de conservación con los métodos de Castellani y congelación, a las 72 horas de incubación.

4. Variación cuantitativa del índice Pz con el tiempo de conservación por ambos métodos

a) Actividad proteolítica

Se observó que para el mes 0 de conservación con los métodos de Castellani y congelación, el valor del índice Pz promedio fue de 0,63 y 0,64 respectivamente indicando una actividad proteolítica baja en ambos casos. A lo largo de todo el experimento, se observó que la actividad aumentó, a excepción del 4^o mes que presentó valores de índice Pz similares al inicio del ensayo. Así, a los 12 meses, el índice Pz promedio fue de 0,42 y 0,38 con Castellani y congelación, indicando una actividad media y alta, respectivamente (Figura 5 y Anexo 6).

A pesar de las mínimas diferencias observadas entre ambos métodos, la prueba de Kruskal Wallis indicó que no son estadísticamente significativas, pero sí entre tiempos de conservación; mostrando que el 0 y 4^o mes son los que presentaron menor actividad proteolítica y difieren del resto del ensayo ($p < 0,0001$) (Anexo 7).

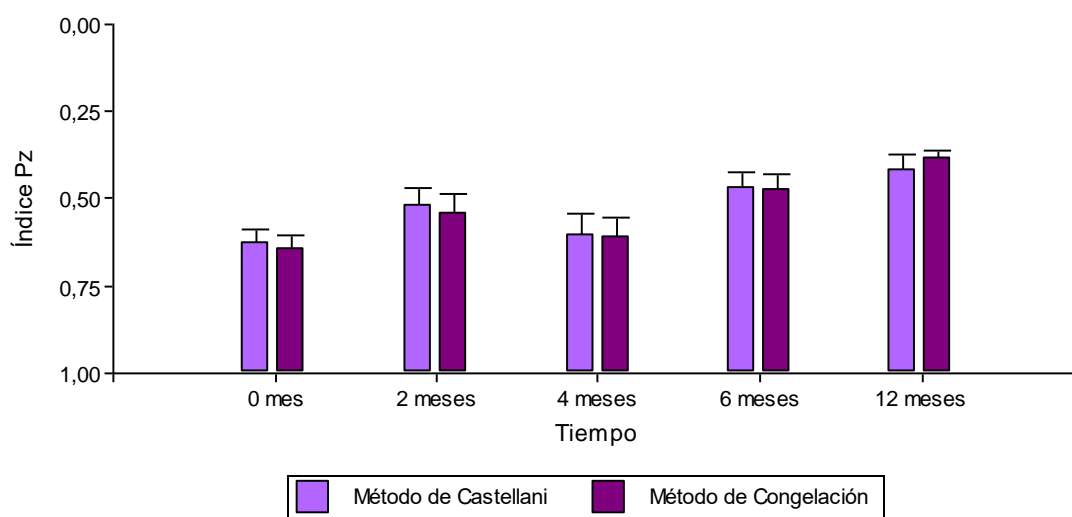


Figura 5. Índice Pz de cepas viables de *C. albicans* con actividad proteolítica a través del tiempo de conservación con los métodos de Castellani y congelación a las 72 horas de incubación. Las barras indican el valor promedio más el error estándar.

b) Actividad fosfolipasa

Se observó que, en la primera medición temporal, con los métodos de Castellani y congelación, el índice Pz promedio fue de 0,54 y 0,50 respectivamente, indicando una actividad fosfolipasa media en ambos casos. Estos valores se mantuvieron similares hasta el 4º mes. A partir del 6º mes la actividad fosfolipasa disminuyó hasta alcanzar a los 12 meses un índice Pz promedio de 0,78 y 0,74 con Castellani y congelación, respectivamente (actividad baja) (Figura 6 y Anexo 6).

Las diferencias entre los tiempos de conservación fueron determinadas por el análisis de Kruskal Wallis ($p < 0,0001$); mientras que entre ambos métodos no se encontraron diferencias significativas (Anexo 7).

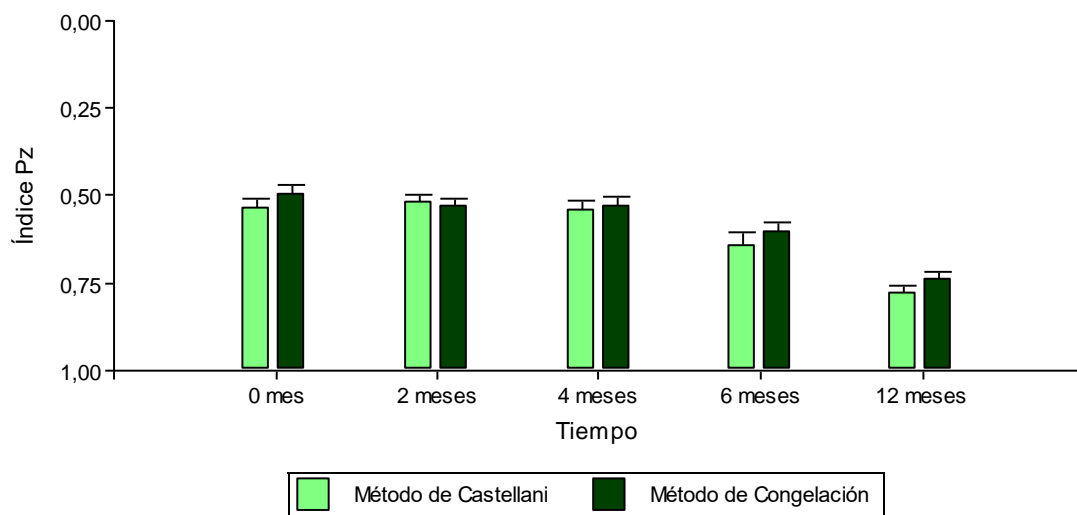


Figura 6. Índice Pz de cepas viables de *C. albicans* con actividad fosfolipasa a través del tiempo de conservación con los métodos de Castellani y congelación a las 72 horas de incubación. Las barras indican el valor promedio más el error estándar.

c) Actividad esterásica

A las 78 horas de incubación de las cepas, se observó que al mes 0 de conservación con los métodos de Castellani y congelación, el valor del índice Pz promedio fue de 0,62 (actividad baja) y 0,57 (actividad media) respectivamente. A los 12 meses, el valor del índice Pz promedio de 0,75 y 0,64 respectivamente, indicando una actividad baja (Figura 7 y Anexo 6).

A pesar de observarse una leve disminución, la actividad esterásica se mantuvo constante durante todo el ensayo con ambos métodos de conservación, ya que la prueba de Kruskal Wallis no determinó diferencias estadísticamente significativas ($p=0,3286$) (Anexo 7).

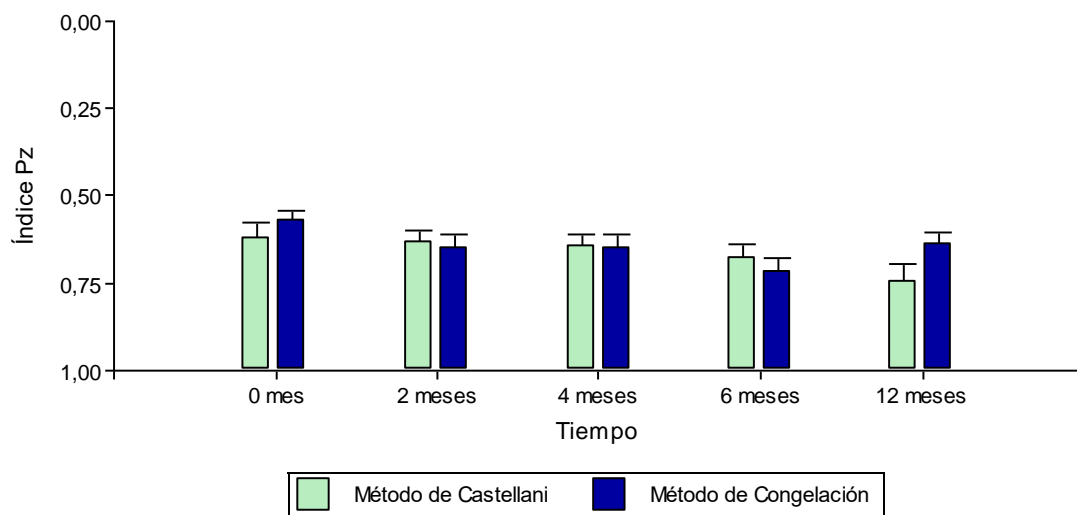


Figura 7. Índice Pz de cepas viables de *C. albicans* con actividad esterásica a través del tiempo de conservación por los métodos de Castellani y congelación a las 78 horas de incubación. Las barras indican el valor promedio más el error estándar.

d) Comparación entre las actividades enzimáticas

En las figuras 8 y 9 se sintetiza la evolución de las tres actividades enzimáticas a lo largo de todo el experimento con el método de Castellani y congelación, respectivamente.

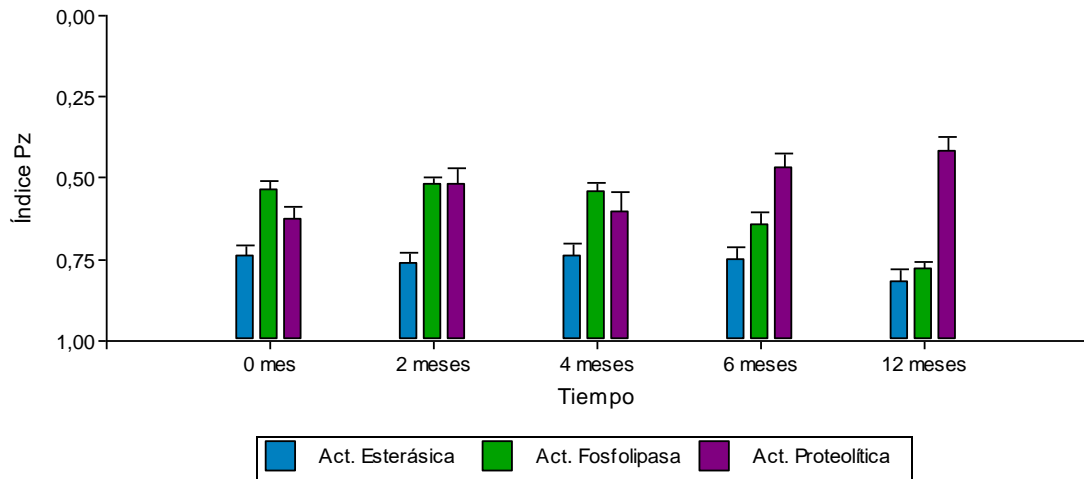


Figura 8. Actividades enzimáticas de cepas de *C. albicans* a través del tiempo de conservación con el método de Castellani a las 72 horas de incubación. Las barras indican el valor del índice Pz promedio más el error estándar.

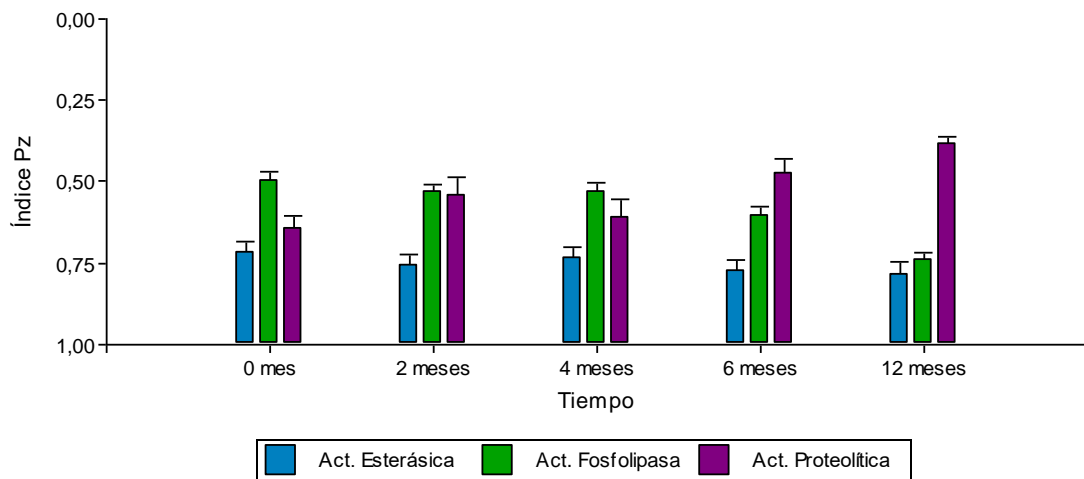


Figura 9. Actividades enzimáticas de cepas de *C. albicans* a través del tiempo de conservación con el método de congelación a las 72 horas de incubación. Las barras indican el valor del índice Pz promedio más el error estándar.

DISCUSIÓN

1. Viabilidad de las cepas de *C. albicans*

Al analizar el porcentaje de supervivencia de las cepas de *C. albicans* conservadas durante un año con el método de Castellani, la viabilidad que se obtuvo fue del 66,67%, cifra inferior a la encontrada por otros autores como Panizo y col. (2005) quienes evaluaron 52 cepas de *C. albicans* y reportaron la supervivencia del 100% después de 2 a 48 años de conservación (38). También, Martínez y col. (2009) lograron mantener viables el 100% de 8 cepas de *C. utilis* durante tres años (52). Así mismo, Fernández Andreu y col. (2013) informaron que la supervivencia de 35 cepas de *Candida* spp preservadas durante 15 a 20 años, fue del 91,4% (40).

Por otro lado, al evaluar el porcentaje de viabilidad con el método de congelación, se pudo comprobar la eficacia de este método comparado con el primero. Como se aprecia en la Figura 1, de las 30 cepas de *C. albicans* evaluadas se recuperó el 100% al año de conservación. Resultados similares fueron obtenidos por García-Martínez y col. (2018) quienes trabajaron con 212 cepas de *C. albicans* durante 42 meses de conservación a -80°C (71).

En este trabajo, cabe aclarar que hasta el sexto mes de conservación con el método de Castellani, la supervivencia de las cepas de *C. albicans* se mantuvo en 100%. Rodrigues y col. (1992) señalan que a partir de este tiempo de conservación podría haber una reducción del volumen inicial de agua destilada con la consiguiente posible pérdida de viabilidad (72).

Mendoza y col. (2005) recomiendan utilizar tubos con tapa sellada con parafilm y realizar una revisión semestral con reposición de agua estéril en caso de evaporación durante todo el período de almacenamiento de las cepas (73). También, Fernández-Andreu y col. (2013) informaron que el cierre deficiente de los tubos de vidrio con tapas a rosca empleados para la conservación de cepas microbianas podría contribuir a la disminución de volumen de líquido por evaporación (40).

Entre los diversos factores que pudieron haber afectado la viabilidad de las cepas de *C. albicans*, se pueden mencionar la edad del cultivo, los diferentes criotubos empleados, la falta de hermeticidad de las tapas de los tubos Eppendorf, el tiempo que fueron preservadas cada una de las cepas, las diferentes temperaturas de conservación tanto para el método de Castellani (20°C o 4°C) como para el de congelación (-20°C, -80°C y -196°C) y el agente crioprotector utilizado en este último método.

Al comparar los métodos de Castellani y congelación en lo que respecta a la practicidad de la técnica empleada, se pudo observar que ambos fueron sencillos, económicos, poco laboriosos y requirieron poco espacio para el almacenamiento de las cepas (38,40,41,47,52).

2. Influencia del tiempo de lectura sobre la determinación de la actividad enzimática

El primer tiempo de conservación (dos semanas) de las 30 cepas de *C. albicans*, fue considerado como el tiempo cero; por lo que la medición de la actividad fosfolipasa, proteolítica y esterásica en esa primera medición, fue la que se comparó con la de otros trabajos.

a) Actividad proteolítica

Con respecto a la actividad proteolítica, se pudo observar que fue la más precoz, de las tres actividades, en expresarse. A las 24 horas de incubación, el mayor porcentaje de las cepas presentó actividad proteolítica media; esto se mantuvo similar a lo largo de las 48 y 72 horas, con ambos métodos de conservación.

Por el contrario, en un estudio publicado por Galán-Ladero y col. (2010) quienes trabajaron con 29 cepas de *C. tropicalis*, se demostró que el mayor porcentaje de las cepas presentó actividad proteolítica muy baja luego de 24 horas que se incrementó con la incubación, de tal manera que el 50% de las cepas presentó actividad proteolítica intermedia, a las 72 horas de incubación (55).

b) Actividad fosfolipasa

Con referencia a la actividad fosfolipasa, la mayor proporción de las cepas presentó actividad enzimática nula a las 24 horas, baja a las 48 horas y media a las 72 horas de incubación, demostrando un aumento de la actividad fosfolipasa con un mayor tiempo de incubación, con ambos métodos de conservación.

Resultados similares fueron obtenidos por Echeverría y col. (2002), quienes estudiaron 41 cepas de *C. albicans* y observaron a las 24 horas de incubación, actividad enzimática nula en todas las cepas. A las 48 y 72 horas, se comprobó actividad en 19 y 34 cepas, respectivamente (74).

Sin embargo, en el estudio de Galán-Ladero y col. (2010), a las 24 horas de incubación se observó que el 72% de las cepas presentó actividad fosfolipasa, y que este porcentaje disminuyó dramáticamente tras las horas de incubación (55).

c) Actividad esterásica

Con respecto a la actividad esterásica, en la lectura de las 24 y 48 horas de incubación, el mayor porcentaje de las cepas presentó actividad enzimática nula. A las 72 y 78 horas, la actividad fue baja y media, respectivamente, demostrando un aumento de la actividad esterásica con un mayor tiempo de incubación, con ambos métodos de conservación.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron similares a los reportados por el estudio de Galán-Ladero y col. (2010), quienes observaron que el 65,5% de las cepas presentó actividad baja a las 24 horas y que este porcentaje se incrementó con la incubación, de tal manera que un 75% de las cepas presentó actividad esterásica intermedia, a las 72 horas de incubación (55).

3. Actividad enzimática porcentual

El porcentaje de actividad fosfolipasa, proteolítica y esterásica en el tiempo cero fue comparado con el de otros trabajos en los que también se estudiaron cepas de *C. albicans*.

a) Actividad proteolítica

Con respecto a la producción de proteinasas, se observó que más del 85% de los aislamientos de *C. albicans* presentó actividad enzimática, con ambos métodos de conservación. Resultados similares fueron reportados por Gokce y col. (2007) y Carrillo-Dover y col. (2009) (17,75). En los trabajos de Penha y col. (2000), Panizo y col. (2005) y Ramos y col. (2015) informaron actividad proteolítica en la totalidad de las cepas (54,56,76) mientras que Basu y col. (2003) observaron actividad sólo en el 66,6% de las cepas que analizaron (5).

a) Actividad fosfolipasa

Con referencia a la actividad fosfolipasa, se obtuvo que más del 90% de las cepas de *C. albicans* presentó actividad fosfolipasa, con ambos métodos de conservación. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Pakshir y col. (2013) (66). En los estudios de Panizo y col. (2005), Carrillo-Dover y col. (2009), Zarei Mahmoudabadi y col. (2010) y Ramos y col. (2015) fueron reportados actividad en la totalidad de las cepas estudiadas (9,17,54,56).

Por otro lado, numerosas publicaciones han informado un menor porcentaje de cepas de *C. albicans* con actividad fosfolipasa al hallado en este trabajo: Penha y col. (2000) 83,3% (76); Echeverría y col. (2002) 78% (74); Gokce y col. (2007) 60,3% (75); Basu y col. (2003) 48,7% (5).

b) Actividad esterásica

Con respecto a la producción de esterases, a las 72 y 78 horas de incubación, más del 70% y 85% de las cepas de *C. albicans* presentó actividad enzimática, respectivamente, con ambos métodos de conservación. Estos resultados, fueron similares a los reportados por Girish Kumar y col. (2006), quienes informaron el 75% de cepas con actividad luego de 72 horas, mientras que el 92,3% lo hizo luego de 96 horas de incubación (67). Así también, Pakshir y col. (2013) obtuvieron el 87,5% de cepas con actividad (66) mientras que Slifkin (2000) obtuvo el 100% con actividad enzimática, luego de 72 horas de incubación (64).

Resultados inferiores de actividad esterásica fueron reportados por Noori y col. (2017) quienes observaron actividad en el 68,2% de las cepas que estudiaron, luego de 10 días de incubación (24). De igual manera, Aktas y col. (2002) reportaron un 58% de cepas con actividad a las 72 horas y un 98% luego de 10 días de incubación (65).

Es importante considerar que las discrepancias obtenidas en los resultados de las distintas actividades enzimáticas en esta tesis, respecto a lo reportado en otras bibliografías, probablemente pueda deberse a que se evalúen en ciertos casos otras especies o bien por las variaciones intra-especie de las levaduras aisladas en cada muestra, por el sitio de aislamiento y la cantidad de cepas analizadas. Además, entre otros factores, se encuentran el medio de cultivo utilizado para determinar cada actividad enzimática, el área geográfica de estudio y las condiciones inmunes del huésped (22,24,54).

4. Variación de la actividad enzimática con el tiempo de conservación por ambos métodos

Se observó que la evolución de las tres actividades enzimáticas fue diferente a lo largo del tiempo: mientras que la actividad esterásica mostró menor actividad enzimática que se mantuvo constante durante los 12 meses, la actividad fosfolipasa en la primera medición temporal, presentó mayor actividad enzimática que disminuyó con el transcurrir del tiempo. En tanto que, la actividad proteolítica tuvo un comportamiento opuesto a la fosfolipasa, incrementando su actividad al final del ensayo, con ambos métodos de conservación. Además, análisis estadísticos complementarios indicaron que la evolución de las tres actividades enzimáticas no difirió al comparar la procedencia de la muestra clínica (orina o flujo vaginal) (Anexo 8).

En la bibliografía, no se han encontrado reportes acerca del efecto del tiempo de preservación empleando los métodos de Castellani y congelación sobre la actividad enzimática de las cepas de *C. albicans*. Sin embargo, el aumento de la actividad proteolítica, como indican los resultados de esta tesis, se podría explicar por diversas razones.

El medio de cultivo utilizado para medir actividad proteolítica, fue elaborado de forma manual y a pesar de haber sido estrictamente controlado, fue preparado reiteradas veces a lo largo de todo un año. Esto indicaría que tanto el pH como la temperatura del agar (a la cual se colocó la solución de albúmina sérica bovina), podrían haber sufrido mínimas variaciones que pudieron provocar cambios en el crecimiento y en la actividad proteolítica de las cepas ensayadas. Dostál y col. (2003) proponen que, para facilitar la detección de estos cambios de pH, se podría colocar un indicador ácido-base en el medio de cultivo (77). Asimismo, Hube y Naglik (2001) aclaran que la demostración *in vitro* de las distintas proteinasas Saps debe ser un proceso altamente regulado y rigurosamente controlado (19).

Está demostrado que durante las candidiasis orales y vaginales hay producción de proteinasas Saps 1-8 por parte de *C. albicans* y que la expresión de Sap 8, *in vitro*, está regulada por la temperatura (11,18,30). En otros estudios realizados por Monod y col. (1998) y De Bernadis y col. (2001) se demostró que Sap 8 se expresó con niveles menores a 37°C que a 25°C (10,78). Esto podría explicar el aumento de la actividad proteolítica de las cepas de *C. albicans* luego de ser conservadas a 4°C y a -18°C durante todo el experimento.

Además, debe tenerse en cuenta que, durante el proceso de congelación, se producen fenómenos fisicoquímicos que afectan, en distinto grado, al microorganismo que se desea conservar (49). El estrés al cual se ven sometidas las cepas de *C. albicans*, independientemente del método de preservación utilizado, podría afectar la producción enzimática a lo largo del tiempo.

CONCLUSIONES

Los aportes de esta tesis contribuyen con información útil en cuanto al efecto que podrían tener las técnicas de Castellani y congelación sobre la actividad enzimática de cepas de *C. albicans* que podrían emplearse como referencia en investigación, para estudiar virulencia, diseñar estrategias de control y prevención de las candidiasis, y para desarrollar nuevos agentes terapéuticos con estos factores de patogenicidad como posibles blancos de acción.

El estudio de las actividades enzimáticas a las 24, 48 y 72 horas de incubación, demostró que, para evidenciar la actividad fosfolipasa y esterásica de cepas de *C. albicans*, se deben dejar incubar no menos de 72 horas. En el caso de la actividad proteolítica, al ser la más precoz en expresarse y los índices Pz mantenerse estables a lo largo del tiempo de incubación, los resultados podrían ser concluyentes a las 24 horas.

Al comparar los métodos de Castellani y congelación, se pudo observar que ambos fueron sencillos, económicos, poco laboriosos y requirieron poco espacio para el almacenamiento de las cepas. Además, los resultados sugieren que pueden ser utilizados indistintamente para medir actividad enzimática a lo largo del tiempo de conservación. Sin embargo, el de congelación resultó ser más eficaz en lo que respecta a la viabilidad, esto demuestra la importancia de utilizar más de una técnica y trabajar con réplicas del microorganismo que se desea conservar como medida de seguridad.

A partir de los resultados obtenidos en esta experiencia, se puede concluir que ambos métodos fueron útiles para mantener estable la actividad esterásica durante un año y fosfolipasa hasta el 4º mes, a partir del cual se vio reducida su actividad. En relación a la actividad proteolítica, debido a que aumentó a lo largo del tiempo, surge la necesidad de estudiar en profundidad esta respuesta, ajustando la técnica

implementada y comparar los resultados utilizando otros medios de cultivos con la complementación de estudios moleculares.

Es importante continuar con las investigaciones que trabajen acerca de la actividad de proteasas, fosfolipasas, estererasas, hemolisinas y coagulasas así como de otros factores de virulencia, como son: la adherencia, el cambio fenotípico, la morfología celular y la producción de biopelículas de *C. albicans* y de otros microorganismos, para determinar su estabilidad a lo largo del tiempo de conservación por distintos métodos e identificar hasta qué momento se pueden preservar las cepas aisladas para garantizar la reproducibilidad de las investigaciones.

A pesar de que *C. albicans* ha sido ampliamente estudiada, tanto en su acción oportunista como en los factores de virulencia; las investigaciones se limitan a los análisis de estos factores en cepas frescas, sin considerar ningún método de preservación. Por este motivo, los resultados aportados en esta tesis contribuyen con las primeras estimaciones sobre el efecto del tiempo de conservación empleando los métodos de Castellani y de congelación sobre la actividad enzimática de cepas de *C. albicans*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Giusiano G, Piontelli E. Levaduras oportunistas comunes. Hongos oportunistas levaduriformes y filamentosos comunes en clínica. 1ra ed. Argentina; 2016. p. 1–10.
2. Salas I, García J, Miranda K. Factores de virulencia en cepas *Candida albicans*. Rev Costarric Cienc Med. 2000; 21(1–2):43–9.
3. Mata de Henning M, Perrone M. Factores determinantes de patogenicidad en relación a la ecología de *Candida albicans* en cavidad bucal. Acta Odontológica Venez. 2001; 39(2):55–60.
4. Pardi G. Determinantes de Patogenicidad de *Candida albicans*. Acta Odontológica Venez. 2002; 40(2):185–92.
5. Basu S, Gughani HC, Joshi S, Gupta N. Distribution of *Candida* species in different clinical sources in Delhi, India, and proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* isolates. Rev Iberoam Micol. 2003; 20:137–40.
6. Arenas R. Micosis oportunistas. Candidosis. In: Javier de León Fraga, editor. Micología Médica Ilustrada. Ed. Mc Gra. Mexico 5th; 2014. p. 240–59.
7. Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. Int J Microbiol. 2014; 1–6.
8. Pawar PR, Pawar VA, Aute RA. Comparative study on hydrolytic enzymes produced by different morphological forms of *Candida albicans*. Int J Curr Pharm Res. 2014; 6(4):66–8.
9. Zarei Mahmoudabadi A, Zarrin M, Miry S. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from vagina and urine samples. Jundishapur J Microbiol. 2010; 3(4):169–73.

10. De Bernardis F, Sullivan PA, Cassone A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med Mycol Mycol*. 2001; 39:303–13.
11. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes Naglik LL, Greenspan D, et al. Differential Expression of *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase and Phospholipase B Genes in Humans Correlates with Active Oral and Vaginal Infections. *J Infect Dis*. 2003; 188:469–79.
12. Galván B, Mariscal F. Epidemiología de la candidemia en UCI. *Rev Iberoam Micol*. 2006; 23:12–5.
13. Bonifaz Trujillo JA. Micosis por hongos oportunistas. Candidosis. In: Javier de León Fraga, editor. *Micología Médica Básica*. Ed. Mc Gra. México 4th; 2012. p. 321–47.
14. Panizo MM, Reviákina V. *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Rev la Soc Venez Microbiol*. 2001; 21(2):38–45.
15. Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli FJ, del Castillo M. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013; 31(6):380–4.
16. Pemán J, Salavert M. Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013; 31(5):328–41.
17. Carrillo-Dover P, Alvarez-Vega C, Salas-Campos I, Mora-Brenes N. Aislamiento de *Candida* spp. y otras levaduras en el personal que labora en áreas críticas del Hospital San Juan de Dios. *Acta Med Costarric*. 2009; 51(3):165–71.
18. Castrillón Rivera LE, Palma Ramos A, Padilla Desgarenes C. Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermatología Rev Mex*. 2005; 49(1):12–27.
19. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene

- family. Microbiology. 2001; 147:1997–2005.
20. Ombrella AM, Racca L, Ramos L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. Rev Iberoamericana Micol. 2008; 25:12–6.
 21. Antony G, Saralaya V, Bhat KG, Shenoy MS, Shivananda PG. Effect of phenotypic switching on expression of virulence factors by *Candida albicans* causing candidiasis in diabetic patients. Rev Iberoam Micol. 2009; 26(3):202–5.
 22. Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F, Rojas-Herrera RA. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. Rev Iberoam Micol. 2014; 31(2):137–40.
 23. Staniszewska M, Bondaryk M, Siennicka K, Piłat J, Schaller M, Kurzątkowski W. Role of aspartic proteinases in *Candida albicans* virulence. Part I. Substrate specificity of aspartic proteinases and *Candida albicans* pathogenesis. Postępy Mikrobiol. 2012; 51(2):127–35.
 24. Noori M, Dakhili M, Sepahvand A, Davari N. Evaluation of esterase and hemolysin activities of different *Candida* species isolated from vulvovaginitis cases in Lorestan Province, Iran. Curr Med Mycol. 2017; 3(4):1–5.
 25. Sturtevant J, Calderone R. *Candida albicans* adhesins: Biochemical aspects and virulence. Rev Iberoam Micol. 1997; 14:90–7.
 26. De la Calle-Rodríguez N, Santa-Vélez C, Cardona-Castro N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. CES Med. 2012; 26(1):43–55.
 27. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013; 4(2):119–28.

28. Jackson BE, Wilhelmus KR, Hube B. The Role of Secreted Aspartyl Proteinases in *Candida albicans* Keratitis. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48(8):3559–65.
29. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. 2003; 67(3):400–28.
30. Staniszewska M, Bondaryk M, Siennicka K, Piłat J, Schaller M, Kurzątkowski W. Role of aspartic proteinases in *Candida albicans* virulence. Part II: Expression of Sap1-10 aspartic proteinase during *Candida albicans* infections in vivo. *Postępy Mikrobiol.* 2012; 51(2):137–42.
31. Staib F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia.* 1966; 4(3):187–93.
32. Rüchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982; 20(3):233–44.
33. Cassone A, De Bernardis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi L. Evidence for a Correlation Between Proteinase Secretion and Vulvovaginal Candidosis. *J Infect Dis.* 1987; 156(5):777–83.
34. Tsang CSP, Chu FCS, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol.* 2007; 56:1393–8.
35. Ghannoum MA. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(1):122–43.
36. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982; 20:7–14.
37. Rico M, Piattoni C, González C, Monela R, Latorre M, Lurá MC. Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. *Rev FABICIB.* 2004;

- 8:163–72.
38. 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.
 39. Arencibia Arrebola DF, Rosario Fernández LA, Gámez Menéndez R. Métodos generales de conservación de microorganismos. In: I Taller Científico de los Laboratorios LIORAD, VI Taller de Colecciones de Cultivos Microbianos y otros Materiales Biológicos. Finlay Edi. 2008. p. 1–14.
 40. Fernández Andreu CM, Díaz Suárez LA, Illnait Zaragoza MT, Aragonés López C, Martínez Machín G, Perurena Lancha MR, et al. Conservación de cultivos de hongos de importancia médica en agua destilada. *Rev Cubana Med Trop.* 2013; 65(3):361–9.
 41. Pérez C, Mata-Essayag S, Hartung de Capriles C, Roselló A, Colella MT, Olaizola C, et al. Mantenimiento de *Cryptococcus* sp. con el método de Castellani. *Rev la Soc Venez Microbiol.* 2003; 23(2):153–7.
 42. Garcia López MD, Uruburu Fernández F. La conservación de cepas microbianas. *Actual SEM.* 2000; 30:12–6.
 43. Ladino Rey OE, David Rubio J, Chacin Zambrano CA. Evaluación de dos métodos de conservación de hongos filamentosos patógenos de palma de aceite. *Cent Agrícola.* 2016; 43(2):36–41.
 44. Pinzón Gutiérrez YA, Bustamante SL, Buitrago G. Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). *Rev Colomb Biotecnol.* 2009; 11(2):8–18.
 45. Boiso I. Principios básicos de Criobiología. *Rev Iberoam Fertil.* 2001; 18(4):20–2.

46. Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, et al. Fundamentos de criopreservación. Rev Colomb Obstet Ginecol. 2006; 57(4):291–300.
47. Bayona MA. Conservación y Mantenimiento de Cepas Microbianas con fines docentes e investigativos. Lab Actual. 2003; 20(36):35–9.
48. Fernández Andreu MC, Martínez Machín G, Perurena MR, Illnait Zaragoza MT, Valdés Hernández I. La colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”: funciones y retos. Rev Cuba Med Trop. 2005; 57(3):1–7.
49. Belmonte A, Noguerras MG, Contigiani MB, Gandini V, Sutich EG. Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*. Rev Bioquímica y Patol Clínica. 2008; 72(2):15–8.
50. Fernández Andreu CM, Díaz Suárez LA, Illnait Zaragoza MT, Aragonés López C, Martínez Machín G, Perurena Lancha MR. Conservación de cultivos fúngicos de alto riesgo de *Histoplasma* y *Cryptococcus*. Rev Cuba Med Trop. 2012; 64(1):49–54.
51. Hartung de Capriles C, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. Mycopathologia. 1989; 106:73–9.
52. Martínez A, León M, González G. Conservación de cepas de *Candida utilis* en agua destilada estéril. Inst Cuba Investig los Deriv la Caña Azúcar ICIDCA. 2009; 43(2):47–50.
53. Sosa López AI, Pazos Álvarez-Rivera V, Borges Marín G, González Garcia M, Ponce Grijuela E. Evaluación del método de conservación en papel de filtro en dos cepas de *Bacillus subtilis* cohn, mediante la actividad antagónica frente a *Rhizoctonia solani* kühn. Fitosanidad. 2011; 15(1):45–9.

54. Panizo MM, Reviákina V, Flores Y, Montes W, González G. Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislados clínicos de *Candida* spp. Rev la Soc Venez Microbiol. 2005; 25(2):64–71.
55. Galan-Ladero MA, Blanco MT, Sacristan B, Fernandez-Calderon MC, Pérez-Giraldo C, Gomez-Garcia AC. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. Med Mycol. 2010; 48:207–10.
56. Ramos L de S, Bardebo LS, Braga Silva LA, dos Santos AL, Pinto MR, Sgarbi DB. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. Rev Iberoam Micol. 2015; 32(2):122–5.
57. Martínez E, Eslava García J, Gaitán Calvo M, López Carrasco R, Gómez Padilla F, Cabuto López Z, et al. Candidiasis cutánea: utilidad del CHROMagar *Candida* en la identificación de especies. Dermatología Rev Mex. 2008; 52(3):121–6.
58. Relloso MS, Nievas J, Fares Taie S, Farquharson V, Mujica MT, Romano V, et al. Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. Rev Argent Microbiol. 2015; 47(2):103–7.
59. Zboromyrska Y. Aplicaciones del Maldi-tof en el laboratorio de microbiología. Educ Contin en el Lab Clínico. 2014; 20:87–98.
60. Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. Rev Iberoam Micol. 1998; 15:166–8.
61. Guelfand L, Cataldi S, Arechavala A, Perrone M. Manual práctico de micología Médica. Acta Bioq Clin Latinoam. 2015; Supl, 1.
62. Polak A. Virulence of *Candida albicans* mutants. Mycoses. 1992; 35:9–16.
63. Rudek W. Esterase Activity in *Candida* Species. J Clin Microbiol. 1978; 8(6):756–9.

64. Slifkin M. Tween 80 Opacity Test Responses of Various *Candida* Species. J Clin Microbiol. 2000; 38(12):4626–8.
65. Aktas E, Yigit N, Ayyildiz A. Esterase Activity in Various *Candida* Species. J Int Med Res. 2002; 30:322–4.
66. Pakshir K, Zomorodian K, Karamitalab M, Jafari M, Taraz H, Ebrahimi H. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. J Mycol Med. 2013; 23(2):113–8.
67. Girish Kumar C, Menon T, Sundararajan T, Nalini S, Thirunarayan M, Rajasekaran S, et al. Esterase activity of *Candida* species isolated from immunocompromised hosts. Rev Iberoam Micol. 2006; 23:101–3.
68. Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. Sabouraudia. 1983; 22(3):201–7.
69. Vidotto V, Pontón J, Aoki S, Quindós G, Mantoan B, Pugliese A, et al. Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. Rev Iberoamericana Micol. 2004; 21:70–4.
70. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina; 2018.
71. García-Martínez J, López Lacomba D, Castaño Pascual A. Evaluation of a Method for Long-Term Cryopreservation of Fungal Strains. Biopreserv Biobank. 2018; 16(2):128–37.
72. Rodrigues E, Lírio V, Lacaz C. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. Rev Inst Med Trop. 1992; 34(2):159–65.
73. Mendoza M, Alvarado P, Díaz de Torres E, Lucena L, de Alvornoz M. Comportamiento fisiológico y de sensibilidad in vitro de aislamientos de

- Sporothrix schenckii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación. Rev Iberoam Micol. 2005; 22:151–6.
74. Echeverría A, Durante AG, Arechavala A, Negroni R. Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. Rev Iberoam Micol. 2002; 19:95–8.
75. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. Mycopathologia. 2007; 164:265–9.
76. Penha SS, Birman EG, Silveira FR, Paula CR. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. Pesq Odon Bras. 2000; 14(2):119–22.
77. Dostál J, Hamal P, Pavlíčková L, Souček M, Ruml T, Pichová I, et al. Simple Method for Screening *Candida* Species Isolates for the Presence of Secreted Proteinases: a Tool for the Prediction of Successful Inhibitory Treatment. J Clin Microbiol. 2003; 41(2):712–6.
78. Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D. Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. Microbiology. 1998; 144:2731–7.
79. Farace MI, Castelli E. Manual de Procedimientos: Diagnóstico de Botulismo en muestras clínicas y de alimentos. In: Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr Carlos G Malbrán.” 2007.

ANEXOS

1. Procedencia de las cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes del Hospital del Carmen

Nº	Muestra	Edad	Sexo	Origen	Diagnóstico/Factor de riesgo
1	Orina	79	Femenino	Internado	Síndrome febril y neumonía intrahospitalaria
2	Flujo vaginal	35	Femenino	Ambulatorio	Embarazo (33 semanas)
3	Flujo vaginal	30	Femenino	Ambulatorio	Embarazo (36 semanas)
4	Flujo vaginal	43	Femenino	Ambulatorio	Vulvovaginitis
5	Espuito	84	Masculino	Internado	Neumonía adquirida en la comunidad
6	Aspirado Traqueal	94	Femenino	Internado	Neumonía adquirida en la comunidad
7	Orina	89	Masculino	Internado	Síndrome febril
8	Orina	21	Femenino	Ambulatorio	Embarazo (12 semanas)
9	Orina	77	Masculino	Internado	Neumonía adquirida en la comunidad y enfermedad pulmonar obstructiva crónica
10	Flujo vaginal	26	Femenino	Ambulatorio	Vulvovaginitis
11	Orina	73	Masculino	Ambulatorio	Infección del tracto urinario
12	Orina	84	Femenino	Internado	Insuficiencia cardíaca
13	Flujo vaginal	34	Femenino	Ambulatorio	Vulvovaginitis
14	Orina	90	Masculino	Ambulatorio	Insuficiencia cardio-respiratoria e infección del tracto urinario
15	Orina	92	Masculino	Internado	Neumonía intrahospitalaria
16	Orina	85	Femenino	Internado	Neumonía adquirida en la comunidad
17	Flujo vaginal	21	Femenino	Ambulatorio	Vulvovaginitis
18	Orina	77	Masculino	Internado	Sepsis
19	Flujo vaginal	18	Femenino	Ambulatorio	Embarazo (34 semanas)
20	Orina	75	Femenino	Internado	Sepsis
21	Orina	67	Masculino	Ambulatorio	Sepsis
22	Flujo vaginal	-	Femenino	Ambulatorio	Embarazo (36 semanas)
23	Orina	71	Femenino	Internado	Accidente cerebro vascular
24	Flujo vaginal	31	Femenino	Ambulatorio	Embarazo (34 semanas)
25	Flujo vaginal	-	Femenino	Ambulatorio	Vulvovaginitis
26	Flujo vaginal	37	Femenino	Ambulatorio	Vulvovaginitis
27	Orina	-	Masculino	Internado	Síndrome febril
28	Orina	82	Femenino	Internado	Neumonía adquirida en la comunidad e insuficiencia renal
29	Orina	64	Masculino	Internado	Shock séptico
30	Flujo vaginal	32	Femenino	Ambulatorio	Trichomoniasis

2. Composición de medios de cultivos para identificación de levaduras

Agar harina de maíz-Tween 80 para observación micromorfológica

El medio agar harina de maíz se elaboró con 40 g de harina de maíz amarilla que se disolvió en 1 litro de agua destilada calentando en baño maría a 60 °C durante 1 hora. Luego, se filtró a través de papel y llevó a volumen final con agua destilada. Posteriormente se agregó 20 g de agar y 10 mL de Tween 80; esto se hirvió para lograr la completa disolución. Por último, la solución se esterilizó mediante autoclavado a 121°C de temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. El medio resultante se dispensó en tubos de ensayo estériles y se dejaron solidificar (61).

CHROMagar™ *Candida* para identificación microbiológica presuntiva

Se utilizó el medio CHROMagar™ *Candida* comercial que contiene 10,2 g de peptona, 22 g de mezcla cromogénica, 0,5 g de cloranfenicol, 15 g de agar y 1000 mL de agua destilada. El pH final es de $6,1 \pm 0,2$. Para la preparación se disolvió 12 g de medio en 252 mL de agua destilada estéril. La mezcla se calentó hasta disolución completa y fue vertida en placas de Petri estériles. El medio no requiere esterilización por autoclave.

Agar glucosado Sabouraud para aislamiento de levaduras y hongos miceliales

Se utilizó el medio Sabouraud comercial (Britania) que contiene 5 g de peptona, 5 g de tripteína, 40 g de glucosa, 0,05 g de cloranfenicol, 15 g de agar y 1000 mL de agua destilada. El pH final es de $5,6 \pm 0,2$. Para la preparación, se disolvió 19,5 g de medio en 300 mL de agua destilada. La mezcla se calentó hasta disolución completa y esterilizó mediante autoclavado a 121°C de temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. El medio resultante se dispensó en tubos de ensayo estériles y se dejó solidificar en posición inclinada (pico de flauta).

3. Composición de medios de cultivos para medir actividad enzimática

Agar albúmina sérica bovina (BSA) para actividad proteolítica

El medio BSA se elaboró con 0,5 g de K₂HPO₄, 0,04 g de MgSO₄·7H₂O, 1 g de NaCl, 0,2 g de extracto de levadura, 4 g de glucosa y 0,5 g de albúmina sérica bovina disueltos en 60 mL de agua destilada estéril. La solución se ajustó a pH 5 y se esterilizó con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro. Posteriormente, se añadió a un matraz que contenía 4 g de agar disueltos en 140 mL de agua destilada esterilizados mediante autoclavado a 121°C de temperatura a 1 atmósfera de presión durante 15 minutos y atemperado a 60°C. El medio resultante se dispensó en placas de Petri y se dejó solidificar (20,69).

Agar Sabouraud yema de huevo (SEA) para actividad fosfolipasa

El medio SEA se elaboró con 65 g de agar glucosado de Sabouraud, 58,45 g de NaCl y 0,0554 g de CaCl₂ disueltos en 1 litro de agua destilada, esterilizándose mediante autoclavado a 121°C de temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. Posteriormente se atemperó a 60°C y se añadió yema de huevo estéril al 8% hasta obtener una suspensión homogénea. El medio resultante se dispensó en placas de Petri y se dejó solidificar (20,21,56,74).

Para extraer yema de huevo de manera aséptica, primero se tuvo que lavar la cáscara del huevo con abundante agua y secar completamente. Luego se desinfectó sumergiéndolo en alcohol durante 20 minutos y se volvió a secar. Después, se rompió la cáscara y se separó la yema de la albúmina. Por último, la yema de huevo se diluyó al 50 % con solución fisiológica estéril (79).

Medio Tween 80 para actividad esterásica

El medio de opacidad del Tween 80 se preparó con 10 g de peptona, 5 g de NaCl, 0,1 g de CaCl₂, 15 g de agar y 5 mL de Tween 80 disueltos en 1 litro de agua

destilada, ajustado a un pH de 6,8. El medio se autoclavó a 121°C de temperatura y a 1 atmósfera de presión durante 15 minutos, luego se dispensó en placas de Petri y se dejó solidificar (55,64–67).

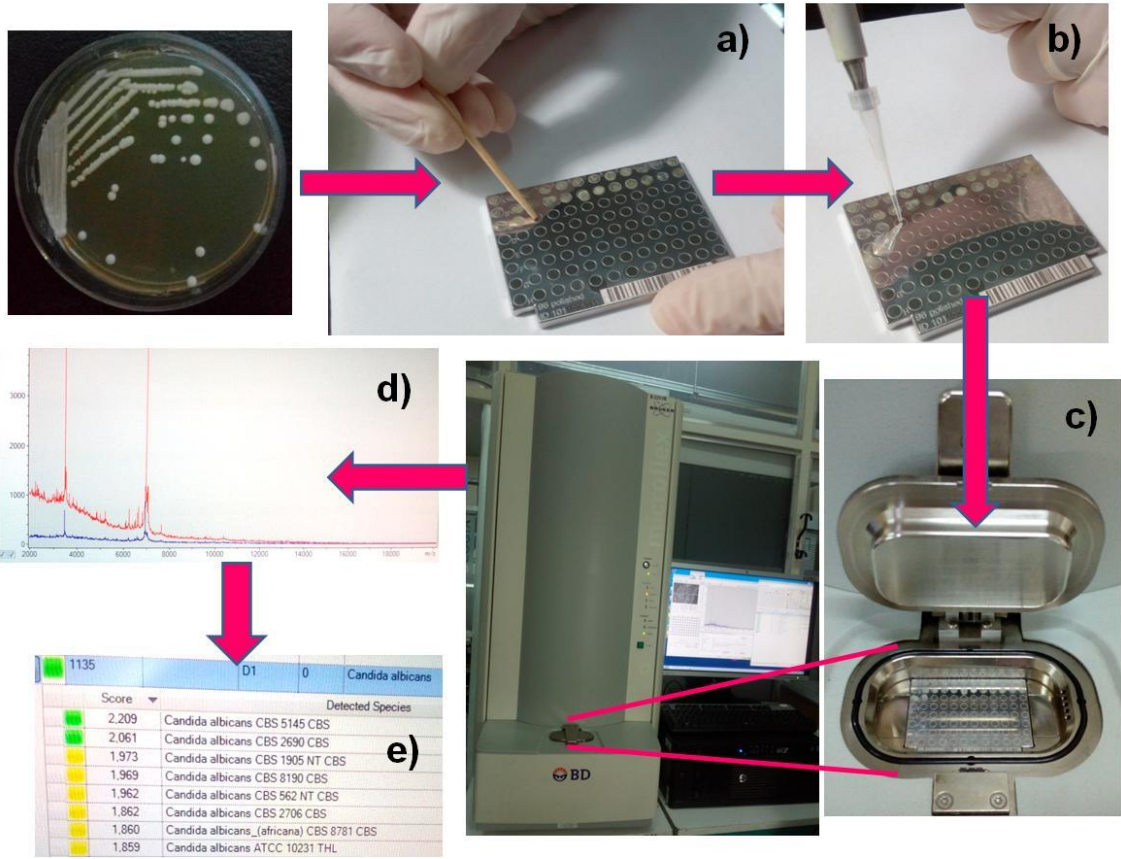
4. Funcionamiento del espectrómetro de masas: MALDI-TOF

Los tres elementos principales que contiene el MALDI-TOF son: la fuente de ionización, el analizador y el detector. La fuente de ionización es un láser ultravioleta con longitud de onda de 337 nm, que produce la desorción e ionización de la muestra con la ayuda de una matriz orgánica (ácido α -ciano-4-hidroxi-trans-cinámico). El papel fundamental de la matriz es absorber y, después, transmitir la energía del láser a la muestra, facilitando su ionización (59).

El segundo elemento es el analizador. Tras la ionización, los iones generados se aceleran mediante la aplicación de un campo eléctrico y pasan por un analizador. El analizador tipo TOF separa los iones procedentes de la muestra en relación con su ratio masa/carga (m/z). El ratio determina el tiempo que tarda un ión en alcanzar el detector (tiempo de vuelo). Como es de esperar los iones más pequeños vuelan más rápido y alcanzan antes el detector, mientras que los de mayor masa tardan más (59).

Finalmente, los iones impactan contra el detector, que recoge toda la información necesaria para generar un espectro de masas de cada compuesto analizado. El tiempo que demora el MALDI-TOF en identificar un microorganismo desde la preparación de la muestra hasta la emisión del resultado es de 5-8 minutos.

Las levaduras, al igual que otras especies fúngicas, poseen una pared celular gruesa, por lo que es importante la preparación previa de la muestra para favorecer la liberación de las proteínas intracelulares. En este caso, se realizó el procedimiento abreviado que consistió en colocar una colonia directamente sobre uno de los pocillos de la placa metálica del MALDI-TOF, luego se cubrió con 1 μ L de ácido fórmico (70 %) y se dejó secar. Por último, se le agregó 1 μ L de matriz y cuando la placa se secó completamente se introdujo en el equipo para su identificación (58) (Esquema anexo 4).



Esquema anexo 4: Proceso de identificación de *C. albicans* a partir de una colonia pura, mediante MALDI-TOF. a) La colonia se deposita en uno de los pocillos de la placa metálica. b) Se cubre con 1 μ L de ácido fórmico y 1 μ L de matriz. c) La placa se introduce en el equipo. d) Espectro de masas. e) Resultado de la identificación junto a un puntaje o score.

5. Planilla de registro de las actividades enzimáticas

Actividad enzimática:

Fecha de ensayo:

Nº de cepa	Tiempo de Conservación	Diámetro de la colonia (mm)						Diámetro de la colonia más Halo de hidrólisis (mm)						Observaciones
		Tiempo de incubación												
		24 hs		48 hs		72 hs		24 hs		48 hs		72 hs		
		H	F	H	F	H	F	H	F	H	F	H	F	

Referencias: H: Conservación en heladera (Método de Castellani)

F: Conservación en freezer (congelación)

6. Estadística descriptiva para la actividad proteolítica, según el método de Castellani a lo largo del tiempo de conservación

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (Método de Castellani)											
Tiempo	Medición (hs)	Nº	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	P(25)	P(75)
0 mes	24	30	0,70	0,27	0,05	39,34	0,3	1,0	0,58	0,44	1,00
0 mes	48	30	0,60	0,22	0,04	35,66	0,2	1,0	0,56	0,45	0,75
0 mes	72	30	0,63	0,21	0,04	34,11	0,2	1,0	0,60	0,45	0,80
2 meses	24	30	0,57	0,28	0,05	48,81	0,3	1,0	0,44	0,38	1,00
2 meses	48	30	0,50	0,27	0,05	55,06	0,2	1,0	0,44	0,27	0,63
2 meses	72	30	0,52	0,27	0,05	52,13	0,2	1,0	0,46	0,29	0,70
4 meses	24	30	0,60	0,29	0,05	49,33	0,3	1,0	0,44	0,36	1,00
4 meses	48	30	0,59	0,32	0,06	53,80	0,2	1,0	0,47	0,31	1,00
4 meses	72	30	0,60	0,31	0,06	51,84	0,2	1,0	0,53	0,35	1,00
6 meses	24	30	0,49	0,25	0,05	51,08	0,3	1,0	0,40	0,32	0,56
6 meses	48	30	0,44	0,25	0,05	56,55	0,2	1,0	0,36	0,27	0,50
6 meses	72	30	0,47	0,25	0,05	52,51	0,2	1,0	0,38	0,33	0,55
12 meses	24	20	0,42	0,19	0,04	44,65	0,2	1,0	0,38	0,27	0,44
12 meses	48	20	0,40	0,19	0,04	47,59	0,2	1,0	0,42	0,25	0,45
12 meses	72	20	0,42	0,20	0,04	47,17	0,2	1,0	0,38	0,28	0,50

Referencias: **Nº:** número de cepas; **D.E.:** desviación estándar; **E.E.:** error estándar; **CV:** coeficiente de variación; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; **P (25):** percentil 25; **P (75):** percentil 75.

6. Estadística descriptiva para la actividad proteolítica, según el método de congelación a lo largo del tiempo de conservación

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (Método de congelación)											
Tiempo	Medición (hs)	Nº	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	P(25)	P(75)
0 mes	24	30	0,70	0,28	0,05	39,56	0,4	1,0	0,65	0,44	1,00
0 mes	48	30	0,61	0,22	0,04	36,70	0,2	1,0	0,56	0,47	0,80
0 mes	72	30	0,64	0,21	0,04	32,65	0,2	1,0	0,56	0,50	0,83
2 meses	24	30	0,57	0,28	0,05	49,00	0,3	1,0	0,43	0,36	1,00
2 meses	48	30	0,52	0,30	0,05	56,77	0,2	1,0	0,42	0,29	0,71
2 meses	72	30	0,54	0,30	0,05	54,61	0,2	1,0	0,47	0,29	0,86
4 meses	24	30	0,61	0,31	0,06	50,89	0,3	1,0	0,43	0,32	1,00
4 meses	48	30	0,59	0,32	0,06	54,10	0,2	1,0	0,47	0,33	1,00
4 meses	72	30	0,61	0,32	0,06	51,80	0,2	1,0	0,54	0,36	1,00
6 meses	24	30	0,48	0,23	0,04	48,34	0,3	1,0	0,38	0,35	0,50
6 meses	48	30	0,44	0,23	0,04	52,11	0,2	1,0	0,36	0,30	0,50
6 meses	72	30	0,47	0,24	0,04	50,76	0,2	1,0	0,41	0,31	0,55
12 meses	24	30	0,39	0,12	0,02	30,30	0,2	0,8	0,39	0,30	0,45
12 meses	48	30	0,35	0,12	0,02	32,81	0,2	0,6	0,34	0,25	0,44
12 meses	72	30	0,38	0,14	0,02	35,17	0,2	0,6	0,36	0,29	0,50

Referencias: Nº: número de cepas; D.E.: desviación estándar; E.E.: error estándar; CV: coeficiente de variación; Mín: valor mínimo; Máx: valor máximo; P (25): percentil 25; P (75): percentil 75.

6. Estadística descriptiva para la actividad fosfolipasa, según el método de Castellani a lo largo del tiempo de conservación

ACTIVIDAD FOSFOLIPASA (Método de Castellani)											
Tiempo	Medición (hs)	Nº	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	P(25)	P(75)
0 mes	24	30	1,00	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
0 mes	48	30	0,71	0,17	0,03	23,87	0,5	1,0	0,64	0,56	0,82
0 mes	72	30	0,54	0,18	0,03	32,74	0,3	1,0	0,49	0,41	0,60
2 meses	24	30	1,00	0,03	0,00	2,57	0,9	1,0	1,00	1,00	1,00
2 meses	48	30	0,66	0,13	0,02	19,03	0,5	1,0	0,64	0,57	0,71
2 meses	72	30	0,52	0,13	0,02	25,12	0,4	0,9	0,46	0,43	0,61
4 meses	24	30	1,00	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
4 meses	48	30	0,69	0,15	0,03	22,08	0,5	1,0	0,64	0,60	0,75
4 meses	72	30	0,54	0,17	0,03	31,36	0,3	1,0	0,50	0,41	0,67
6 meses	24	30	1,00	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
6 meses	48	30	0,75	0,16	0,03	21,21	0,5	1,0	0,74	0,67	0,83
6 meses	72	30	0,64	0,19	0,03	29,81	0,4	1,0	0,63	0,43	0,77
12 meses	24	20	0,99	0,05	0,01	4,88	0,8	1,0	1,00	1,00	1,00
12 meses	48	20	0,85	0,12	0,03	14,04	0,7	1,0	0,81	0,75	1,00
12 meses	72	20	0,78	0,12	0,03	14,77	0,6	1,0	0,74	0,69	0,83

Referencias: **Nº:** número de cepas; **D.E.:** desviación estándar; **E.E.:** error estándar; **CV:** coeficiente de variación; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; **P (25):** percentil 25; **P (75):** percentil 75.

6. Estadística descriptiva para la actividad fosfolipasa, según el método de congelación a lo largo del tiempo de conservación

ACTIVIDAD FOSFOLIPASA (Método de congelación)											
Tiempo	Medición (hs)	Nº	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	P(25)	P(75)
0 mes	24	30	1,00	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
0 mes	48	30	0,69	0,15	0,03	21,30	0,5	1,0	0,66	0,57	0,76
0 mes	72	30	0,50	0,14	0,02	27,35	0,3	1,0	0,48	0,40	0,55
2 meses	24	30	1,00	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
2 meses	48	30	0,68	0,15	0,03	22,44	0,5	1,0	0,65	0,56	0,75
2 meses	72	30	0,53	0,12	0,02	22,19	0,4	0,8	0,50	0,43	0,63
4 meses	24	30	1,00	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
4 meses	48	30	0,68	0,17	0,03	25,71	0,4	1,0	0,64	0,53	0,77
4 meses	72	30	0,53	0,18	0,03	33,04	0,3	1,0	0,50	0,39	0,65
6 meses	24	30	1,00	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
6 meses	48	30	0,77	0,15	0,03	19,00	0,5	1,0	0,77	0,64	0,83
6 meses	72	30	0,60	0,15	0,03	24,71	0,3	1,0	0,63	0,56	0,71
12 meses	24	30	1,00	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
12 meses	48	30	0,87	0,12	0,02	13,89	0,7	1,0	0,83	0,77	1,00
12 meses	72	30	0,74	0,12	0,02	16,21	0,5	0,9	0,71	0,67	0,85

Referencias: **Nº**: número de cepas; **D.E.**: desviación estándar; **E.E.**: error estándar; **CV**: coeficiente de variación; **Mín**: valor mínimo;

Máx: valor máximo; **P (25)**: percentil 25; **P (75)**: percentil 75.

6. Estadística descriptiva para la actividad esterásica, según el método de Castellani a lo largo del tiempo de conservación

ACTIVIDAD ESTERÁSICA (Método de Castellani)											
Tiempo	Medición (hs)	Nº	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	P(25)	P(75)
0 meses	24	30	1,00	0,02	0,00	1,8	0,9	1,0	1,00	1,00	1,00
0 meses	48	30	0,94	0,12	0,02	12,7	0,6	1,0	1,00	1,00	1,00
0 meses	72	30	0,74	0,19	0,03	25,2	0,4	1,0	0,70	0,60	1,00
0 meses	78	20	0,62	0,19	0,04	30,3	0,4	1,0	0,60	0,50	0,70
2 meses	24	30	1,00	0,00	0,00	0,0	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
2 meses	48	30	0,93	0,15	0,03	15,8	0,6	1,0	1,00	1,00	1,00
2 meses	72	30	0,76	0,19	0,03	24,7	0,4	1,0	0,70	0,60	1,00
2 meses	78	30	0,63	0,17	0,03	26,4	0,4	1,0	0,60	0,50	0,70
4 meses	24	30	1,00	0,00	0,00	0,0	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
4 meses	48	30	0,91	0,15	0,03	16,6	0,6	1,0	1,00	0,80	1,00
4 meses	72	30	0,74	0,20	0,04	27,3	0,4	1,0	0,70	0,60	1,00
4 meses	78	30	0,65	0,21	0,04	32,4	0,4	1,0	0,60	0,50	0,70
6 meses	24	30	1,00	0,00	0,00	0,0	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
6 meses	48	30	0,90	0,15	0,03	16,8	0,5	1,0	1,00	0,80	1,00
6 meses	72	30	0,75	0,21	0,04	28,5	0,4	1,0	0,70	0,60	1,00
6 meses	78	30	0,68	0,22	0,04	32,9	0,4	1,0	0,60	0,50	1,00
12 meses	24	20	1,00	0,00	0,00	0,0	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
12 meses	48	20	0,95	0,12	0,03	13,0	0,6	1,0	1,00	1,00	1,00
12 meses	72	20	0,82	0,19	0,04	23,3	0,5	1,0	0,85	0,60	1,00
12 meses	78	20	0,75	0,22	0,05	29,0	0,5	1,0	0,60	0,60	1,00

Referencias: **Nº:** número de cepas; **D.E.:** desviación estándar; **E.E.:** error estándar; **CV:** coeficiente de variación; **Mín:** valor mínimo;

Máx: valor máximo; **P (25):** percentil 25; **P (75):** percentil 75.

6. Estadística descriptiva para la actividad esterásica, según el método de congelación a lo largo del tiempo de conservación

ACTIVIDAD ESTERÁSICA (Método de congelación)											
Tiempo	Medición (hs)	Nº	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	P(25)	P(75)
0 mes	24	30	1,00	0,00	0,00	0,0	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
0 mes	48	30	0,92	0,15	0,03	16,0	0,6	1,0	1,00	0,80	1,00
0 mes	72	30	0,72	0,18	0,03	24,9	0,5	1,0	0,60	0,60	1,00
0 mes	78	20	0,57	0,13	0,03	22,8	0,4	1,0	0,55	0,50	0,60
2 meses	24	30	1,00	0,00	0,00	0,0	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
2 meses	48	30	0,94	0,13	0,02	14,1	0,6	1,0	1,00	1,00	1,00
2 meses	72	30	0,77	0,18	0,03	23,2	0,5	1,0	0,70	0,70	1,00
2 meses	78	30	0,65	0,21	0,04	32,3	0,4	1,0	0,60	0,50	0,70
4 meses	24	30	1,00	0,00	0,00	0,0	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
4 meses	48	30	0,89	0,16	0,03	17,9	0,6	1,0	1,00	0,70	1,00
4 meses	72	30	0,74	0,19	0,04	26,1	0,5	1,0	0,70	0,60	1,00
4 meses	78	30	0,65	0,21	0,04	32,5	0,4	1,0	0,60	0,50	0,80
6 meses	24	30	1,00	0,00	0,00	0,0	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
6 meses	48	30	0,90	0,16	0,03	17,7	0,5	1,0	1,00	0,80	1,00
6 meses	72	30	0,78	0,21	0,04	27,4	0,4	1,0	0,70	0,60	1,00
6 meses	78	30	0,72	0,22	0,04	30,7	0,4	1,0	0,60	0,60	1,00
12 meses	24	30	1,00	0,00	0,00	0,0	1,0	1,0	1,00	1,00	1,00
12 meses	48	30	0,93	0,14	0,03	15,0	0,6	1,0	1,00	1,00	1,00
12 meses	72	30	0,78	0,21	0,04	26,8	0,4	1,0	0,70	0,60	1,00
12 meses	78	30	0,64	0,19	0,03	29,5	0,4	1,0	0,60	0,50	0,70

Referencias: **Nº:** número de cepas; **D.E.:** desviación estándar; **E.E.:** error estándar; **CV:** coeficiente de variación; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo; **P (25):** percentil 25; **P (75):** percentil 75.

7. Tabla con la prueba de Kruskal Wallis para cada actividad enzimática según los métodos de Castellani y congelación

PRUEBA DE KRUSKAL WALLIS							
Actividad enzimática	Tiempo de conservación	Castellani			congelación		
		Mediana	Promedio Rangos	Significancia*	Mediana	Promedio Rangos	Significancia*
Proteolítica (gl=9; H=32,89; p<0,0001)	0 mes	0,60	184,40	C D	0,56	190,57	D
	2 meses	0,46	139,63	A B	0,47	143,42	A B C
	4 meses	0,53	161,83	B C D	0,54	161,93	B C D
	6 meses	0,38	123,27	A B	0,41	125,40	A B
	12 meses	0,38	111,80	A	0,36	101,52	A
Fosfolipasa (gl=9; H=75,62; p<0,0001)	0 mes	0,49	119,42	A B	0,48	100,78	A
	2 meses	0,46	114,97	A	0,50	123,45	A B
	4 meses	0,50	123,47	A B	0,50	117,20	A B
	6 meses	0,63	167,12	C	0,63	158,53	B C
	12 meses	0,74	238,50	D	0,71	222,57	D
Esterásica (gl=9; H=9,57; p=0,3286)	0 mes	0,60	124,80	A	0,55	106,23	A
	2 meses	0,60	134,12	A	0,60	130,83	A
	4 meses	0,60	128,97	A	0,60	129,32	A
	6 meses	0,60	138,37	A	0,60	156,75	A
	12 meses	0,60	168,63	A	0,60	134,72	A

Referencias: gl: grado de libertad; H: prueba de Kruskal Wallis; p: valor de significancia

* Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

8. Análisis estadístico y figuras para cada actividad enzimática según tipo de muestra clínica

PRUEBA DE KRUSKAL WALLIS							
Actividad enzimática	Tiempo de conservación	Flujo Vaginal			Orina		
		Mediana	Promedio Rangos	Significancia	Mediana	Promedio Rangos	Significancia
Proteolítica (gl=9; H=28,87; p<0,0006)	0 mes	0,56	172,50	CD	0,56	174,92	D
	2 meses	0,45	133,08	ABC	0,46	124,92	AB
	4 meses	0,44	136,71	ABCD	0,52	151,48	BCD
	6 meses	0,36	97,90	A	0,45	137,39	ABCD
	12 meses	0,32	97,43	A	0,40	109,42	A
Fosfolipasa (gl=9; H=80,34; p<0,0001)	0 mes	0,47	91,02	A	0,49	100,03	A
	2 meses	0,50	103,56	A	0,49	113,39	A
	4 meses	0,56	123,94	A	0,44	111,45	A
	6 meses	0,60	132,94	AB	0,69	171,64	BC
	12 meses	0,69	196,64	CD	0,83	100,03	D
Esterásica (gl=9; H=8,97; p=0,3764)	0 mes	0,60	134,06	A	0,50	101,25	A
	2 meses	0,60	138,25	A	0,60	115,08	A
	4 meses	0,60	122,60	A	0,60	117,03	A
	6 meses	0,60	146,06	A	0,60	133,05	A
	12 meses	0,60	149,43	A	0,60	128,84	A

Referencias: gl: grado de libertad; H: prueba de Kruskal Wallis; p: valor de significancia. * Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05)

