



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DEL NORDESTE



FACULTAD
DE MEDICINA

Maestría en Micología Médica

CANDIDIASIS VULVOVAGINAL

**Formación de biopelículas y su asociación con el uso de
dispositivos intrauterinos (DIU)**

Maestrando

María Verónica Gómez

Director

Virginia Jewtuchowicz

Año 2017

Carrera de Maestría en Micología Médica



**FACULTAD
DE MEDICINA**

Universidad Nacional del Nordeste (UNNE)



Laboratorio de Investigación en Micología
Centro de Micología - Facultad de Medicina
Universidad de Buenos Aires- UBA

CANDIDIASIS VULVOVAGINAL

Formación de biopelículas y su asociación con el uso de dispositivos intrauterinos (DIU)

María Verónica Gómez

Dirección de Tesis: Virginia Jewtuchowicz

2017

Chaco, Argentina



Índice general

1	Abreviaturas	3
2	Índice de figuras	4
3	Índice de tablas	5
4	Índice de gráficos	6
5	Resumen.....	7
6	Introducción.....	10
6.1	<i>Candidiasis Vulvovaginal</i>	10
6.2	<i>Ecosistema vaginal</i>	11
6.3	<i>Factores predisponentes de la CVV</i>	12
6.4	<i>Factores de virulencia de Candida spp</i>	15
6.4.1	Adherencia	16
6.4.2	Morfogénesis	17
6.4.3	Switch fenotípico.	18
6.4.4	Secreción de Enzimas.....	18
6.4.5	Formación de biofilm	21
6.5	<i>Diagnóstico de la CVV</i>	23
6.6	<i>Estudio de biofilm</i>	25
7	Objetivos	26
7.1	<i>Objetivo general</i>	26
7.2	<i>Objetivos específicos:</i>	26
8	Justificación.....	27
9	Hipótesis	28
10	Materiales y métodos	29
10.1	<i>Tipo de estudio</i>	29
10.2	<i>Población de estudio</i>	29
10.3	<i>Recolección y procesamiento de muestras clínicas</i>	29
10.3.1	Cultivo e identificación de Cándidas a nivel de género y especie	30
10.3.2	Producción de biofilm.....	31
10.3.3	Cuantificación de biofilm	34
10.3.4	Clasificación de la capacidad de producción de biofilm	34
11	Análisis estadístico.....	36
12	Resultados	37
13	Discusión.....	42
14	Conclusiones:.....	50
15	Bibliografía	52

1 Abreviaturas

CVV: candidiasis vulvovaginal.

CVVR: candidiasis vulvovaginal recurrente.

TGF: tracto genital femenino

EO2: estradiol

P4: progesterona

H₂O₂: agua oxigenada

DIU. Dispositivo intrauterino

ACO: anticonceptivos orales.

SAP: Proteinasa aspártica secretada

PLA, PLB, PLC y PLD: Fosfolipasa A, B, C y D

ALS (Agglutinin-Like Sequence)

2 Índice de figuras

Figura 1: Función protectora de la Microbiota vaginal	12
Figura 2: Representación esquemática del proceso de morfogénesis	17
Figura 3: Morfología colonial de <i>Cándida albicans</i>	19
Figura 4: Etapas de formación de biofilm de <i>Cándida albicans</i>	23
Figura 5: Esquema de procesamiento de las muestras	30
Figura 6: Algoritmo para la identificación de levaduras del género <i>Cándida</i>	31
Figura 7: Fotografía- Placa de microtitulación luego de 24 hs de incubación ..	33
Figura 8: Fotografía- Placa de microtitulación - Técnica cuantificación de biofilm..	33

3 Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de la capacidad de formación de biofilm para cepas de <i>Candida</i> , según criterios definidos por <i>Stephanovic et al.</i>	35
Tabla 2. Distribución de los factores predisponentes analizados en función del cultivo micológico.	38
Tabla 3. Análisis de los factores predisponentes de candidiasis vulvovaginal estudiados en el presente trabajo (N muestral= 337 mujeres).	38
Tabla 4. Perfil de producción de biofilm en función de la especie de <i>Candida</i> involucrada en cada caso estudiado.	40
Tabla 5. Comparación de la capacidad de formación de biofilm entre cepas de <i>Candida albicans</i> y no <i>albicans</i> . Análisis realizado sobre los 64 aislamientos de <i>Cándida</i> obtenidos.	41

4 Índice de gráficos

Grafico 1. Distribución proporcional de las especies del género <i>Cándida</i> aisladas en 66 muestras de mujeres pertenecientes al área de influencia del Centro de Salud de atención primaria “Alicia Moreau de Justo” – Villa Libertad de la ciudad de Resistencia, Chaco; durante el período Febrero 2014-Enero 2015. (n muestral = 337 exudados vaginales).	37
Grafico 2. Distribución de las densidades ópticas (DO) leídas a una longitud de onda de 595 nm de especies de <i>Cándidas</i> aisladas de mujeres con candidiasis vulvovaginal.....	40

5 Resumen

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una enfermedad inflamatoria de la vulva y la vagina, producida por diferentes especies del género *Candida*. Alrededor del 85–95% de las CVV son debidas a *Candida albicans*, mientras que el porcentaje restante es atribuido a otras especies como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, entre otras. Los factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis de estas levaduras incluyen: adherencia, morfogénesis, switch fenotípico, secreción de enzimas y formación de biofilm.

Los biofilm se definen como comunidades microbianas heterogéneas y dinámicas que se encuentran en continua transformación. Pueden estar formados por una sola especie bacteriana/fúngica, o ser polimicrobianas. El proceso de formación de biofilm es complejo; se inicia con la adherencia del microorganismo a una superficie biótica o abiótica y evoluciona en un proceso continuo, siguiendo diferentes etapas (adhesión, crecimiento, maduración y dispersión)

El objetivo general del presente trabajo fue comparar la capacidad de generación de biofilm de las levaduras del género *Candida* recuperadas de pacientes con candidiasis vaginal.

Se realizó un estudio de tipo exploratorio, descriptivo y observacional con muestreo no probabilístico por conveniencia. El mismo se focalizó sobre un grupo de 337 mujeres sintomáticas con edades comprendidas entre los 14-64 años, con pedido médico explícito de estudio microbiológico en exudado vaginal. Las mujeres participantes se reclutaron del área de influencia del Centro de Atención Primaria de la Salud “Alicia Moreau de Justo”, de la ciudad de Resistencia, Chaco (Argentina). El material de muestra fue recolectado durante un año calendario completo, comprendido entre febrero 2014 y enero de 2015. Las muestras de

exudado vaginal fueron tomadas de fondo de saco vaginal con hisopo estéril, previa colocación del espéculo. Se realizó el cultivo, aislamiento e identificación de levaduras a nivel de género y especie mediante métodos convencionales y se estudió la formación de biofilm por la técnica de micro titulación en placas de poliestireno.

Se analizaron 337 exudados vaginales de mujeres con una media de edad de 27,9 años. Cada muestra se correspondió con una persona analizada. El 19,9% (66/337) de las muestras resultaron positivas para el cultivo micológico. La distribución proporcional de frecuencia de especies del género *Candida* fue de 76,12% para *C. albicans* (51/67 *Candidas*); 16,42% para *C. glabrata* (11/67); 4,48% para *C. krusei* (3/67) y 1,49% para *C. dubliniensis* y *C. parapsilosis* (1/67 cada una). La detección de infecciones mixtas; se observó en una sola ocasión (portación conjunta de *C. albicans* y *C. parapsilosis complex*).

El estudio de producción de biofilms y cuantificación de los mismos, se realizó sobre 64 de los 67 aislamientos fúngicos inicialmente recuperados, mostrando una amplia variabilidad en la capacidad de producción de estas películas biológicas. El 82,9% (53/64) de las *Candidas* aisladas mostró alguna capacidad de formación de biofilm; y de éstas, *C. albicans* fue la que manifestó este factor de virulencia en mayor proporción. Esta especie mostró una capacidad de formación moderada a fuerte en el 70,8% de los casos (34/48 cepas aisladas de *C. albicans*). En relación con los factores predisponentes de la CVV considerados en este trabajo (embarazo, uso de anticonceptivos orales y portación de dispositivo intrauterino-DIU), solo el embarazo mostró una asociación estadística significativa con la formación de biofilms ($p=0,0035$). Si bien todas las cepas aisladas de pacientes portadoras de DIU resultaron productoras de biofilm,

la cantidad de muestras estudiadas resultó limitante para realizar una asociación entre la utilización de DIU y la infección por *Candida*.

Del análisis realizado en el presente trabajo y de los resultados obtenidos, podemos concluir que la identificación rápida y correcta de levaduras patógenas, es uno de los objetivos a alcanzar para el manejo adecuado del paciente, especialmente para el control efectivo de la infección fúngica. Conocer la epidemiología local, contribuye a evitar el uso irracional de antifúngicos y a la elección de la terapia empírica adecuada. Además, la capacidad de formación de biofilm, debe ser considerada como un importante factor de virulencia de las levaduras del género *Candida*. Si bien los sistemas *in-vitro* utilizados en este trabajo para el análisis de los biofilm presentan ciertas limitaciones, permiten el procesamiento de un gran número de muestras de manera simultánea (ideal como técnica de cribado), y proporcionan una gran facilidad para el ensayo de diversos parámetros físico-químicos, bioquímicos y genéticos (fenotípicos y genotípicos) de las levaduras. Finalmente, resaltamos el enorme valor que tiene el estudio de los hongos patógenos. Son agentes que fueron largamente relegados en el entorno microbiológico, y que sin embargo en la actualidad resaltan como importantes productores de patologías serias y con un pronóstico no siempre alentador. Conocer y entender más claramente uno de sus mecanismos de patogénesis ha sido el aporte generado por este trabajo.

6 Introducción

6.1 Candidiasis Vulvovaginal

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una enfermedad inflamatoria de la vulva y la vagina, producida por diferentes especies del género *Cándida*. Afecta a una gran proporción de mujeres en edad fértil y es considerada la segunda causa de vulvovaginitis aguda, después de la vaginitis bacteriana inespecífica.

Si bien su incidencia no se conoce con certeza, se estima que afecta al 75% de las mujeres entre la menarca y la menopausia; la mitad, sufre más de un episodio a lo largo de su vida y alrededor del 5% de ellas presenta una afección conocida como candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR). Esta última, definida por la documentación clínica y microbiológica de 4 o más episodios a lo largo de un año (1)(2).

Alrededor del 85–95% de las CVV son debidas a *Cándida albicans*, mientras que el porcentaje restante es atribuido a otras especies como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, entre otras (3)(4).

El género *Cándida* se encuentra conformado por más de 200 especies, de las cuales, menos de 50 son consideradas de interés médico. Según su clasificación taxonómica, estas levaduras pertenecen a la familia *Sacharomycetaceae*, orden *Sacharomycetales*, clase *Sacharomycetes*, pertenecientes al Reino *Fungi*. Se caracterizan por presentar reproducción de tipo asexual o anamórficas a través de blastoconidios, no producir pigmentos melánicos, presentar morfologías diversas (globosas, ovales, cilíndricas, elípticas, etc.) y un tamaño que puede variar entre los 3-10um.

El hábitat de estos hongos lo constituyen los humanos y algunos animales homeotérmicos dentro de los que se incluyen mamíferos y aves. En el hombre,

diversas especies de este género se encuentran como comensales del tracto gastrointestinal, tracto respiratorio superior, mucosa oral, vaginal y piel. No se aíslan del suelo, ni de los detritus vegetales, considerándose a los pocos aislamientos que se han obtenido a partir de estas fuentes, como provenientes de contaminación fecal (5)(6).

6.2 Ecosistema vaginal

El equilibrio del ecosistema vaginal se mantiene a expensas de la interacción articulada de diferentes mecanismos que colaboran entre sí para mantener sano el tracto genital femenino (TGF). En este contexto, el sistema inmunológico, el sistema endócrino y la composición de la microbiota vaginal, son los principales encargados de la preservación de este balance biológico.

A diferencia de otros sistemas inmunes de mucosas, el correspondiente al TGF, ha evolucionado para enfrentar retos especiales como son la aceptación de un feto semi-alogénico y la protección contra patógenos potenciales. Bajo estas circunstancias, resulta importante considerar al sistema inmunológico del TGF, no como un conjunto aislado de células, sino como parte de un sistema en el que las interacciones multidireccionales que se establecen entre las células epiteliales, los fibroblastos y las células del sistema inmunitario, resultan esenciales para asegurar la salud reproductiva y la protección de la mucosa asociada (7)(8)(9)(10).

Tanto las células epiteliales de la mucosa vaginal, como las del sistema inmune del TGF, se encuentran bajo control de las hormonas sexuales femeninas estradiol (EO₂) y progesterona (P₄). Sobre este epitelio, los estrógenos regulan el trofismo, la vascularización y la vitalidad de los tejidos; influyendo, además, sobre las condiciones de humedad, pH y composición del flujo y la microbiota vaginal (7).

La microbiota vaginal representa uno de los mecanismos más importante que posee el TGF para enfrentar a los microorganismos patógenos. Si bien no se conoce con exactitud, cual es el efecto que originan las hormonas femeninas sobre la microbiota vaginal, se sabe que los estrógenos desempeñan un importante papel en la promoción del crecimiento lactobacilar al estimular la acumulación de glucógeno en las células epiteliales (11)(12).

6.3 Factores predisponentes de la CVV

La microbiota vaginal, constituida principalmente por *Lactobacillus spp*, constituye la barrera defensiva más importante frente a la infección candidiásica. Los mecanismos mediante los cuales, cumple con dicho propósito, pueden verse detallados en la **Figura 1**.

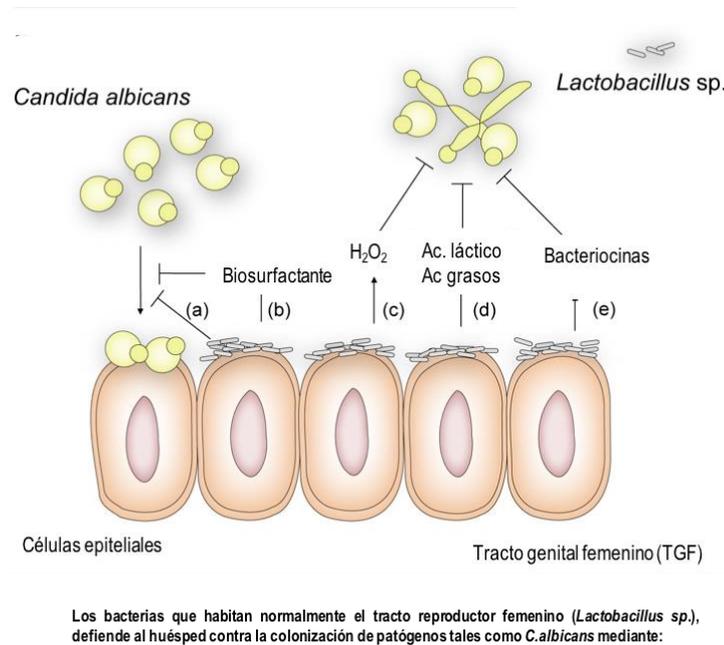


Figura 1: Función protectora de la microbiota vaginal. Competencia por nutriente y bloqueo de los receptores epiteliales a los cuales se une *Cándida* (a) Secreción de sustancias biosurfactantes, las cuáles físicamente disminuyen la unión de los hongos al epitelio. (b) Liberación de sustancias como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido láctico u otros ácidos grasos que inhiben la proliferación y transformación de *Cándida spp* a su fase micelial (c y d) Producción de bacteriocinas, que suprimen la proliferación micótica, reduciendo de esta manera la carga fúngica (e). Imagen modificada de Morales y col(13)

El desequilibrio de esta microbiota, ocasionada fundamentalmente por la reducción de la población de lactobacilos o por el sobrecrecimiento de otras especies microbianas patógenas u oportunistas, se traducirá en la presencia de signos y síntomas asociados a vaginosis o vaginitis. Así, por ejemplo, la proliferación excesiva de *Cándida*, en la mucosa vaginal, dará lugar a la aparición de la CVV.

El aumento de la carga fúngica presente en la mucosa vaginal puede verse influenciada por la presencia de diversos factores que se detallan a continuación.

- **Embarazo:** Predispone tanto a la infección candidiásica primaria como a las recurrencias. El alto contenido de glucógeno, presente en las células epiteliales como consecuencia de los altos niveles estrogénicos gestacionales, supone un elemento nutritivo facilitador, tanto de la multiplicación como de la germinación micótica. En este mismo sentido, niveles elevados de progesterona ejercen, por un lado, un efecto supresor de la inmunidad celular para evitar el rechazo del embrión o feto y por otro, un efecto promotor de la expresión del gen responsable de la síntesis celular del receptor epitelial al cual se une *Cándida*.
- **Anticonceptivos orales:** Existen evidencias que su utilización en altas dosis, o los tratamientos de reemplazo hormonal, predisponen a la aparición de micosis vaginales.
- **Alteración en los niveles de glucosa en el epitelio vaginal:** La existencia de factores que induzcan o faciliten una elevación del glucógeno vaginal como diabetes mellitus, particularmente aquellas que se encuentran mal controladas y/o dietas ricas en hidratos de carbonos puede promover una CVV. Esto es debido a que el exceso de glucógeno, además de aumentar el sustrato nutritivo de los hongos, promueve un

incremento en la capacidad de adhesión de los mismos al epitelio vaginal.

- **Utilización de antibióticos:** La utilización de antibióticos puede incrementar tanto la colonización como la infección por *Cándida*. Aunque diferentes estudios de casos y controles no han sido concluyentes en este sentido, los antibióticos podrían ser una de las causas de la reducción y/o eliminación de la microbiota vaginal y/o del equilibrio biológico de la misma. Esto es de suma importancia si consideramos que constituye el principal baluarte defensivo del ecosistema vaginal frente a los hongos (14)(15)(16)(17).
- **Utilización de dispositivos intrauterinos (DIU):** El uso de DIU se ha relacionado con la aparición de diferentes complicaciones infecciosas, entre las que se pueden destacar: la enfermedad Inflamatoria Pélvica (EIP), la vaginitis y vaginosis, la actinomicosis pélvica y el aborto espontáneo séptico. *Candida spp* tiene la capacidad de adherirse a diferentes partes del DIU, generando un biofilm que podría tener relevancia en la generación de las vulvovaginitis y las recurrencias de las mismas. Con relación a esto, existen trabajos que han demostrado una mayor tasa de infección por *Cándida* en pacientes portadoras de DIU. (18)(19)(20)
- **Aumento de pH vaginal:** Sería un factor predisponente importante para la proliferación excesiva de los patógenos oportunistas. En este aspecto, dos elementos deben tenerse presente, el sangrado menstrual y el semen. Ambos tienen un pH neutro o ligeramente alcalino, lo que potencialmente podría generar un aumento del pH vaginal. En el caso del sangrado menstrual, el aumento del pH, en añadidura con el arrastre de la microbiota vaginal que genera el flujo menstrual, puede originar una

disminución de la densidad de *Lactobacillus*, lo que finalmente permite el sobrecrecimiento de otros componentes de la microbiota. La finalización de la menstruación se acompaña de la reversión a la supremacía de los lactobacilos, con lo que se recupera la protección brindada por los mismos de manera natural y se evitan los procesos patológicos (vaginosis bacterianas y vaginitis) asociados a su escasez.

- **Inmunosupresión:** Las mujeres inmunosuprimidas, ya sea debido al padecimiento de enfermedades que afectan la respuesta inmune, como el HIV, o por el uso de fármacos inmunosupresores (corticoterapias, quimioterápicos etc.), presentan un mayor riesgo a desarrollar candidiasis (3).

6.4 Factores de virulencia de *Candida spp*

Las especies del género *Candida* son consideradas patógenos oportunistas. Si bien en un principio se pensaba que las levaduras participaban pasivamente en el proceso de patogénesis y en el establecimiento de la infección fúngica, en la actualidad este concepto se ha modificado, proponiéndose una participación activa por parte de estos microorganismos, a través de los llamados factores de virulencia (16).

Numerosos investigadores han estudiado los factores de virulencia del género *Candida*; sin embargo, la mayoría de ellos se han concentrado específicamente en los de *Candida albicans*, por ser la especie más frecuentemente aislada de infecciones que afectan al hombre (21)(22)(23). Los factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis de estas levaduras incluyen: adherencia, morfogénesis, switch fenotípico, secreción de enzimas y formación de biofilm (1)(16)(21)(23)(24)(25)(26).

6.4.1 Adherencia

La adherencia a las células del hospedero es crucial para iniciar y mantener la relación de comensal, además de servir para la colonización de los tejidos y/o materiales inertes implantados en el cuerpo del hospedero. En este proceso, intervienen las células del huésped, las células fúngicas y las condiciones micro ambientales. Se inicia por una unión inespecífica, basada en fuerzas de atracción y repulsión que acercan al patógeno a la superficie del hospedero. Posteriormente, se establecen interacciones específicas entre proteínas de la pared celular de las levaduras (adhesinas) y los receptores de las células epiteliales del huésped.

Las adhesinas son biomoléculas que promueven la unión de ligandos específicos a las células del hospedero. Así, por ejemplo, en *C. albicans*, la adhesión se encuentra mediada por la presencia de una familia de adhesinas denominadas ALS (Agglutinin-Like Sequence). Las ALS, pertenecen a un grupo de 8 proteínas glicosiladas, genéticamente relacionadas, pero de gran variabilidad alélica (ALS1-ALS7 y ALS9). Estas proteínas actúan cooperativamente y forman agregados similares a amiloide a lo largo de la superficie celular, facilitando la aglutinación de las células fúngicas. De estas proteínas, las ALS1 y ALS3 son especialmente importantes en la adherencia (21)(23)(22). Otras moléculas que también promueven la adhesión y penetración de *C. albicans* a los tejidos son los polisacáridos, glicoproteínas y lípidos de la superficie celular (27).

La máxima expresión de la adherencia es la formación de biofilm en el hospedero que “*per-sé*”, constituye un factor de patogenicidad.

6.4.2 Morfogénesis

La morfogénesis se refiere a la conversión entre la forma levaduriforme (unicelular) y la forma filamentosa del hongo (hifa o pseudohifa). En la **Figura 2** se ilustra este proceso.

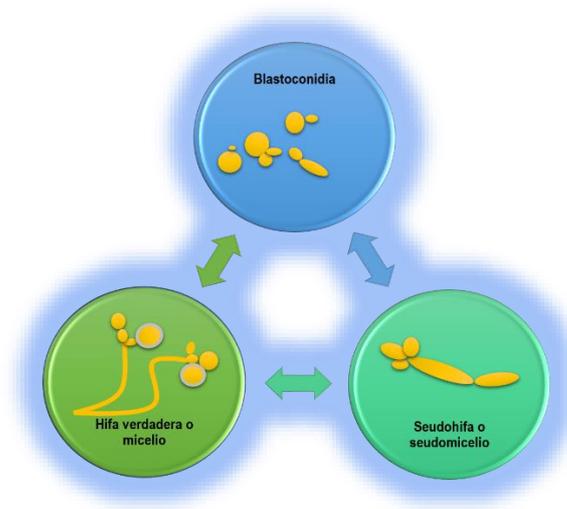


Figura 2. Representación esquemática del proceso de morfogénesis

Estas transiciones representan una respuesta del hongo frente a alteraciones de las condiciones nutricionales y ambientales de su medio circundante (aminoácidos, temperatura, cambios de pH, presencia de suero, etc.), posibilitando su adaptación a diferentes nichos biológicos y favoreciendo la diseminación fúngica (23)(27)(28)(29)(30).

C. albicans, al igual que otras especies pertenecientes a este género puede cambiar su morfología de levadura, redonda u ovoide (blastoconidia) a filamentosa y elongada (hifa y pseudohifa). Este atributo les otorga mayor virulencia,

capacidad de evadir el sistema inmune y de suprimir la respuesta pro inflamatoria por parte del hospedero (23)(29)(31)(32).

A excepción de *C. glabrata*, el resto de las especies asociadas a candidiasis pueden formar seudomicelios; además, *C. albicans* y *C. dubliniensis* son formadoras de hifas verdaderas.

6.4.3 Switch fenotípico.

La mayoría de las cepas de *C. albicans* son capaces de presentar este fenómeno, el cual da como resultado observable, la manifestación de cambios fenotípicos con alta frecuencia, como consecuencia de la acción de numerosos factores ambientales. Este fenómeno incluye un cambio epigenético en la morfología colonial, diferente al de la morfogénesis explicada en el apartado anterior (transición levadura/hifa/seudohifa). Afecta una gran variedad de características propias del agente, como pueden ser, la morfología colonial (blanca/opaca), la diferencia en la antigenicidad, la síntesis de polipéptidos, la adherencia, entre otros. Estos cambios, representarían una estrategia patogénica del hongo para poder hacer frente a los cambios microambientales a los que se enfrenta dentro del hospedero, tanto en su estado comensal como patógeno.

Figura 3.

6.4.4 Secreción de Enzimas

C. albicans es capaz de producir y liberar varias enzimas hidrolíticas, las cuales juegan un papel clave en el metabolismo de los hongos y en su patogénesis. Estas enzimas pueden ser consideradas factores de virulencia, ya que tienen la capacidad de romper polímeros estructurales que proporcionan nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos,

así como inactivar moléculas que se relacionan directamente con los mecanismos de defensa del huésped. A continuación, se describen las principales enzimas extracelulares relacionadas con la patogénesis de *Cándida*.

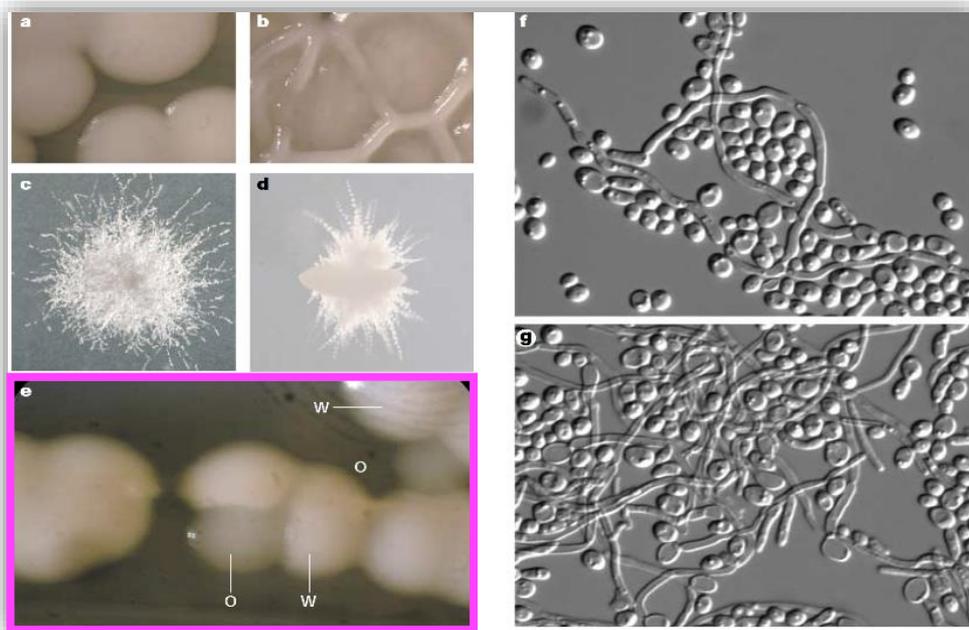


Figura 3: Morfología colonial de *Cándida albicans*. Una sola cepa puede adoptar diferentes morfologías coloniales dependiendo del medio de cultivo utilizado o como consecuencia del switch fenotípico. En la imagen remarcado con color puede observar el cambio fenotípico opaco blanco en un medio de cultivo SDC (Medio de sal-dextrosa completa) mantenido a 23°C. Se observa una población de células blancas (W) y otra de células opacas (O). Imagen Modificada de Berman y col.(33)

6.4.4.1 *Proteinasas aspárticas secretadas (Sap)*

Son responsables de la adhesión, daño tisular y evasión de la respuesta inmune, debido a su capacidad para hidrolizar diversas proteínas del hospedero tales como albumina, queratina, colágeno, fibronectina, interleucina 1 β (IL-1 β) e Inmunoglobulina A, entre otras.

Dentro de la familia de las Sap se han descrito 10 proteínas principales (Sap1–Sap10), de las cuales Sap2 es la que se genera en mayor proporción durante las primeras etapas de la infección y cuando *C. albicans* se cultiva en medios que contienen proteínas como única fuente de nitrógeno. La presencia de estas proteínas no se limita solo a *C. albicans*; se ha demostrado su presencia en otras especies como *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*.

Las evidencias que soportan el rol de la Sap como factor de virulencia se enumeran a continuación:

1. Se ha observado una alta correlación entre la virulencia de una cepa y los niveles de expresión de las Sap.
2. Las cepas mutantes con deficiencia de Sap resultan menos virulentas o avirulentas.
3. Los genes que codifican para las proteínas Sap solo están presentes en las especies patógenas, no así en otras levaduras que no presentan potencial patógeno como *Saccharomyces cerevisiae*, lo cual apoya la hipótesis de que estas proteínas están implicadas en la virulencia de estos hongos
4. Se ha detectado la presencia de Sap y anticuerpos anti-Sap en pacientes infectados.

6.4.4.2 Fosfolipasas

Son glucoproteínas con actividad hidrolasa (hidrolizan enlaces ésteres de glicofosfolípidos) y lisofosfolipasa transacilasa (liberan ácidos grasos a partir de los lisofosfolípidos y transfieren el ácido graso libre a otro fosfolípido). Dada su acción, las fosfolipasas son secretadas y detectadas en la punta de la hifa durante la invasión a los tejidos; recordemos que los fosfolípidos constituyen el principal componente de la membrana celular. Se han identificado 4 fosfolipasas (PLA, PLB, PLC y PLD),

siendo la PLB la más importante debido a que cumple un rol clave en el proceso de infección (27).

6.4.5 Formación de biofilm

Los biofilms se definen como comunidades microbianas heterogéneas y dinámicas que se encuentran en continua transformación. Pueden estar formados por una sola especie bacteriana/fúngica, o ser polimicrobianas. Esta última es la situación más común.

El proceso de formación de biofilms es complejo; se inicia con la adherencia del microorganismo a una superficie biótica o abiótica y evoluciona en un proceso continuo, siguiendo diferentes etapas. Ver **figura 4**.

1. **Etapas de Adhesión:** Inicialmente, los microorganismos libres en su forma planctónica (levaduras) forman una capa que se absorbe de manera reversible a la superficie, mediante fuerzas de atracción electrostáticas. Cuando las condiciones son propicias (pH, temperatura, osmolaridad, etc.), las levaduras incrementan la expresión de moléculas de adhesión en su superficie, promoviendo de esta manera un aumento de la capacidad de adherencia célula-célula y célula-superficie, desencadenándose así el proceso de formación del biofilm.
2. **Etapas de crecimiento:** Una vez establecida la adherencia a la superficie, las levaduras comienzan a dividirse y las células hijas se extiende alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia. A medida que las células se dividen y colonizan la superficie, comienzan a sintetizar un exopolisacárido, el cual constituye la matriz del biofilm.
3. **Etapas de maduración** El biofilm maduro consiste en una compleja red de microcolonias (caracterizada por la presencia de formas filamentosas (hifas

y/o pseudohifas) y por la producción de matriz extracelular) y canales de agua, cuya citoarquitectura presenta diferencias significativas entre las distintas especies. El rol de esta matriz es la de proteger a las células fúngicas frente a la acción fagocítica de las células del huésped y sustancias anti fúngicas y tóxicas, además de permitir el mantenimiento de los nutrientes dentro de ella.

4. **Etapas de dispersión:** Una vez que el biofilm ha alcanzado su maduración, se inicia la etapa de dispersión, en la que se excretan continuamente organismos planctónicos, microcolonias y fragmentos de biofilm que pueden diseminarse y adherirse nuevamente a otro tejido o superficie, permitiendo así la formación de nuevos biofilms en lugares contiguos o más alejados.

Las distintas fases de desarrollo de los biofilms están dirigidas y reguladas por eventos moleculares complejos, que dependen en gran medida de las condiciones microambientales (34)(35).

Si bien la composición del biofilm es variable dependiendo del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta el 97% de su composición global. Además del agua y de las células microbianas, la matriz del biofilm está constituida principalmente por exopolisacáridos secretados por las células que forman parte del mismo, y en menor cantidad, de otras macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y productos diversos procedentes de la lisis celular.

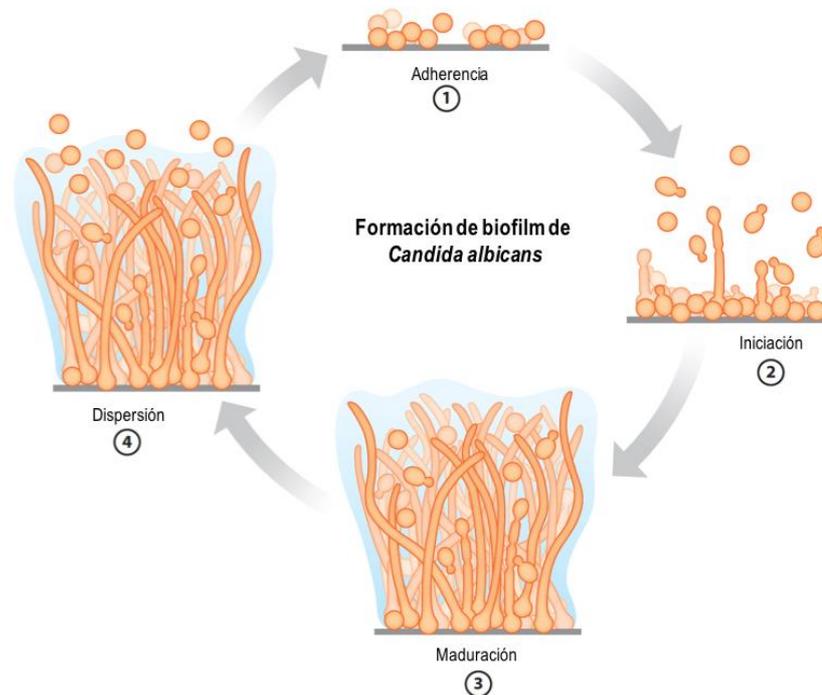


Figura 4: Etapas de formación de biofilm de *Cándida albicans*. 1 Adherencia de células de levadura a una superficie. 2 Proliferación celular, formación de una capa basal de células de anclaje. 3 Crecimiento de las hifas de manera simultánea a la producción de matriz extracelular. 4 Dispersión del biofilm para sembrar nuevos sitios. Imagen modificado de Nobile y col. (8)

6.5 Diagnóstico de la CVV

El diagnóstico de la CVV, desde el punto de vista clínico, es difícil de establecer, ya que los signos y síntomas que pueden acompañar a esta patología no siempre son distinguibles y con frecuencia se asocian a otras causas. El prurito vulvar es el síntoma que aparece con mayor frecuencia, casi en el 90 % de los casos. Otras molestias como edema vulvar, dolor y escozor al orinar, eritema de la mucosa vaginal y vulvar y secreción vaginal de aspecto grumoso de color blanco-amarillento, espeso y sin olor característico, también pueden presentarse. Aunque cualquiera de estos signos y síntomas pueden presentarse en la CVV, ninguno de ellos es patognomónico ni específico de esta patología y siempre

deben considerarse otras posibles etiologías, infecciosas y no infecciosas. Consecuentemente, para establecer el diagnóstico de certeza de una CVV, además del examen clínico, es necesario efectuar estudios microbiológicos. Estos estudios comprenden esencialmente, la realización del examen microscópico directo y el cultivo micológico de la muestra.

La identificación por cultivo en ausencia de síntomas o signos no es una indicación para el tratamiento, ya que aproximadamente el 10 - 20% de las mujeres, albergan *Cándida spp.* y otras levaduras en la vagina. Actualmente el diagnóstico de la CVV se basa en la combinación de signos y síntomas, sumados a la confirmación por estudio micológico de la presencia de hongos en la muestra, (correlación de 67 % entre la visualización de levaduras al examen directo y el crecimiento de más de 10 colonias en el cultivo de un exudado vaginal).

El cultivo micológico permite, además de establecer la etiología, efectuar estudios de tipificación y pruebas de sensibilidad a los antifúngicos.

Tradicionalmente, la identificación de especies del género *Candida* se ha realizado mediante la aplicación de métodos convencionales, basados en el estudio de las características morfológicas, bioquímicas y nutricionales de estos hongos. Estas técnicas, si bien son de utilización rutinaria, resultan complejas, laboriosas y en algunas ocasiones proporcionan datos variables y confusos que dificultan la correcta identificación de las especies de este género. Aunque la tipificación a nivel de especie, en algunos casos sigue siendo un tema todavía no resuelto en micología, en los últimos años se han incorporado métodos diagnósticos basados en el análisis genómico y proteómico. Los datos obtenidos a partir de la aplicación de estas técnicas han contribuido sustancialmente al esclarecimiento de las relaciones filogenéticas existentes entre los grupos taxonómicos de estos microorganismos. De esta manera, se ha demostrado que

muchas especies, tradicionalmente consideradas como simples morfoespecies, constituyen en realidad complejos de especies, las cuales en muchas ocasiones solo pueden ser diferenciadas mediante estudios genómicos, como es el caso de las especies que conforman el complejo de *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*), o el complejo de *Candida glabrata* (constituido por 2 especies crípticas recientemente descritas, *C. bracarensis* y *C. nivariensis*) (36)(37)(38)(39)(40).

6.6 Estudio de biofilm.

El estudio de los biofilm y los mecanismos que controlan su formación es uno de los campos de la microbiología que ha experimentado un gran avance durante los últimos años. Actualmente, la combinación de técnicas de observación tridimensional de alta resolución, la utilización de colorantes moleculares específicos y el uso de diferentes sistemas de modelos, han permitido demostrar que los biofilms no son simples agregados pasivos de células adheridas a una superficie, sino que son sistemas biológicos complejos desde el punto de vista estructural y dinámico.

Los modelos utilizados para estudiar biofilms incluye desde simples modelos *in-vitro* hasta complejos modelos *in-vivo*; los cuales han contribuido progresivamente al conocimiento actual de la fisiología del biofilm dentro del entorno del huésped.

7 Objetivos

7.1 Objetivo general

Comparar la capacidad de generación de biofilm de las levaduras del género *Candida* recuperadas de pacientes con candidiasis vaginal.

7.2 Objetivos específicos:

- Identificar a nivel de género y especie los aislamientos de levaduras recuperadas de muestras vaginales.
- Estudiar la capacidad de generación de biofilm de las distintas especies de *Candida* aisladas.
- Aportar información, a partir de la observación in-vitro, que contribuya a clarificar si la presencia de dispositivos intrauterinos (DIU) puede considerarse un factor predisponente para la infección por levaduras del género *Candida*.
- Determinar la existencia de asociación entre la capacidad de formación de biofilm y la presencia de dispositivos intrauterinos (DIU) en la serie estudiada.

8 Justificación

En Argentina, existen múltiples trabajos vinculados a la distribución de frecuencia de especies de *Candida* aisladas de muestras vaginales; sin embargo, son escasos los trabajos que evalúan la capacidad de formación de biofilm por parte de estos microorganismos (41).

Como ha sido descrito por numerosos investigadores, la capacidad de formación de biofilm, es un importante factor de virulencia de las especies del género *Candida*. Si bien en los últimos años, se ha incrementado considerablemente el interés por el estudio de estas complejas comunidades de microorganismos, la gran mayoría de los estudios realizados se han centrado en las biopelículas bacterianas.

Los agentes capaces de formar biofilms sobre la superficie de dispositivos médicos son muy variados. Entre las levaduras, las pertenecientes al género *Cándida*, son las que más frecuentemente lo hacen. Asimismo, resulta importante remarcar que las levaduras que participan en este tipo de comunidades (biofilm) pueden expresar una mayor resistencia a la terapia antimicótica convencional y ser responsables de la no erradicación de estas levaduras del lumen vaginal, explicando en parte, la aparición de la CVVR.

En consecuencia, y debido a la falta de antecedente locales relacionados a la evaluación de la capacidad de formación de biofilms a partir de aislamientos fúngicos provenientes de CVV, consideramos que el presente trabajo, implicaría una contribución original y aportaría información de gran utilidad predecir o explicar, al menos en parte, el grado de virulencia de las cepas aisladas en las CVV.

9 Hipótesis

Las especies de *Candidas no albicans* presentan la misma capacidad para generar biofilm que *Candida albicans*.

10 Materiales y métodos

10.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo exploratorio, descriptivo y observacional con muestreo no probabilístico por conveniencia.

10.2 Población de estudio

El estudio se realizó en un grupo de 337 mujeres sintomáticas con edades comprendidas entre los 14 - 64 años (media de edad de 27,9 años), y con pedido médico explícito de estudio microbiológico en exudado vaginal. Todas las pacientes participantes voluntarias, pertenecen al área de influencia del Centro de Atención Primaria de Salud de Villa Libertad "Dra. Alicia Moreau de Justo" de la ciudad de Resistencia- Chaco. El material de muestra fue recolectado durante un año calendario completo, comprendido entre los meses de febrero 2014 y enero de 2015. En todos los casos, previo a la toma de muestra, las pacientes fueron informadas adecuadamente sobre los alcances y objetivos del presente trabajo y se las invitó a firmar un consentimiento informado. Se siguieron las normas éticas emanadas de la Declaración de Helsinki de 2001 para trabajos de investigación y se aseguró el resguardo de identidad.

10.3 Recolección y procesamiento de muestras clínicas.

La toma de muestra del exudado vaginal estuvo a cargo del personal del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Centro Asistencial de Salud antes mencionado. Las muestras de exudado vaginal fueron tomadas de fondo de saco vaginal con hisopo estéril, previa colocación del espéculo.

10.3.1 Cultivo e identificación de Cándidas a nivel de género y especie

Una vez remitidas las muestras al laboratorio, se procedió al procesamiento de las mismas. De manera inmediata se realizó el examen en fresco del material, la coloración de gram y se procedió al cultivo para el aislamiento primario. **Figura 5.**

El cultivo se realizó inicialmente en Agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol a 37°C en aerobiosis durante 48-72 hs. Los aislamientos de levaduras obtenidos fueron identificados a nivel de género y especie mediante pruebas de tubo germinativo, siembra en medio cromogénico (CHROMagar™ Candida), micromorfología en agar leche 1%-Tween 80 y perfil de asimilación de carbohidratos por sistemas comerciales API ID 32D (BioMérieux, Francia). En la **figura 4** se puede consultar el algoritmo seguido para la identificación.

Los aislamientos que desarrollaron colonias de color verde en el medio de cultivo CHROMagar™ Cándida, fueron sometidos a pruebas complementarias a fin de completar la identificación presuntiva de *C. dubliniensis* (desarrollo a 45 °C, desarrollo en medio Staib y Agar Pal's). Una vez concluida la tipificación, los aislamientos fueron conservados en agua glicerinada (20%) a -20°C, hasta la evaluación de la capacidad de producción de biofilms.



Figura 5. Esquema de procesamiento de las muestras.

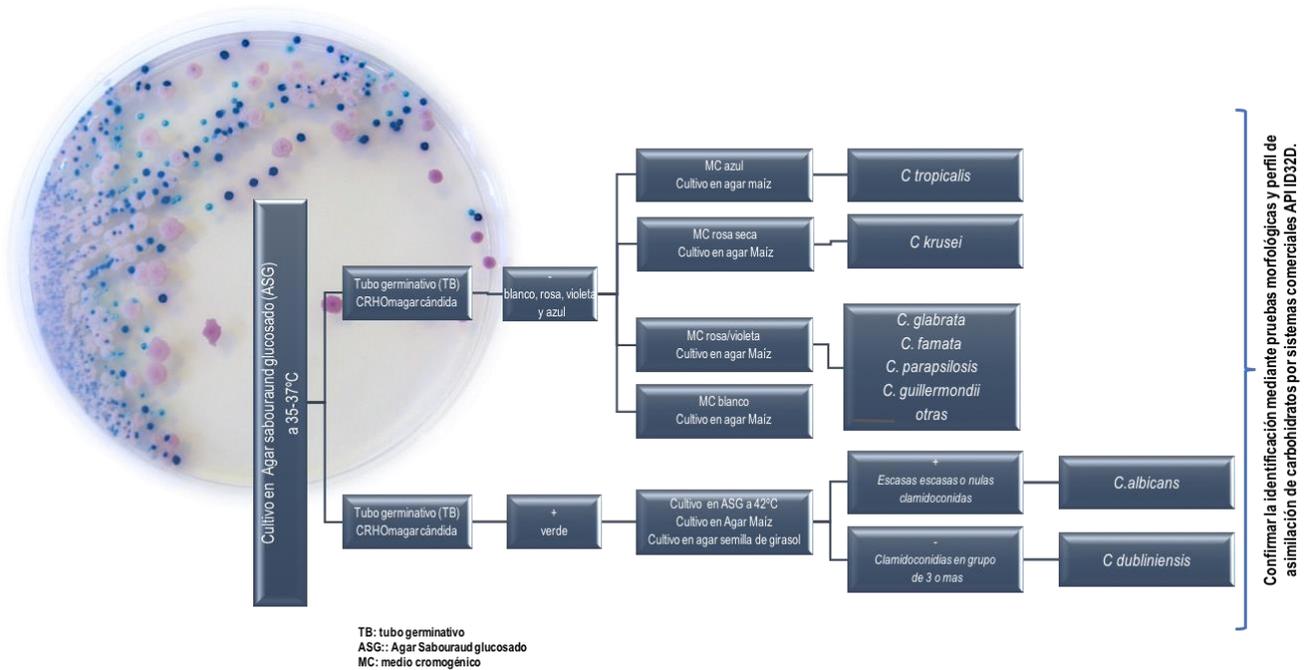


Figura 6. Algoritmo para la identificación de levaduras del género *Cándida*.

10.3.2 Producción de biofilm

Para el estudio de producción *in-vitro* de biofilm, se aplicó la técnica de Microtitulación en placas de poliestireno (42)(43)(44). El mismo se realizó en el laboratorio del Centro de Micología de la Facultad de Medicina-UBA.

Previo al procesamiento de las muestras, la técnica fue optimizada a partir de dos cultivos en fase estacionaria de las cepas ATCC 10231 de *C. albicans* (productora de biofilms) y la ATCC 90030 *C. glabrata* (no productora de biofilms). Una vez optimizada la misma, se procedió de igual manera con los aislamientos de *Candidas* procedentes de las secreciones vaginales problema.

Se utilizaron microplacas de 96 pocillos fondo plano (Greiner Bio-one cellstar®). En un primer paso se colocaron 100 ul de caldo YPD (Extracto de levadura 1% bacto-peptona 2% y glucosa 2%) en cada uno de los pocillos de la placa; luego, en los 8 pocillos de la primera columna (A1-H1), se agregaron 100

ul de agua destilada estéril (control de esterilidad del medio y blanco). A continuación, cada columna de la placa (2-12) fué utilizada para la siembra de una muestra fúngica (11 muestras en total por placa). Cada muestra se inoculó en 8 réplicas (se utilizaron los 8 wells de cada columna para sembrar la muestra estudiada), utilizando 100 ul del inóculo (10^7 cel/ml). Previo a la incubación, se realizó una lectura basal de la densidad óptica (DO) de cada uno de los pocillos (para asegurar la uniformidad de las siembras de los mismos) e inmediatamente las placas fueron llevadas a estufa a 37°C en agitación (100 rpm/min) durante 24 hs.

Transcurrido el tiempo de incubación estandarizado (24 horas), las placas fueron retiradas de la estufa. **Figura 6.** El contenido de los pocillos fue eliminado suavemente con una pipeta evitando levantar el biofilm formado y se procedió a realizar 3 lavados con 250 µl de solución salina a fin de eliminar los restos de medio de cultivo y células planctónicas. Seguidamente, las células fúngicas adheridas al fondo de los pocillos fueron teñidas a fin de poder visualizar los patrones de adhesión de las mismas a la superficie de las placas. Para este proceso, se siguieron las recomendaciones de una técnica estandarizada y descrita previamente (Merritt et al 2005). Brevemente, se adicionaron 250 ul de solución de cristal violeta al 0.1% a cada uno de los pocillos; luego, las placas fueron incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente al resguardo de la luz. Transcurrido este tiempo, se eliminó el colorante con pipetas y se realizaron tres nuevos lavados con 250 µl de solución salina a fin de eliminar el exceso de colorante que pudiese haber quedado retenido en los biofilms formados. Finalmente, los biofilms de cada pocillo fueron solubilizados mediante la adición de 250ul de etanol 96% y transcurridos unos minutos, se efectuó una nueva medición de las DO por espectrometría, a una longitud de onda de 595 nm. La DO

obtenida fue considera proporcional a la formación de biomasa o cantidad de biofilms.

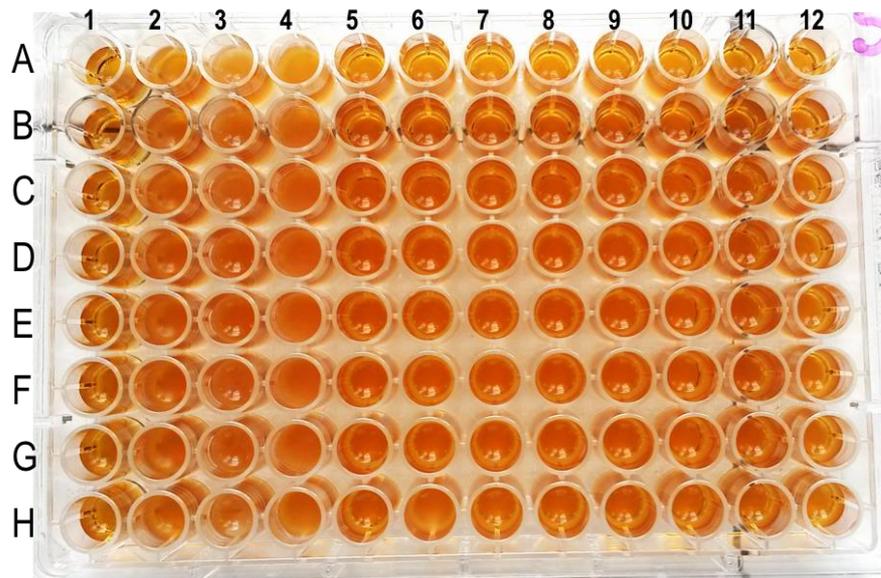


Figura 7. Fotografía de placa de microtitulación luego de 24 hs de incubación. Columna 1, control de esterilidad del medio; Columna 2 a 12, muestras inoculadas. Véase en la columna 4, la marcada opalescencia del medio de cultivo por abundante crecimiento fúngico.

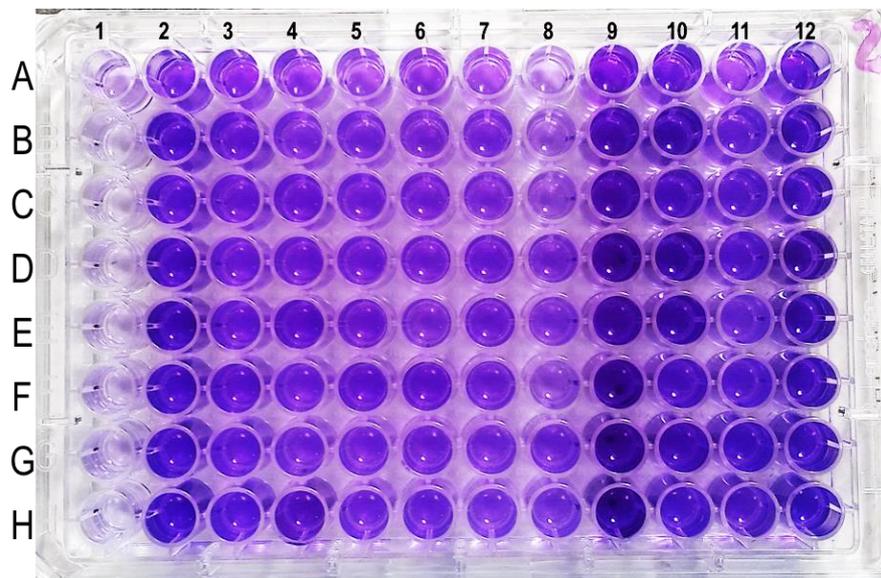


Figura 8. Imagen tomada de placa de microtitulación de uno de los experimentos realizados. Técnica de cuantificación de biofilm utilizando colorante cristal violeta. Columna 1, control de esterilidad (Blanco); Columnas 2 a 12, muestras fúngicas. En las columnas 1, 8 y 9 se puede observar a ojo desnudo la diferencia de intensidades de color de los biofilm coloreados.

10.3.3 Cuantificación de biofilm

Para la cuantificación de los biofilms, se empleó la metodología descrita por Stephanovic et al.(45) Se realizó la lectura de la DO a 595nm de los controles negativos y de las muestras, seguidamente se calculó la media de la densidad óptica (DO) de cada cepa individual. Con estos datos se procedió a definir un punto de corte (DO_c) para cada placa, aplicando la siguiente formula:

$$DO_c = XDO + 3 \cdot DS$$

Donde:

- DO_c es la densidad óptica definida como punto de corte.
- XDO es el promedio de las lecturas a 595 nm de DO de los controles negativos.
- DS es la desviación estándar de las lecturas de DO.

10.3.4 Clasificación de la capacidad de producción de biofilm

Las cepas estudiadas fueron clasificadas como no productoras, débilmente productoras, moderadamente productoras y fuertemente productora, teniendo en cuenta los criterios definidos en la **tabla 1**, de acuerdo a lo sugerido por *Stephanovic et al* (45).

Tabla 1. Clasificación de la capacidad de formación de biofilm para cepas de *Candida*, según criterios definidos por *Stephanovic et al.*

Clasificación	Criterio
No formadora de biofilm	<i>Si DO de la cepa en estudio es $\leq DOc$</i>
Formadora débil de biofilm	<i>Si la DO de la cepa en estudio es: $(DOc < DO \text{ cepa} \geq 2DOc)$</i>
Formadora Moderada de biofilm	<i>Si la DO de la cepa en estudio es: $(2DOc < DO \text{ cepa} \geq 4DOc)$</i>
Fuertemente formadora de biofilm	<i>Si la DO de la cepa en estudio es: $DO \text{ cepa} \geq 4DOc$</i>

DO: Densidad óptica, DOc: Densidad óptica del punto de corte, DO cepa: Densidad óptica de cada muestra estudiada

11 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos y los datos clínicos recolectados fueron analizados mediante el programa IBM SPSS Statistics versión 18.0.

Para establecer las fuerzas de asociación entre los factores predisponentes analizados y la candidiasis vulvovaginal se realizó el cálculo de odds ratio (OR), estimándose su precisión con un intervalo de confianza del 95%.

12 Resultados

Del total de muestras analizadas, el 19,9% (66/337) resultó positivo para el cultivo micológico. La distribución de frecuencia para las especies del género *Cándida* fue de 15,1% (51/337) para *C. albicans*, 3,3% (11/337) para *C. glabrata*, 0,9% (3/337) para *C. krusei* y 0,3% (1/337) para *C. dubliniensis* y *C. parapsilosis*. La distribución proporcional de estas mismas especies sobre los 67 aislamientos positivos puede verse en el **Grafico 1**.

En relación a la presencia de infecciones concomitantes (infecciones mixtas; entiéndase como la presencia de más de una especie del género *cándida* en la misma muestra evaluada), se observó un solo caso de portación conjunta de *C. albicans* y *C. parapsilosis complex*.

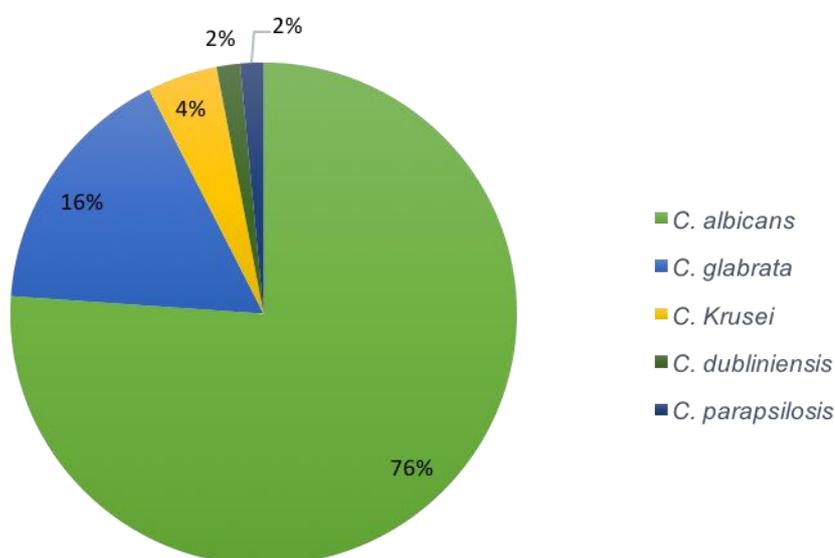


Grafico 1. Distribución proporcional de las especies del género *Cándida* aisladas en 66 muestras de mujeres pertenecientes al área de influencia del Centro de Salud de atención primaria "Alicia Moreau de Justo" – Villa Libertad de la ciudad de Resistencia, Chaco; durante el período febrero 2014-Enero 2015. (n muestral = 337 exudados vaginales).

En relación a la utilización de dispositivos intrauterinos como método primario de control de natalidad, el 20,8% (70/337) del total de mujeres estudiadas lo portaban al momento de la toma de muestra de secreción vaginal. Ver **Tabla 2** De estas, el 8,6% (6/70) resultó positivo para el cultivo micológico, encontrándose 4 casos de *C. albicans*, un caso de *C glabrata* y de *C krusei*, respectivamente.

Tabla 2. Distribución de los factores predisponentes analizados en función del cultivo micológico.

Factores predisponentes	Frecuencia (%)	Micológico positivo	Micológico negativo
Embarazo	173 (51,3%)	45 (26%)	128
DIU	70 (20.8%)	6 (8,6%)	64
ACO	58 (17,2%)	11(18,9%)	47
Preservativo	11(3,3%)	0(0%)	11
Ignorado	25(7,4%)	4(16%)	21
Total	337(100%)	66	271

DIU: dispositivo intrauterino. ACO: anticonceptivos orales

Tabla 3. Análisis de los factores predisponentes de candidiasis vulvovaginal estudiados en el presente trabajo (N muestral= 337 mujeres).

Factores predisponentes	OR (IC 95%)	Chi cuadrado con corrección de Yates (IC 95%)	p
Embarazo	2,394 (1,35-4,23)	8,5	0,0035
DIU	0,3234 (0,13-0,78)	5,9	0,0147
ACO	0,9532 (0,46–1,96)	0,002	0,9591

DIU: dispositivo intrauterino. ACO: anticonceptivos orales

La **tabla 3**, presenta un detalle de los distintos factores analizados que pudieran actuar como predisponentes para una infección por *Candida* en una mujer normal, en edad fértil y sin antecedentes específicos. De todos ellos, el embarazo es el único factor que presenta una clara asociación estadísticamente fuerte y significativa con la infección por estos agentes.

El estudio de producción de biofilm y cuantificación de los mismos, se realizó sobre 64 cepas del total de aislamientos; debido a que 3 de las cepas aisladas inicialmente correspondientes a la especie de *C. albicans* resultaron no viables tras su conservación a -20 °C.

La capacidad de formación de biofilms en las cepas estudiadas, mostró una gran variabilidad. Como se explicara anteriormente, su cuantificación, se basa en la lectura de la densidad óptica de los biofilms generados in-vitro, tras su coloración con cristal violeta 0,1% y posterior solubilización de los mismos en solución alcohólica. En el **gráfico 2** se muestra la distribución de las densidades ópticas observadas en las cepas analizadas. La variabilidad mencionada, se explica por el amplio rango de lecturas obtenidas a lo largo de la experiencia.

La **tabla 4** muestra los datos obtenidos en relación con la capacidad de producción de biofilm de las 64 cepas estudiadas, mientras que en la **tabla 5** se muestran los datos agrupados de cepas productoras de biofilm en función de especies de *Cándida* y *no Cándida*.

Todas las cepas aisladas de pacientes portadoras de DIU resultaron productoras de biofilm; tres cepas fuertemente formadoras, dos moderadamente formadora y una débilmente formadora.

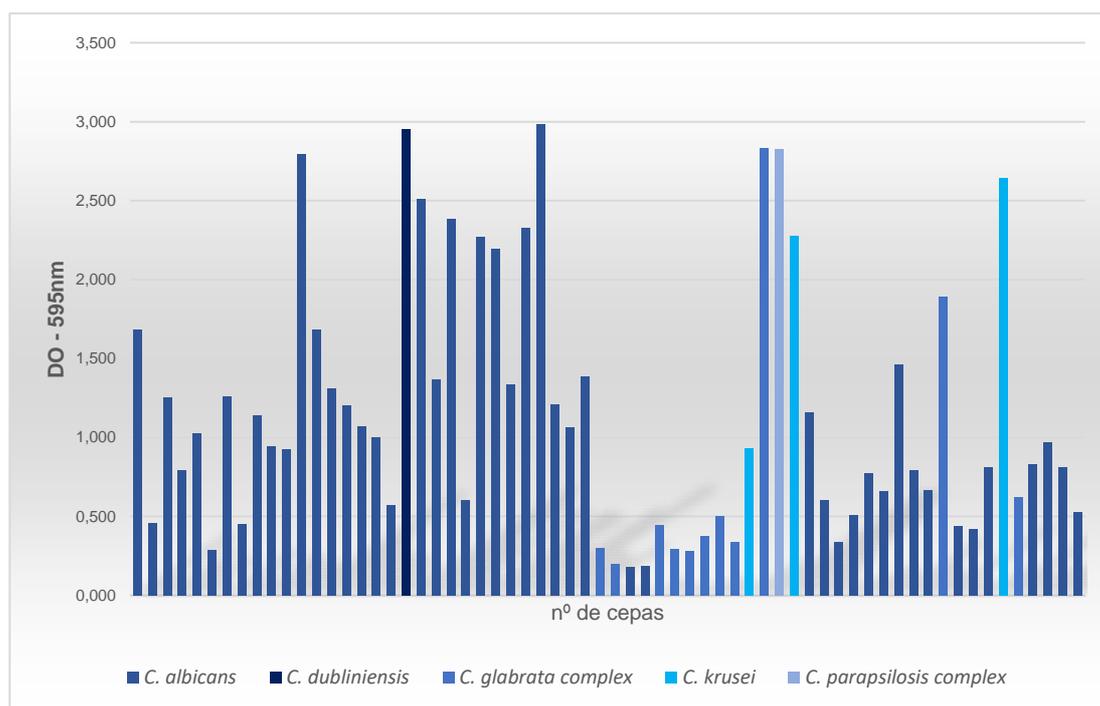


Grafico 2. Distribución de las densidades ópticas (DO) leídas a una longitud de onda de 595 nm de especies de *Cándidas* aisladas de mujeres con candidiasis vulvovaginal.

Tabla 4. Perfil de producción de biofilm en función de la especie de *Candida* involucrada en cada caso estudiado.

Especie	Nº Cepas	Capacidad de producción de biofilms			
		Formadora fuerte (%)	Formadora moderada (%)	Formadora Débil (%)	No formadora (%)
<i>C. albicans</i>	48	16 (33,3)	18 (37,5)	10 (20,8)	4 (8,3)
<i>C. glabrata complex</i>	11	2 (18,2)	1 (9,1)	1 (9,1)	7 (63,3)
<i>C. krusei</i>	3	2 (66,7)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)
<i>C. parapsilosis complex</i>	1	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. dubliniensis</i>	1	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	64	22 (34,4)	19 (29,7)	12 (18,8)	11(17,1)

Nota aclaratoria: Los porcentajes considerados en la tabla están calculados en base a cada especie y al total general. El 100% se obtiene sumando los porcentajes parciales de cada fila.

Tabla 5. Comparación de la capacidad de formación de biofilm entre cepas de *Candida albicans* y no *albicans*. Análisis realizado sobre los 64 aislamientos de *Cándida* obtenidos.

Especie	Alguna capacidad de producir biofilm N (%)	Ninguna capacidad de producir biofilm N (%)	Chi cuadrado con corrección de Yates (IC 95%)	p
<i>C. albicans</i>	44 (68,7)	4 (6,2)		
<i>C. no albicans</i>	9 (14,1)	7 (10,9)	8,2 (2,1-35,4)	0,0041

13 Discusión

Este estudio asumió como propósitos primarios, determinar la frecuencia y distribución de las especies de *Cándida* aisladas de pacientes con candidiasis vulvovaginal, evaluar su capacidad de formación de biofilms y contribuir con datos experimentales y estadísticos a establecer la probable existencia de asociación entre la capacidad de formación de biofilms y la presencia de DIU.

Hasta la fecha, la información disponible referida a la frecuencia de micosis en la República Argentina, es aún fragmentada y geográficamente limitada. Si bien, en los últimos años se han realizado grandes esfuerzos para mejorar el registro de eventos de infecciones fúngicas, a través del Sistema de Vigilancia laboratorial (SIVILA), todavía existe un marcado subregistro de las mismas.

La frecuencia y distribución de especies del género *Cándida* aisladas de pacientes con CVV en esta serie, coinciden en líneas generales con los datos reportados por otros investigadores del país y la región, siendo las especies que más frecuentemente se aislaron *C. albicans* y *C. glabrata* (46)(37)(47)(48)(49)(4). Nuestro reporte muestra que *C. albicans* se detecta en 3 de cada 4 muestras positivas para el género *Cándida*, siendo su preponderancia claramente notoria. No obstante, la proporción de aislamientos a expensas del resto de las especies no es menor ($\approx 25\%$), por lo que el diagnóstico etiológico de certeza resulta cada vez de mayor importancia. Esto último, fundamentalmente, teniendo en cuenta la diferencia en sensibilidad que pueden mostrar las diferentes especies frente a un mismo antifúngico utilizado en la quimioterapia. En este sentido, en la últimas décadas (particularmente desde la epidemia del SIDA) se sugiere a la comunidad médica, de manera cada vez más insistente, la solicitud de las pruebas de

sensibilidad antifúngica frente aislamientos de levaduras, en muestras de cultivo de distintos orígenes.

En nuestra serie, *C. parapsilosis* se aisló en una única muestra y de manera concomitante con *C. albicans*, considerándose a ambas especies como responsables de la CVV. Si bien el papel de *C. parapsilosis* complex como patógeno vaginal y su relevancia como agente etiológico de vulvovaginitis es cuestionado, numerosos investigadores han reportado su presencia y rol patogénico en las CVV. Este microorganismo se aísla con frecuencia de piel y uñas de las manos de enfermeras y otros profesionales del área de salud, de donde forma parte de la biota saprofita normal. No obstante, *C. parapsilosis* se encuentra asociado a una amplia gama de entidades clínicas que van desde infecciones superficiales hasta infecciones sistémicas que pueden llegar a comprometer la vida del paciente. A nivel de mucosa, la principal mucositis en la cual se encuentra involucrada es la CVV. Aparentemente, las cepas vaginopáticas de *C. parapsilosis* se caracteriza por producir una mayor cantidad de proteinasa aspártica, estas enzimas pueden ser responsables indirectas del compromiso de la integridad normal de la vagina, dado que de manera normal tienen la capacidad de hidrolizar a las moléculas de inmunoglobulina A de la mucosa, inactivándolas. Recordemos que la Inmunoglobulina A secretora (presente en mucosas) es una de las barreras inmunológicas mas efectivas contra la infección (48)(50)(51).

De las demás especies observadas en los aislamientos de este trabajo, destacamos el hallazgo de *C. dubliniensis* en una de las muestras analizadas. Si bien esta especie fué aislada inicialmente de cavidad oral, por Sullivan y cols (52) en el año 1995, estudios posteriores han reportado su recuperación a partir de muestras provenientes de diferentes sitios anatómicos (tracto respiratorio, sangre, sistema nervioso central, vagina, orina, piel y heces) (53)(54)(55).

En Argentina, la prevalencia de *C. dubliniensis* aún no ha sido evaluada de manera sistemática, siendo la información referida a esta levadura también escasa en otros países de América del Sur. En relación a su hallazgo en muestras provenientes de exudados vaginales, solo algunos investigadores han reportado su aislamiento en este nicho ecológico, lo que podría atribuirse, al menos en parte, al hecho de que la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* no se realiza de rutina en los laboratorios microbiológicos para el diagnóstico de CVV. Ambas especies se encuentran estrechamente relacionadas filogenéticamente; comparten características morfológicas, fisiológicas y presentan patrones bioquímicos similares, pero difieren en los niveles de resistencia al fluconazol y en la capacidad de causar infección. Dicha similitud, ha conducido en muchas ocasiones a una identificación errónea de *C. dubliniensis* como *C. albicans* y viceversa, lo cual puede verse reflejado en los trabajos realizados por Theill y col. (56) y Perurena y col. (57). Ambos grupos de investigadores analizaron colecciones de cepas procedentes de muestras vaginales inicialmente identificadas como *Candida albicans*. Theill y col., sobre una colección de 287 cepas reanalizadas mediante la aplicación de técnicas moleculares, encontraron una frecuencia de 1,39% de *C. dubliniensis* y de 0,35% de *C. africana*. Por otro lado, Perurena y col., detectaron un 11,3% de cepas de *C. dubliniensis* en un total de 115 cepas reanalizadas, evaluando el tipo de clamidoconidia producida y la capacidad de crecimiento a 42°C.

La presencia de infecciones mixtas fue observada en un único caso en el total de muestras estudiadas. Resultó en un hallazgo de infección concomitante de *C. albicans* y *C. parapsilosis*, la cual puede ser detectada gracias a la utilización de medios de cultivo cromogénicos. Aunque típicamente estas especies se observan de color blanco en CHROMagar™ *Candida*, se ha descrito la aparición de dos cepas de *C. orthopsilosis* con una pigmentación rosada en este medio, la

cual podría confundirse con *C. glabrata* si no se realizan pruebas complementarias correspondientes. Si bien estos medios suelen ser de gran utilidad en la detección de infecciones originadas por más de una especie de *Candida* y han significado un gran avance en las herramientas disponibles para el diagnóstico micológico; es importante recalcar que solo ayudan en la detección y diferenciación (presuntiva) de las levaduras, cuando las especies involucradas exhiben diferentes coloraciones en el medio cromogénico utilizado. Esto constituye una importante limitación práctica al momento de diferenciar, por ejemplo, infecciones mixtas ocasionadas por *C. dubliniensis* de *C. albicans*, dado que presentan una coloración similar en los medios cromogénicos habitualmente empleados y/o disponibles en el mercado.

En la mujer en edad fértil, la principal fuente de levaduras para el desarrollo de una CVV resulta ser su propia vagina, debido a la presencia de *Candida* como saprofito de la microbiota vaginal. Habitualmente, cuando estos microorganismos se encuentran como colonizantes, exhiben una baja carga fúngica; sin embargo, modificaciones del microambiente vaginal propician su proliferación y conversión a levaduras con mayor capacidad patogénica (58). Con respecto a los factores predisponentes analizados, en nuestro estudio en particular, solo el embarazo presentó asociación fehaciente con la CVV ($p < 0,005$), no así el uso de anticonceptivos orales y DIU. Esto puede ser una limitación propia del tamaño muestral, y quizás una muestra un poco más abarcativa refleje más claramente la situación real de la interacción. Estos hallazgos, más allá de las aclaraciones del análisis estadístico, apoyarían la hipótesis de que la CVV sería una patología estrógeno dependiente (16)(17)(59). Si bien existen trabajos que sugieren que el uso de métodos anticonceptivos locales como el DIU y el uso de preservativos, se encuentran relacionados con la infección por *Candida*, en nuestro estudio en

particular, este factor no demostró asociación con la presentación de CVV (19)(20).

Las levaduras del género *Candida* pueden expresar varios factores de virulencia que le permiten colonizar al huésped y ocasionarle daño. Así, los factores de virulencia expresados o requeridos por estos microorganismos, pueden variar según la especie de *Candida* involucrada, el sitio de infección y la naturaleza de las defensas del huésped (58)(59)(60)(61).

El estudio de biofilms y los mecanismos que controlan su formación, es uno de los campos de la microbiología que ha experimentado un mayor avance durante los últimos años. La existencia de numerosas metodologías y modelos de sistemas para el estudio de los mismos, han permitido no solo un mejor conocimiento de sus características, sino la comprensión de su complejo comportamiento in vivo y el impacto que pudiera tener sobre la terapia antifúngica. En su trabajo de revisión, *Coenye & Nelis* (42); realizaron un análisis global de varios modelos de sistemas in vitro e in vivo exponiendo sus ventajas y desventajas. De igual manera que otros investigadores, *Coenye & Nelis* concluyeron que, en general, la información obtenida a partir de sistemas in vitro no siempre es extrapolable a la situación in vivo, lo cual de alguna manera resulta absolutamente lógico (62)(63). Es casi imposible considerar en un modelo in vitro, la innumerable cantidad de variables que interaccionan en un hospedero vivo, pero claramente es una de las mejores herramientas de comprensión que tenemos disponibles.

Aunque a menudo, son considerados demasiado simplistas, los modelos in vitro, han contribuido en gran medida al conocimiento actual de la fisiología de los biofilms, resultando fundamentales para abordar cuestiones básicas, vinculadas al proceso de su formación y al conocimiento de su fisiología y arquitectura. En la

actualidad, estos modelos se utilizan ampliamente para estudiar el papel de los diferentes genes implicados en la formación del biofilm y los procesos de regulación que intervienen en el mismo, como así también, para la evaluación de diferentes agentes antimicrobianos.

Uno de los objetivos específicos que nos planteamos en el presente trabajo, fue justamente determinar la capacidad de formación de biofilm de las levaduras del género *Candida* y determinar la existencia de asociación entre la capacidad de formación de biofilm y la presencia DIU. Para esto, se aplicó la técnica de microtitulación en placas de poliestireno, utilizándose para su cuantificación el método colorimétrico descrito por *Stephanovicy col.* (45). A partir de la metodología aplicada, pudo observarse que, la formación de estas complejas estructuras mostró una gran variabilidad, tanto entre cepas pertenecientes a la misma especie fúngica, como entre especies diferentes. Esta situación nos estaría indicando, en principio, que este factor de virulencia; no se restringiría a una especie en particular, aunque algunas de ellas, por naturaleza, lo posean.

En general, se observó un 34,4% de cepas con capacidad formadora fuerte de biofilms; un porcentaje más que importante teniendo en cuenta que la cantidad de aislamientos del género *Candida*, representó el 19,9% del total en las muestras estudiadas.

Analizando el total de aislamientos estudiados, pudimos observar que el 82,9% de las cepas fueron productoras de biofilms en mayor o menor medida y sólo el 17,1% no fueron capaces de hacerlo. Esto implica, que si consideramos las cepas fuertemente formadoras, las moderadas formadoras y las débiles formadoras, un abrumador 82,9% de las levaduras identificadas son capaces de

producir esta compleja estructura biológica; la cual, es responsable en muchos casos de fracaso terapéutico y/o afecciones crónicas o recurrentes.

Considerando solo las especies mayormente aisladas (*C albicans* y *C glabrata complex*), la primera de ellas es la que se destaca como formadora fuerte de biofilms (ver **tabla 4**). Este dato es importante, teniendo en cuenta que además es la especie más frecuentemente aislada. Visto de otro modo, y siempre considerando las dos especies más frecuentes, *C albicans* presentó en el 91,8% de los casos alguna capacidad para formar biofilm, en tanto que *C glabrata complex* solo lo hizo en el 36,4% de sus aislamientos. Analizando la capacidad de formación de biofilms de *C albicans* respecto de las especies no *albicans*, en este trabajo hallamos una diferencia estadísticamente significativa en relación a la capacidad de formación. (ver **tabla 5**).

En relación a las cepas aisladas de pacientes que presentaban DIU, no puedo establecerse relación estadísticamente significativa entre la presencia de DIU y la capacidad de formación de biofilms, debido a que el número reducido de cepas recuperadas de estas pacientes, resulta insuficiente para establecer asociaciones con fortaleza estadística. Si bien *Farinati* y otros investigadores consideran que el DIU, al igual que otros dispositivos médicos constituyen un blanco perfecto para el desarrollo de biofilms, dicha correlación no pudo observarse en el presente trabajo (20)(18)(64)(65). Posiblemente, esto pueda deberse a que, la presencia de cobre como parte estructural de estos dispositivos, inhiba el desarrollo de las comunidades microbianas como resultado de la acción microbicida que exhibe el ion cobre, disminuyendo, en consecuencia, la colonización por parte de *Candida* en estas pacientes (66)(67)(68).

En los últimos 20 años, lentamente pero de manera continua, la micología ha ido madurando y fortaleciéndose. Ya no resulta lógico ni coherente realizar un

diagnóstico micológico por defecto y de manera empírica. La comunidad médica ha ido tomando conciencia de que los hongos son entidades de especial cuidado, y una de las lecciones más contundentes la dio el complejo manejo de estas enfermedades en pacientes inmunocomprometidos. La microbiología, en su contexto global, también ha sabido cederle a esta especialidad el lugar y la atención que merecen. El diagnóstico micológico requiere un conocimiento profundo de los complejos mecanismos de interacción con el huésped y no solo de un acabado y fino manejo técnico para su identificación en el laboratorio. Los hongos son entidades eucariotas, con una fisiología y fisiopatología mucho más intrincada que los virus o bacterias y son causa cada vez más frecuente de mortalidad. Este trabajo, si bien ha tenido objetivos técnicos bien definidos y acotados, también intenta ser una herramienta de concientización sobre la importancia de que la micología y el diagnóstico micológico se introduzcan de lleno y sin dubitaciones en la práctica de la medicina basada en la evidencia.

14 Conclusiones:

1. La identificación rápida y correcta de levaduras patógenas es uno de los objetivos a alcanzar para el manejo adecuado del paciente, especialmente para el control de la infección fúngica. La incorporación de metodologías modernas basadas en técnicas moleculares y proteómica que permitan discriminar cepas de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, como así también, a las integrantes de los complejos de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* ofrecen una alternativa interesante a utilizar para esta finalidad.
2. Conocer la epidemiología local, contribuye a evitar el uso irracional de antifúngicos y a la elección de la terapia empírica adecuada.
3. Existen factores predisponentes, como el embarazo, que de diversas maneras contribuyen a que la infección por especies del género *Candida* sea más propensa a desarrollarse. Debe tenerse siempre presente esta condición al momento del examen clínico de las mujeres grávidas.
4. La capacidad de formación de biofilm se asocia con la patogenicidad de un microorganismo y como tal, debe ser considerado como un importante factor de virulencia. La ventaja que ofrece este tipo de asociación de microorganismos, además de la colonización de los tejidos del huésped, es la expresión de características de virulencia, cooperación metabólica, captura eficiente de nutrientes, comunicación célula-célula e intercambio de material genético, lo que provee una considerable ventaja ecológica ya que otorga protección contra los agentes antimicrobianos y/o biológicos.
5. La capacidad de las levaduras del género *Candida* para generar un biofilm es multifactorial y en líneas generales podemos decir que depende del sitio de infección, de la especie y cepa involucrada y del microambiente en que se desarrolla. Según lo observado en el presente trabajo, este atributo de

virulencia no se encuentra restringido a una especie de *Candida* en particular, si bien *Cándida albicans* pareciera tener una mayor capacidad formadora.

6. Si bien los sistemas *in-vitro* utilizados en este trabajo para el estudio de los biofilm presentan ciertas limitaciones; por otro lado, permiten el procesamiento de un gran número de muestras de manera simultánea (ideal como técnica de cribado), proporcionando facilidad para ensayar diversos parámetros físico-químicos y bioquímicos, estudiar la actividad de agentes antimicrobianos y desde el punto de vista genómico, analizar en las cepas que conforman el biofilm (*in-situ*) los genes implicados en el proceso de regulación y formación del mismo.
7. El diagnóstico micológico requiere un conocimiento profundo de los complejos mecanismos de interacción con el huésped y no solo de un acabado y fino manejo técnico para su identificación en el laboratorio. Los hongos son entidades eucariotas, con una fisiología y fisiopatología mucho más intrincada que los virus o bacterias y son causa cada vez más frecuente de mortalidad. Este trabajo, si bien ha tenido objetivos técnicos bien definidos y acotados, también intenta ser una herramienta de concientización sobre la importancia de que la micología y el diagnóstico micológico se introduzcan de lleno y sin dubitaciones en la práctica de la medicina basada en la evidencia.
8. Finalmente, resaltamos el enorme valor que tiene el estudio de los hongos patógenos. Conocer y entender más claramente uno de sus mecanismos de patogénesis ha sido el aporte generado por este trabajo.

15 Bibliografía

1. Tapia C. Candidiasis Vulvovaginal. Rev Chile Infectol. 2008;25(4):2008.
2. Ricardo Negroni Micolog L. Papel de la Micología y de los micólogos en la Dermatología. Available from: www.dermatolarg.org.ar/index.php/dermatolarg/article/download/1306/693.
3. Pimentel Sarzuri Beatriz y Reynolds M E. CANDIDIASIS VAGINAL. Rev Paceaña Med Fam. 2007;4(6):121–7.
4. Mintz JD, Martens MG. Prevalence of Non- Albicans Candida Infections in Women with Recurrent Vulvovaginal Symptomatology. 2013(December 2013):238–42.
5. Sardi, J. C.; Scorzoni L.; Bernardi T.; Fusco Almeida M y MGMJS. Candida species : current epidemiology , pathogenicity , biofilm formation , natural antifungal products and new therapeutic options. J Clin Microbiol. 2013;62:10–24.
6. Bautista Samperio L RRA. Vulvovaginitis : perspectivas etiológicas y epidemiológicas Vulvovaginitis : Etiological and Epidemiological Perspectives. Red Rev Cient Am Lat el Caribe España y Port. 2011;13(4):139–42.
7. Wira CR, Rodriguez-garcia M, Patel M V. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. Rev Nat - Inmunol. 2015;15:217–30.
8. Nobile CJ, Johnson AD. Candida albicans Biofilms and Human Disease. Annu Rev Microbiol [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Sep 15];69:71–92. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4930275&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
9. Doménech A, Gibello A, Collado VM, Porrás R, Blanco M. EL SISTEMA INMUNE INNATO II: LA PRIMERA RESPUESTA FRENTE A LA

- INFECCIÓN THE INNATE IMMUNE SYSTEM II: FIRST RESPONSE AGAINST INFECTION. *Rev Complut Ciencias Vet.* 2008;2(1):17–30.
10. Romani L. IMMUNITY TO FUNGAL INFECTIONS. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(January):1–13.
 11. Underhill DM, Iliev ID. The mycobiota : interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Publ Gr [Internet].* 2014;14(6):405–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3684>
 12. Netea MG, Joosten LAB, Meer JWM Van Der, Kullberg B. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Publ Gr [Internet].* 2015;(September). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3897>
 13. Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* Interactions with Bacteria in the Context of Human Health and Disease. 2010;6(4):6–9.
 14. Duque C, Gómez B, Uribe O, Alarcón J, Soto F, Uran L, et al. Caracterización de la candidiasis vulvovaginal en mujeres de la ciudad de Medellín , Colombia. *Nova- Publ Cient en Ciencias Biomed.* 2009;7(12):157–60.
 15. Reynaud AC. infecciones vaginales por candida: Diagnostico y Tratamiento. *Rev Per Ginecol Obs.* 2007;53:159–66.
 16. Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol [Internet].* 2015 Dec 21 [cited 2016 Aug 6];7828(December 2015):1–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26690853>
 17. Cassiana Aparecida Alvares, Terezinha Inez Estival Svidzinski MELC. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *J Bras Patol Med Lab.* 2007;43(5):319–27.
 18. Auler ME, Morreira D, Rodrigues FFO, Abr Ao MS, Margarido PFR, Matsumoto FE, et al. Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Med Mycol [Internet].* 2010 Feb [cited 2016 Aug 6];48(1):211–6. Available from:
-

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20055746>
19. Chassot F, Negri MFN, Svidzinski AE, Donatti L, Peralta RM, Svidzinski TIE, et al. Can intrauterine contraceptive devices be a *Candida albicans* reservoir? *Contraception* [Internet]. 2008 May [cited 2016 Aug 6];77(5):355–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18402852>
 20. Lal P, Agarwal V, Pruthi P, Pereira BMJ, Vikas MRK. Biofilm formation by *Candida albicans* isolated from intrauterine devices. *Indian J Microbiol*. 2008;48:438–44.
 21. Paniagua-contreras GL, Monroy-pérez E, Pineda-olvera J, Negrete-abascal E, Vaca-pacheco S. Caracterización genotípica de cepas de *Candida albicans* aisladas de la mucosa oral y vaginal de pacientes inmunocomprometidos. *Rev Med Hosp Gen Mex*. 2010;73(2):94–101.
 22. Laura Estela Castrillón Rivera, Alejandro Palma Ramos CPD. Artículo de revisión Factores de virulencia en. *Dermatología Rev Mex*. 2005;(49):12–27.
 23. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* [Internet]. 2013 Feb 15 [cited 2015 Apr 17];4(2):119–28. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3654610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 24. Romero Luévano, Angel G., Araiza Santibáñes Javier, Hernández Marco A., Cerón Araiza Marcela, Hernández Guzmán Verónica A., Ponce María R. BA. Candidosis mixtas en aislamientos clínicos de pacientes procedentes del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga; identificación e importancia. *Dermatol Rev Mex*. 2014;58:239–46.
 25. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida M, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2016 May 11];62(Pt 1):10–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180477>
-

26. Bonifaz-muñoz K, Aurora P, Rojo C, Daniel L, Cerna Z. FRECUENCIA DE INFECCIÓN POR *Chlamydia trachomatis* EN PACIENTES QUE ACUDIERON A CONTROL DE PAPANICOLAOU EN UN HOSPITAL GENERAL DE ICA , 2011 FREQUENCY OF INFECTION BY *Chlamydia trachomatis* IN PATIENTS WHO WENT TO SMEAR TEST CONTROL IN A GENERAL HOSPITAL OF. *Rev Med Panacea*. 2012;2(1):16–9.
27. Calderone RA, Fonzi WA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. 2001;9(7):327–35.
28. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011 Aug 16 [cited 2015 Oct 15];9(10):737–48. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2636>
29. Gow NAR, Veerdonk FL Van De, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2011;10(2):112–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2711>
30. Wilson D, Naglik JR, Hube B. The Missing Link between *Candida albicans* Hyphal Morphogenesis and Host Cell Damage. 2016;1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005867>
31. Castrillo Rivera Laura E., Palma Ramos Alejandro PDC. Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermatologia Rev Mex*. 2005;49:12–27.
32. De la Calle Rodriguez, Natalia; Santa Velez, Catalina; Cardona Castro N. Factores de virulenci para la infeccion de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *rev CES Med*. 2012;26(1):43–55.
33. Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2002;3(12):918–32. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg948>
34. Araújo D, Henriques M, Silva S. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. *Trends Microbiol* [Internet]. 2017;25(1):62–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.004>
35. Cuéllar-Cruz M, López-Romero E, Villagómez-Castro JC, Ruiz-Baca E.

- Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2016 Aug 6];7(6):755–71. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0>
36. Cecilia Ruiz A, Milena Calderón D, Enrique Gómez J. Variabilidad molecular de aislamientos de *Candida* spp. por la técnica de polimorfismos de ADN amplificados aleatoriamente (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) en mujeres de Armenia, Colombia. *Infectio* [Internet]. 2009 Mar [cited 2016 Sep 15];13(1):21–35. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0123939209701407>
 37. García-figueroa RB, Araiza-santibáñez J, Basurto-kuba E, Bonifaz-trujillo A. *Candida glabrata*: un oportunista emergente en vulvovaginitis. *Cir Cir*. 2009;77(6):455–60.
 38. *Microbiol R*. *Candida parapsilosis* complex. 2015;32(5):569–70.
 39. Zhu Y, Shan Y, Fan S, Li J, Liu X. *Candida parapsilosis sensu stricto* and the closely related species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in vulvovaginal candidiasis. *Mycopathologia* [Internet]. 2015 Feb [cited 2016 Sep 15];179(1–2):111–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25322705>
 40. Galán F, García-Agudo L, Guerrero I, Marín P, García-Tapia A, García-Martos P, et al. [Evaluation of mass spectrometry for the identification of clinically interesting yeasts]. *Enfermedades Infecc y Microbiol clínica* [Internet]. 2014 [cited 2016 Aug 6];33(6):372–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25444360>
 41. Buscemi L, Arechavala A y NR. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas , sexualmente activas , con especial referencia a la candidiasis , en pacientes del hospital de infecciosas Francisco J . Muñiz. *Rev Iberoam Micol*. 2004;(21):177–81.
 42. Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial bio fi lm formation. *J Microbiol Methods*. 2010;83(2):89–105.
-

43. Taff HT, Nett JE, Andes DR. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. *Med Mycol.* 2011;1–5.
44. O'Toole G a. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp* [Internet]. 2011 Jan [cited 2016 Feb 18];(47):3–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3182663&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
45. Ranin L, Svabic M, Stepanovic S. Biofilm formation by *Salmonella* spp . and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. 2004;428–32.
46. Prevalencia de especies de *Candida* en vulvovaginitis de embarazadas Rojas, Florencia; Gomez, Verónica; Sosa, María; Quevedo, Marta; Mangiaterra, Magdalena; Toma Vanacore, Sergio; Giusiano, Gustavo. 2008;(3400):5400.
47. Arechavala AI, Bianchi MH, Robles AM, Santiso G. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. *Rev Iberoam Micol.* 2007;24:305–8.
48. Agatensi L, Franchi F, Mondello F, Bevilacqua RL, Ceddia T, Bernardis F De. Vaginopathic and proteolytic *Candida* species in outpatients attending gynaecology Vaginopathic and proteolytic *Candida* species in outpatients attending a gynaecology clinic. 1991;(September 2017).
49. Giusiano G, Rojas F, Toma-Vanacore S, Mangiaterra M. [Frequency and antifungal profile of *Candida* isolated from vaginal exudates of preadolescent girls]. *Enfermedades Infecc y Microbiol clínica* [Internet]. 2002 [cited 2016 Sep 19];27(7):428. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19403204>
50. Gonzalez EG, González GM. *Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante. *Med Mycol.* 2012;14(56):157–65.
51. Powell AM, Gracely E, Nyirjesy P. Non- *albicans* *Candida* Vulvovaginitis : Treatment Experience at a Tertiary Care Vaginitis Center. 2016;(January 2011):85–9.
52. Sullivan D, Coleman D, Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis* :

- Characteristics and Identification MINIREVIEW *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. 1998;36(2).
53. Pineda G, Scollo K, Santiso G, Lehmann E, Arechavala A. Aislamientos de *Candida dubliniensis* de distintos materiales clínicos . Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación con *Candida albicans*. Rev Argentina Microbiología. 2008;40:211–7.
54. G BMZCBG. Comunicación breve Análisis de métodos fenotípicos para la diferenciación de *Candida dubliniensis* y *Candida albicans* . Propuesta de una secuencia de identificación . 2011;138–49.
55. *C. dubliniensis* C, *C. albicans* C, Yorio VP. *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*: patógenos orales oportunistas fenotípicamente y filogenéticamente relacionados. 2006;36–41.
56. Theill L, Dudiuk C, Morano S, Gamarra S, Elena M, Méndez E, et al. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. Rev Argentina Microbiología. 2015;48(1):43–9.
57. Mayda Rosa PerurenaLancha, , Carlos Manuel Fernandez Andreu, Gerardo Martinez Machin DML y EAVR, Fernández M, Machín GM. *Candida dubliniensis*: necesidad de establecer un diagnóstico correcto. Rev Cuba Med Trop. 2006;58(3):261–3.
58. Harriott MM, Lilly E a, Rodriguez TE, Fidel PL, Noverr MC. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. Microbiology [Internet]. 2010 Dec [cited 2016 Aug 6];156(Pt 12):3635–44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3068702&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
59. Fosch S, Fogolín N, Azzaroni E, Pairetti N, Ana LD, Minacori H, et al. Vulvovaginitis : correlación con factores predisponentes , aspectos clínicos y estudios microbiológicos. Rev Argentina Microbiol. 2006;38:202–5.
60. Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. Curr Opin
-

- Microbiol. 2011;14(4):380–5.
61. Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. Microbiology [Internet]. 2003 Feb [cited 2016 Sep 15];149(Pt 2):353–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12624197>
 62. Otto M and SJH. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. Chem Biol. 2012;19(12):1503–13.
 63. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. Pathogens. 2013;2:288–356.
 64. Farinati A, Semeshchenko D. ENDOCERVICAL BIOFILMS IN WOMEN WITH ENDOGENOUS INFECTIONS IN THE LOWER GENITAL TRACT: IN VITRO STUDYthe lower genital tract: in vitro study. DST - J bras Doenças Sex Transm. 2013;25(4):190–5.
 65. Zahran KM, Agban MN, Ahmed SH, Hassan E a, Sabet M a. Patterns of *Candida* biofilm on intrauterine devices. J Med Microbiol [Internet]. 2015 Apr [cited 2016 Aug 6];64(Pt 4):375–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25681320>
 66. Belén Provenzano DSC. Métodos anticonceptivos- Guía práctica para profesionales de la salud. 2014. p. 1–289.
 67. Gronemeyer GF-CC life. Cobre - Salud, medio ambiente y nuevas tecnologías. p. 1–126.
 68. Anduaga LSS-ES. Antisépticos y desinfectantes. Dermatología Peru. 2005;15(2):82–103.