



Análisis de la formación de Biopelícula en aislamientos de *C. albicans* causantes de Candidiasis vulvovaginal recurrente en un laboratorio clínico de referencia en Bogotá

Julián Esteban Muñoz Henao PhD 1 , Claudia Rocio Sierra Parada M.Sc 2, Jennifer Carolina Gutiérrez Suarez M.Sc 3, Daniela Alejandra Lindarte Celis 3 , Jeimmy Alexandra Molano Aponte 3, Jessica María Montes Castillo 3

1 Universidad del Rosario grupo Micros, 2 Laboratorio Clínico Sanitas Central de referencia, 3 Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Grupo REMA

Candidiasis vulvovaginal recurrente

3 o más episodios de infección sintomática de vaginitis por *Candida* en un periodo de 12 meses

C. albicans

Problema de salud pública

Alta prevalencia e incidencia

Al 2018 la prevalencia en Colombia de CVVR por 100.000 mujeres es de **4110**

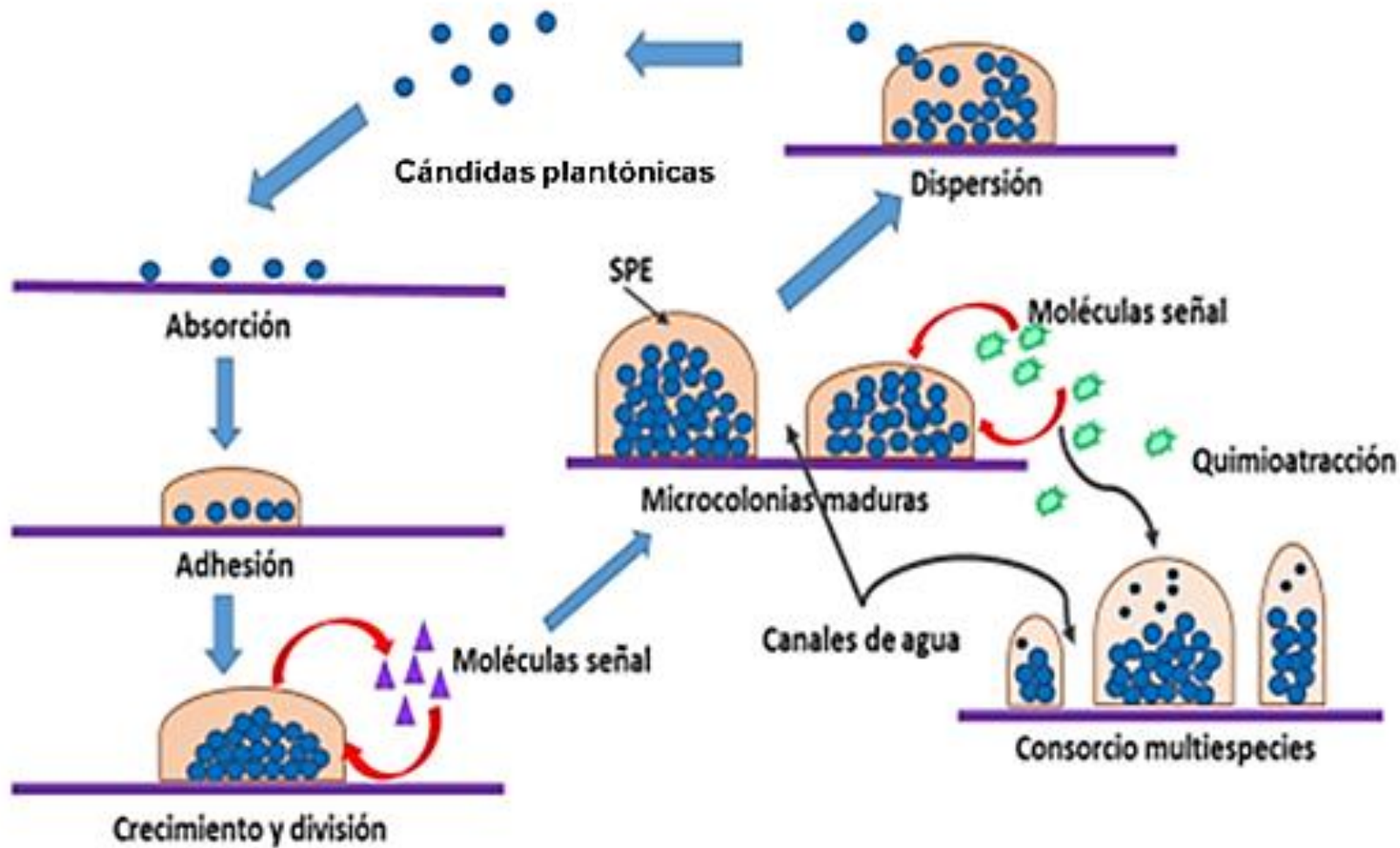
Mecanismos de persistencia

Formación de biopelícula



Denning D, Kneale M, Sobel J, Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review.

Formación y mantenimiento de biopelícula



- Adhesión
- Crecimiento
- Maduración

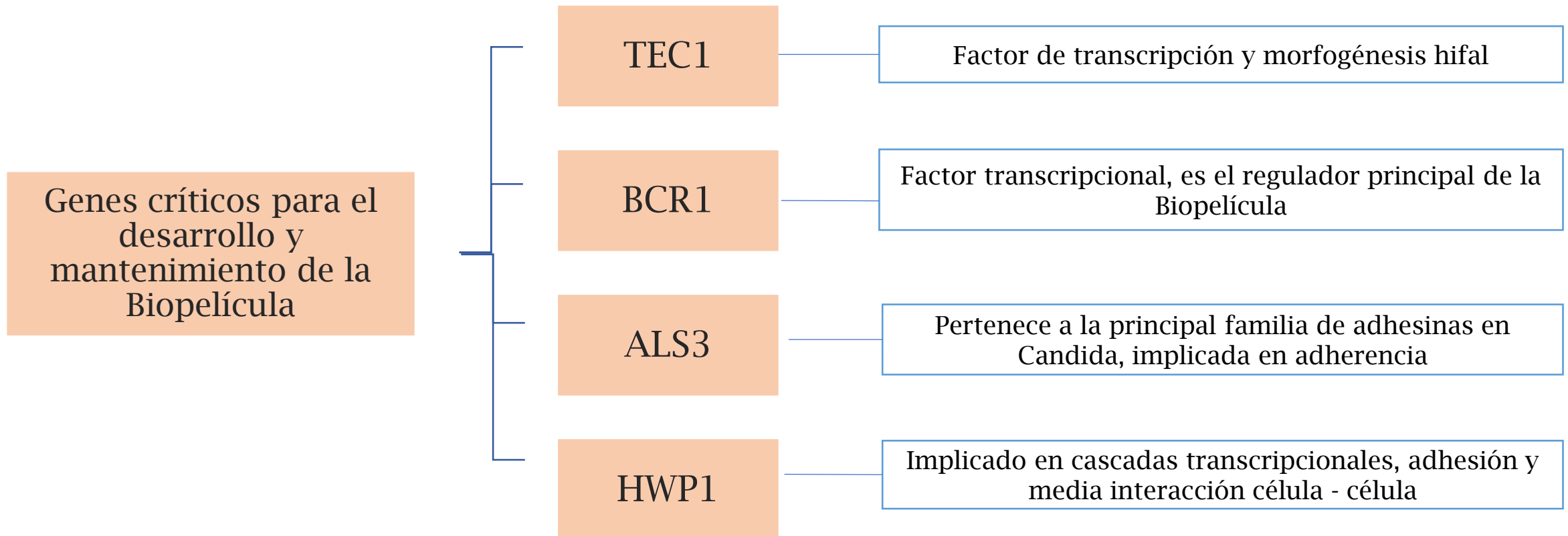
Figura 3. Formación de biopelícula, tomado de: HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS PARA MECANISMOS DE RESISTENCIA EN *Candida albicans*. Gladys Pinilla. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Genes involucrados en la formación y mantenimiento de la biopelícula

Regulado por la expresión de diversos genes



Aprox 325 genes



Objetivos

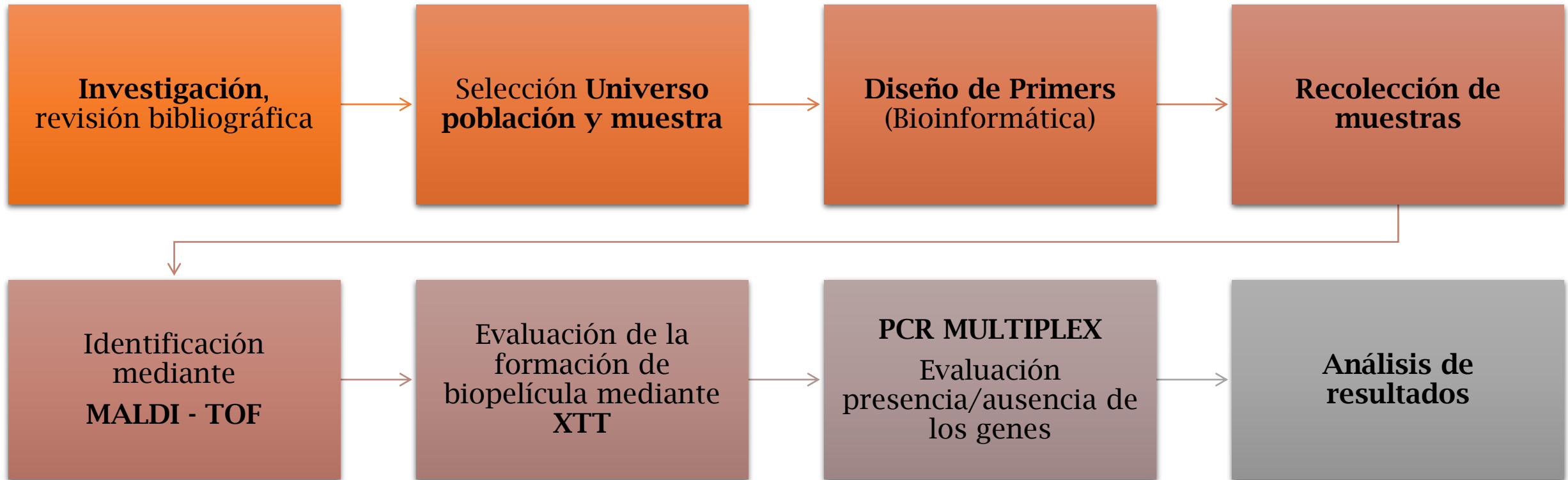
Objetivo general

Analizar la formación de Biopelícula en aislamientos de *C. albicans* causantes de Candidiasis vulvovaginal recurrente en un laboratorio clínico de referencia en Bogotá

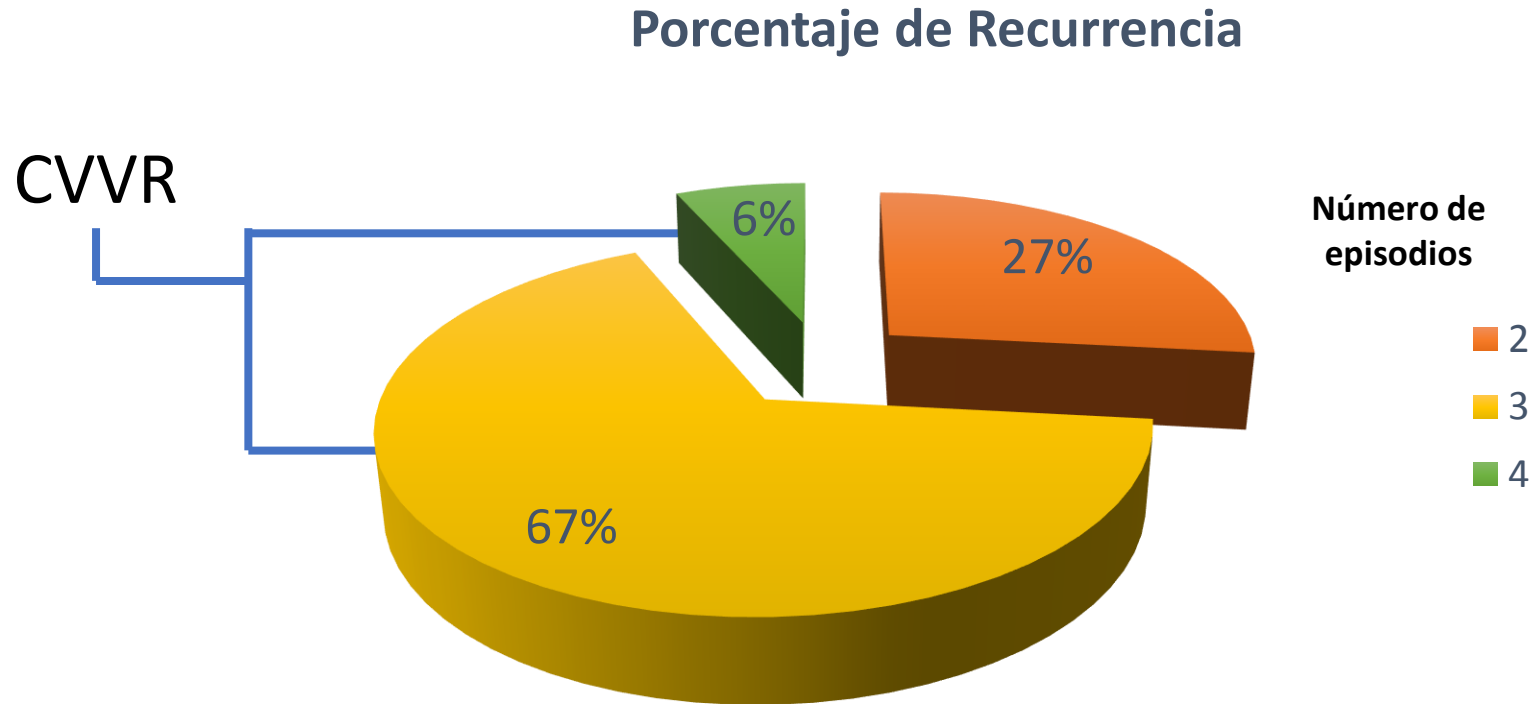
Objetivos específicos

- Identificar aislamientos clínicos de CVV y CVVR procedentes de un laboratorio clínico de referencia utilizando MALDI-TOF.
- Determinar la capacidad de formación de biopelícula para los aislamientos clínicos de CVV y CVVR por medio de la técnica de XTT.
- Relacionar la formación de biopelícula con la presencia o ausencia de los genes HPW1, BCR1, ALS3, TEC1 amplificados por medio de PCR Multiplex en los aislamientos clínicos procesados.
- Analizar los resultados teniendo en cuenta las características demográficas de la muestra poblacional procesada.

Diseño Metodológico Estudio descriptivo



Resultados y Discusión



1

Técnica
MALDI-TOF

El 100% de las muestras clínicas con CVV y CVVR se identificó como agente causal *C.albicans* con un nivel de confianza del 98.5 - 99.9%

Producción de biopelícula de las muestras de pacientes con Candidiasis vulvovaginal

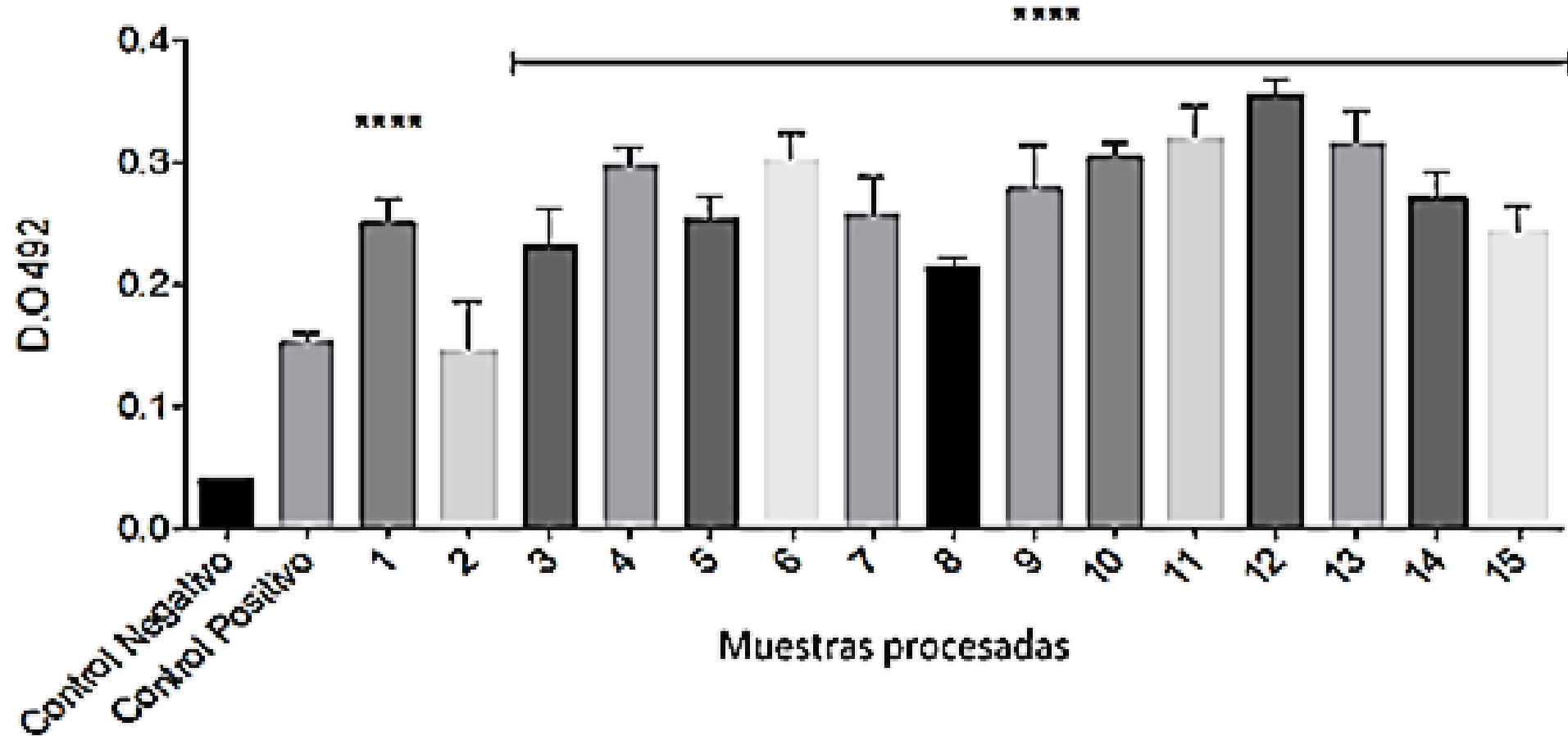
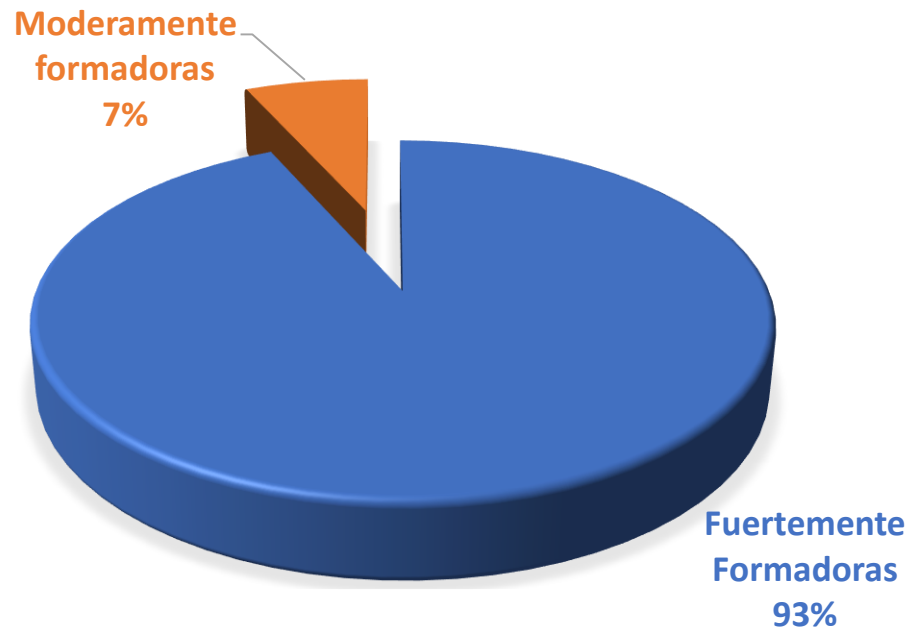


Figura 13. Resultados de D.O. con XTT para determinar la formación de biopelícula. Los experimentos fueron realizados en quintuplicado y fue aplicado el test estadístico de **ANOVA** con un pos test de múltiple comparación, Dunnett's. **** $P < 0.0001$.

Clasificación de la capacidad de formación de biopelícula de los aislamientos clínicos procesados

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA

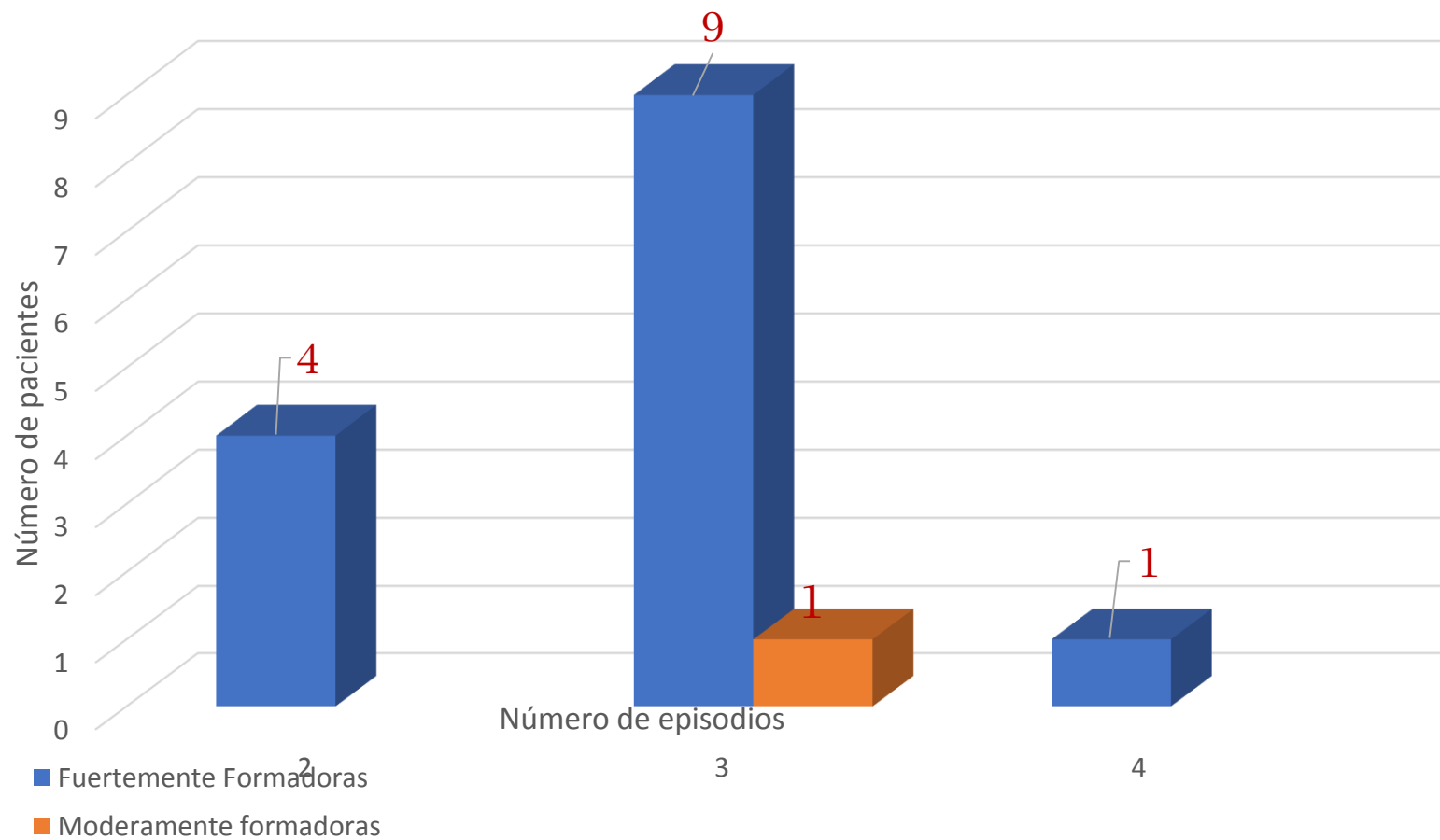


Clasificación adaptada de la formación de biopelícula.

Mínimo	Máximo	Clasificación
-	<0,039	No formadora
0,04	0,08	poco formadoras
0,08	0,16	Moderadamente formadoras
0,16	>0,16	Fuertemente Formadoras

Capacidad de formación de biopelícula para las 15 procesadas, de acuerdo a la clasificación de Valentín y cols. (Valentín et al 2012) con modificaciones de Fernández 77.

Recurrencia y biopelícula



Identificación de las muestras procesadas

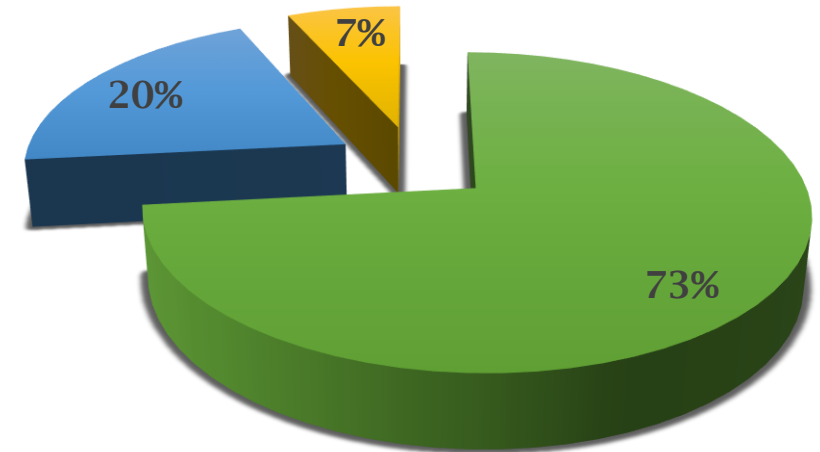
Capacidad de formación de biopelícula	ID MX	EPISODIOS
MODERADAMENTE FORMADORA	2	3
FUERTEMENTE FORMADORA	8	3
FUERTEMENTE FORMADORA	3	3
FUERTEMENTE FORMADORA	15	3
FUERTEMENTE FORMADORA	1	3
FUERTEMENTE FORMADORA	5	2
FUERTEMENTE FORMADORA	7	3
FUERTEMENTE FORMADORA	14	4
FUERTEMENTE FORMADORA	9	3
FUERTEMENTE FORMADORA	4	3
FUERTEMENTE FORMADORA	6	2
FUERTEMENTE FORMADORA	10	2
FUERTEMENTE FORMADORA	13	3
FUERTEMENTE FORMADORA	11	3
FUERTEMENTE FORMADORA	12	2

PCR Multiplex



Resultado de electroforesis de PCR multiplex. Carril 1 marcador de peso molecular ladder 50 pb. Carril 2-10 superior 2-6 inferior: patrón electroforético de los productos de amplificación por PCR multiplex de 15 aislamientos clínicos de *C. albicans*. Carril 7 inferior: control positivo, Carril 8 inferior control negativo.

Distribución de genes

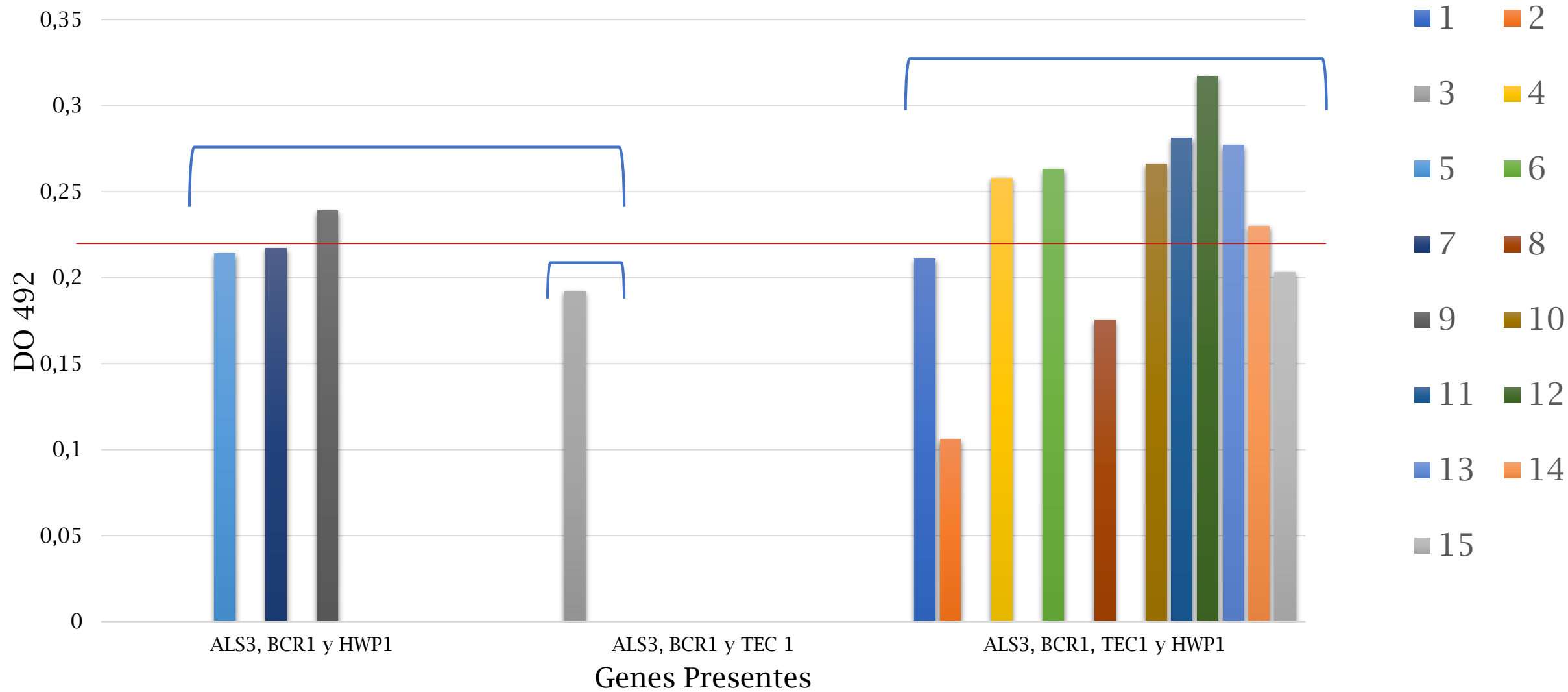


Genes presentes

■ ALS3, BCR1, TEC1 y HWP1 ■ ALS3, BCR1 y HWP1 ■ ALS3, BCR1 y TEC1

Primers	Pares de bases
ALS3	117
HWP 1	188
BCR 1	261
TEC 1	576

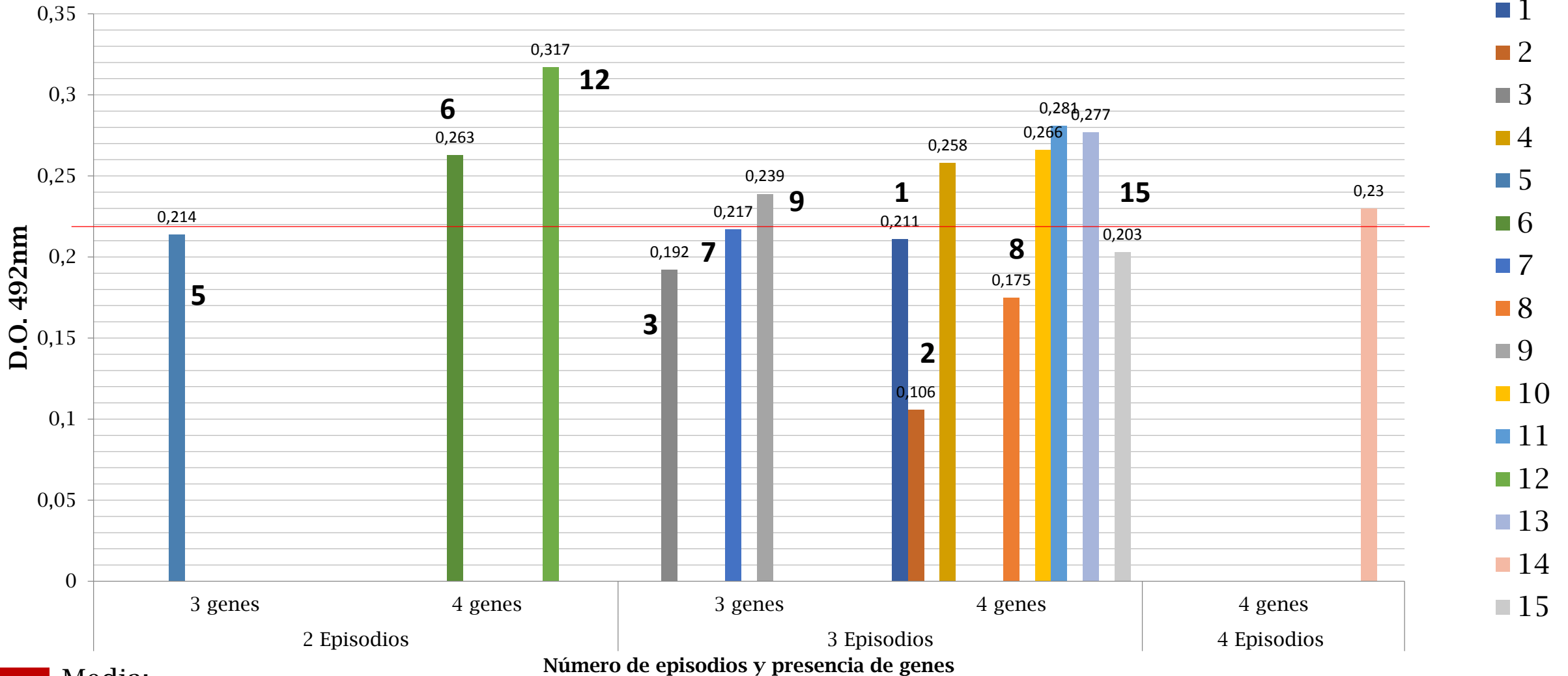
Formación de biopelícula en relación a la presencia de los genes seleccionados



M: 0,229

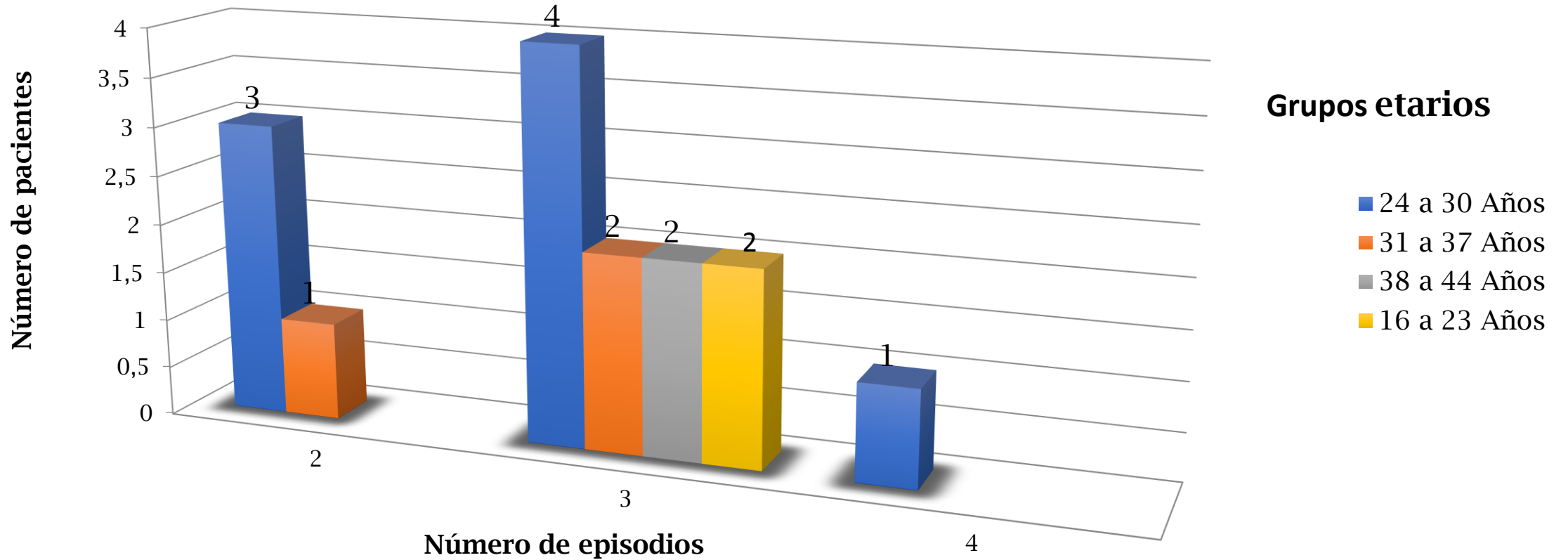
Correlación recurrencia, el número de episodios y el número de genes presentes

Aislamiento

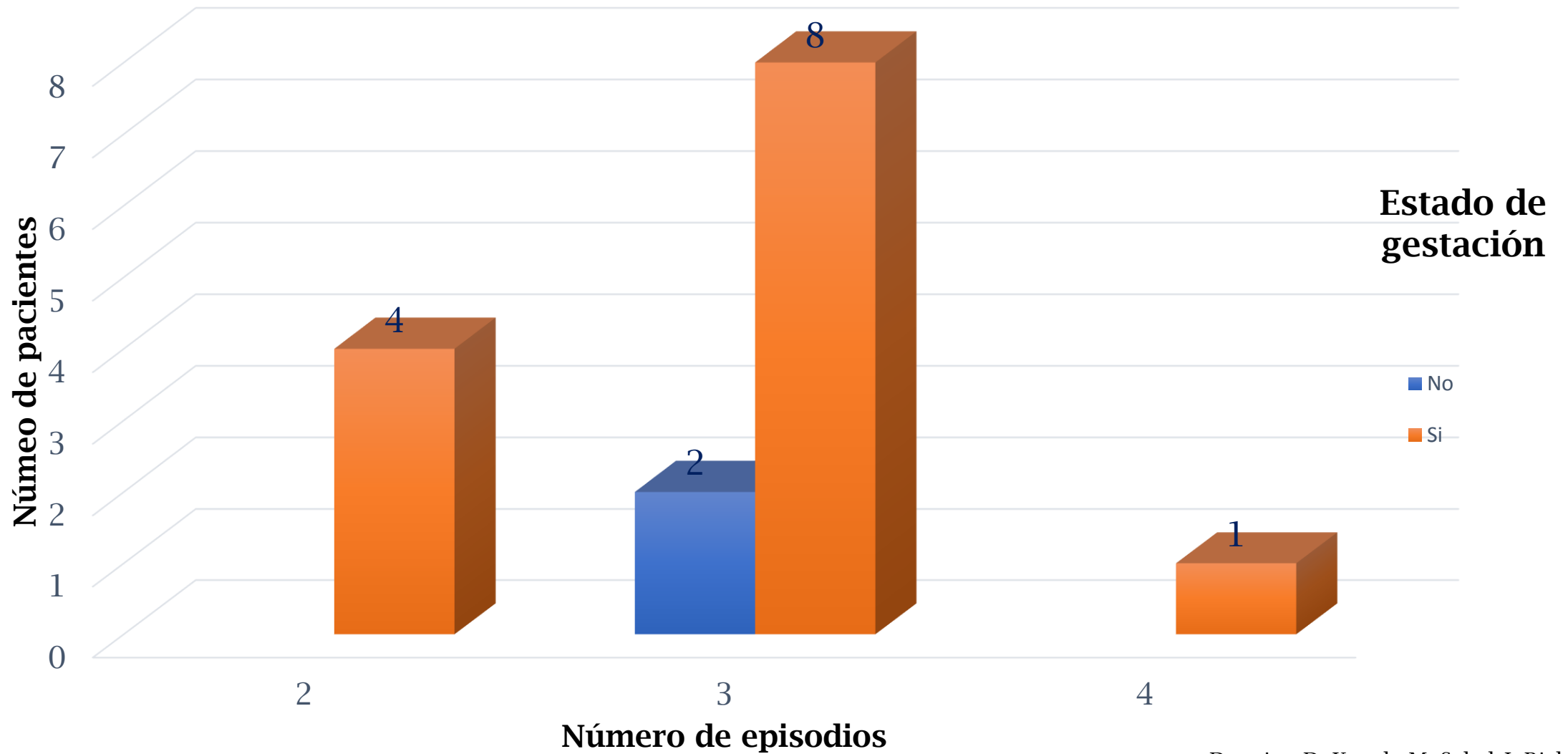


Media:
0,229

Recurrencia por edades

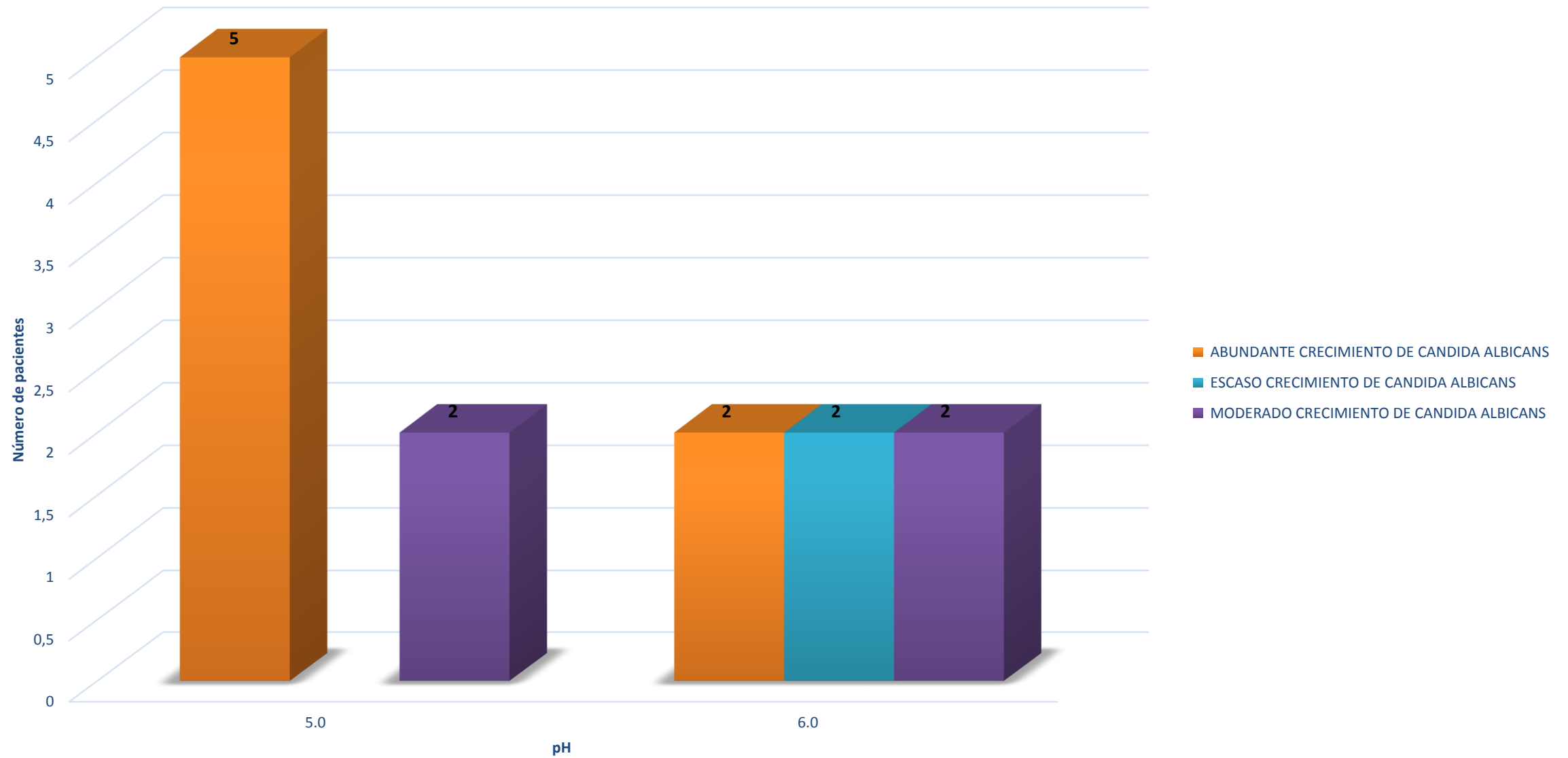


Recurrencia y gestación



Denning D, Kneale M, Sobel J, Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review.

Crecimiento y pH



CONCLUSIONES

❖ La espectrometría de masas MALDI-TOF demostró ser una tecnología precisa y rápida para la identificación del microorganismo. Este método logró identificar que el 100% de LOS AISLAMIENTOS clínicos correspondieron a *C.albicans*. con un nivel de confianza del 98,5-99.9%.

❖ El ensayo XTT sigue siendo una herramienta valiosa para evaluar la formación de biopelícula. identificando que el 93% de las candidas fueron fuertemente formadoras y el 7% moderadamente formadoras.

❖ Se encontró que los genes BCR1 y ALS3 estuvieron presentes en todos los aislamientos lo que se correlaciona con la formación de bioepelícula lo cual se justifica en razón del papel que cumplen estos dos genes en el proceso de formación de bioepelícula

❖ Se observa una relación entre las características como lo son la edad entre 24 - 30 años, estado de gestación y pH con la presencia de CVV y CVVR.

RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES

- ❖ Se encuentra que a la mayoría de las pacientes con CVV y CVVR no se les realiza un seguimiento o control adecuado, razón por la cual, es difícil determinar si las pacientes con dos episodios llegan a presentar recurrencia; además es necesario conocer la historia clínica para así identificar otras condiciones que puedan influir en la patología.
- ❖ Es importante conocer el perfil de resistencia antifúngica de los aislamientos analizados para correlacionar con los resultados encontrados en este estudio, con el fin de determinar la capacidad de virulencia de estos.
- ❖ La levadura se caracteriza por presentar un ADN muy volátil y contaminante, lo cual fue un obstáculo en nuestros experimentos y se corrobora con artículos como el de S. Czurda et. Al.
- ❖ Se recomienda determinar expresión génica donde se pueda comparar los resultados con el estudio previamente descrito, para establecer si existe influencia directa por la cual se obtuvieron los resultados actuales, complementando la discusión y conclusiones obtenidas.

Alcance



- ❖ Herramientas para el análisis de mecanismos de resistencia de *Candida albicans*
Pinilla Gladys, Muñoz Julián, Navarrete Jeannette, Muñoz Liliana, Lindarte Daniela, Molano Jeimmy, Montes Jessica.
Revista Mexicana: Enfermedades Infecciosas y Microbiología
2018 38 (3): 86-92

Alcance



- ❖ Reconocimiento RedCOLSI “Mejor proyecto en curso ciencias de la salud y el deporte del 8 al 10 de mayo de 2019”. En conjunto con el grupo de investigación REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, el grupo de investigación de la universidad del Rosario MICROS y en colaboración con el laboratorio central de referencia.

Agradecimientos

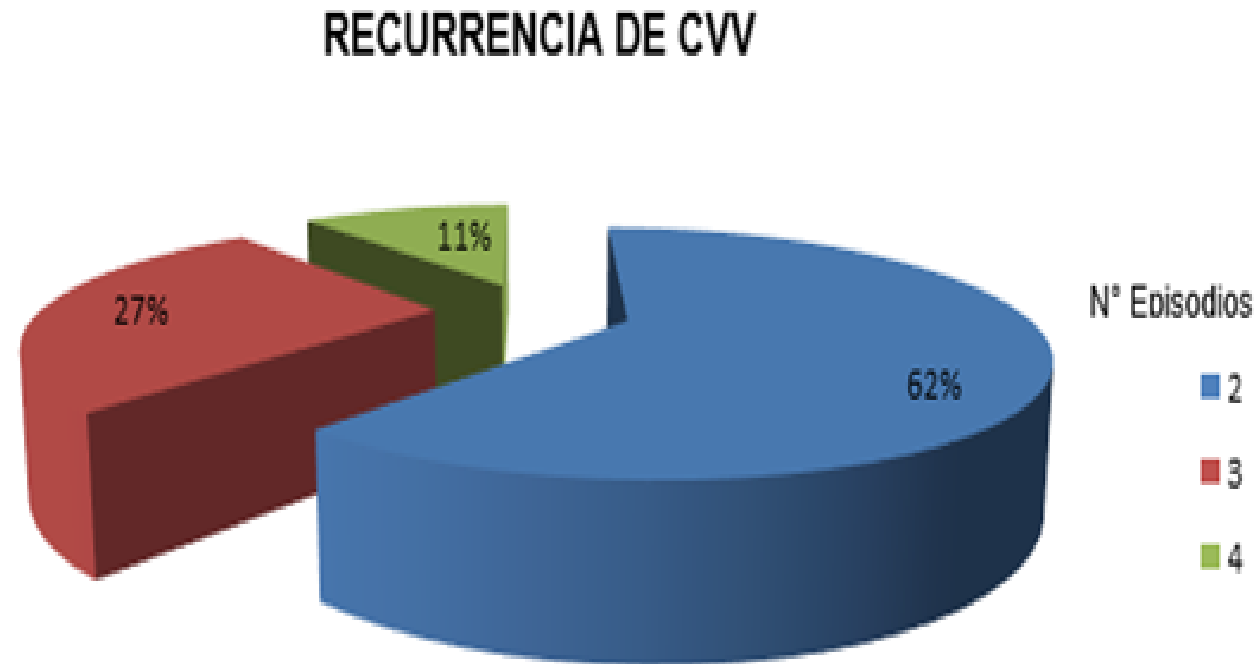
- Agradecemos a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por nuestra formación académica, por el incansable apoyo y acompañamiento en nuestro proceso formativo, así mismo a la Universidad del Rosario por admitirnos en sus instalaciones y apoyarnos con el desarrollo experimental.
- A cada uno de nuestros asesores; al profesor Julián Muñoz, por su entusiasmo, por su pasión por la investigación, su apoyo y acompañamiento, a la profesora Gladys Pinilla por su constancia, por acogernos en su semillero y encaminarnos en este maravilloso proyecto, a la profesora Jennifer Gutiérrez por aterrizar nuestras ideas y nuestro proceder, al laboratorio central de referencia Colsanitas por creer en este proyecto y brindarnos su aval para trabajar con sus pacientes, a la profesora Claudia Sierra por guiar el proceso de muestreo en su laboratorio.
- Agradecemos también a nuestros seres queridos, por su amor, su paciencia y soporte tanto en nuestra formación como en la realización de este trabajo.



REFERENCIAS

2. Ramage G, Saville SP, Thomas DP. *Candida* biofilms: an update. American Society for microbiology [Internet]. 2005 [Consulted 2018 Sep 5]; Vol. 4(4):633-8. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821123>
8. Pineda J, Cortés Arturo, Uribarren T, Castañón L. Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. Rev. Méd. Risaralda [Internet]. 2017 [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 23 (1): 38 - 44. Disponible en : <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v23n1/v23n1a09.pdf>
55. Denning D, Kneale M, Sobel J, Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. Lancet Infect Dis [Internet]. 2018 [Consultado 2018 Ago 28]. Disponible en: <https://www.gaffi.org/wp-content/uploads/Denning-Recurrent-VVC-global-burden-Lancet-Infect-Dis-2018.Pdf>
77. Fernández M. Estudio de la formación de la biopelícula de *Candida* spp. y evaluación de nuevas combinaciones farmacológicas. Universidad de Navarra [Internet]. 2017 [Consultado 2018 Abr 25]. Disponible en : https://dadun.unav.edu/bitstream/10171/43758/1/Tesis_FernandezRivero.pdf

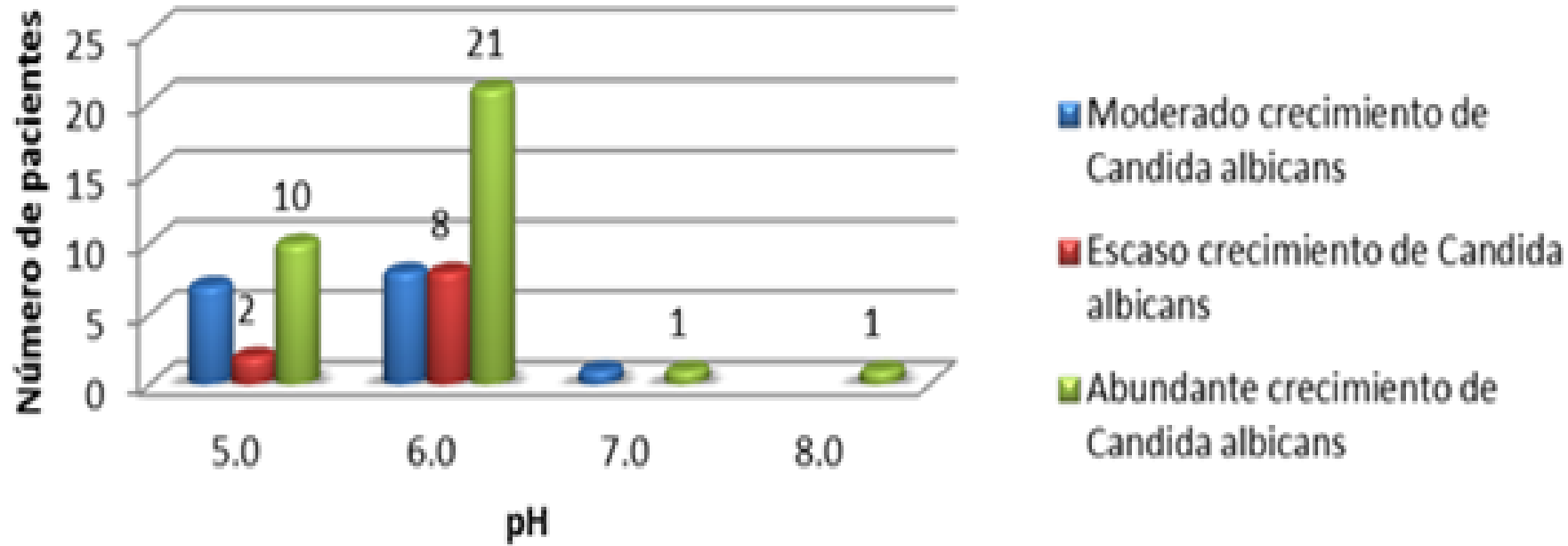
Anexos



Porcentaje de la población segmentada según el número de episodios de recurrencia.

Anexos

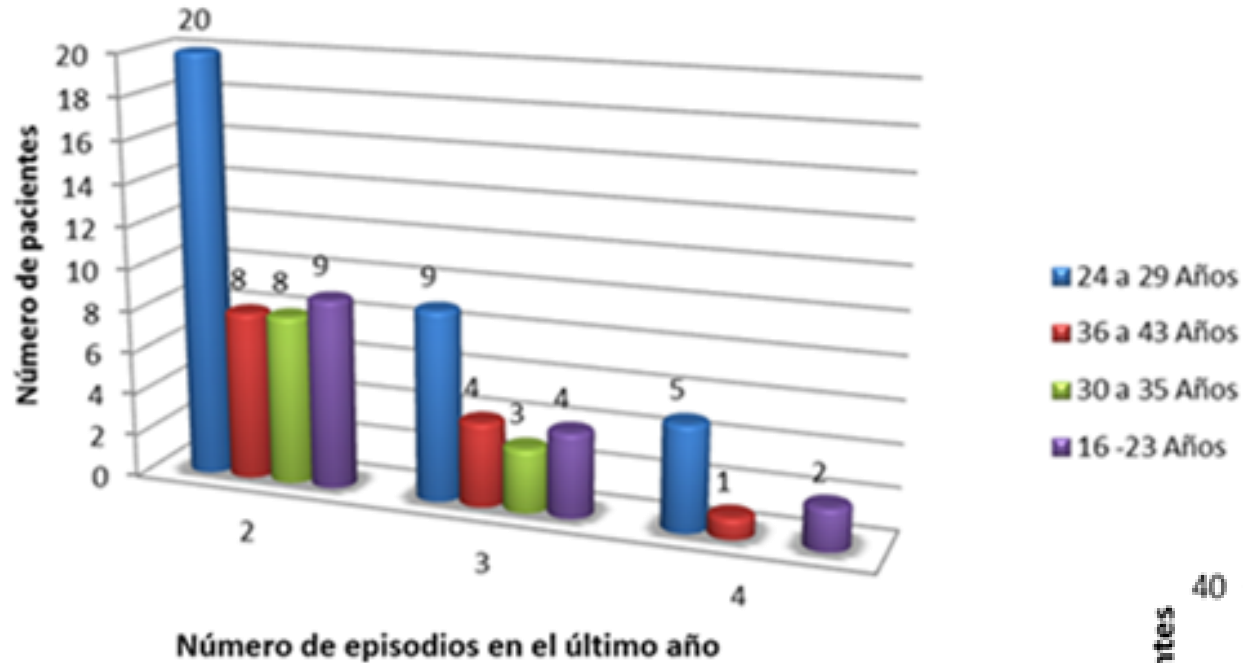
Resultados de pH y su relación con el crecimiento en cultivo



solo se tuvieron en cuenta las pacientes a las cuales se les ordenaron dichos exámenes, es decir, 59 pacientes

su crecimiento está en un rango de 5.0 - 8.0, pero sí es evidente que su crecimiento en concordancia con su actividad metabólica se desarrolla completamente en un pH ácido

Recurrencia por edades



Recurrencia de CVV asociada con el estado de gestación.

85% (62) con CVV están embarazadas y de estas el 15% presenta CVVR

Clasificación de recurrencia por edades entre febrero del 2018 y febrero del 2019

