



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

Bogotá

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá 2019



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

Bogotá

Estudiantes:

**Daniela Alejandra Lindarte Celis
Jeimmy Alexandra Molano Aponte
Jessica María Montes Castillo**

Asesor Externo: Julián Esteban Muñoz Henao PhD.

Asesor Externo: Claudia Rocio Sierra Parada M.Sc

Asesor Interno: Jennifer Carolina Gutiérrez Suarez M.Sc

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá 2019

DEDICATORIA

El presente trabajo contiene una dedicatoria especial dirigida a todos aquellos que hicieron parte de este proceso de manera incondicional. A Dios por habernos mantenido perseverantes ante la adversidad, a nuestro núcleo familiar el cual fue testigo del esfuerzo para lograr nuestros objetivos, siendo parte de nuestro crecimiento personal y profesional acompañándonos siempre en la superación de cada obstáculo y cada logro obtenido. A su vez, la dedicación de este proyecto culminado va para nuestro grupo de asesores, Julián Esteban Muñoz, Gladys Pinilla y Jennifer Gutiérrez, quienes fueron una guía fundamental en este proceso que hemos logrado culminar de manera exitosa.

Daniela Lindarte, Jeimmy Molano, Jessica Montes.

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.

Daniela Lindarte, Jeimmy Molano, Jessica Montes.

Tabla de contenido

1) Introducción.....	13
2) Objetivos.....	15
2.1) Objetivo general.....	15
2.2) Objetivos específicos.....	15
3) Justificación.....	16
4) Impacto esperado.....	19
5) Antecedentes.....	20
5.1) Estado del arte.....	20
6) Marco referencial.....	23
6.1) Generalidades de <i>Candida</i>	23
6.2) Identificación de especies de <i>Candida spp.</i>	24
6.3) Estructura antigénica.....	25
6.4) Candidiasis.....	27
6.5) Candidiasis Vulvovaginal.....	29
6.6) Candidiasis Vulvovaginal recurrente.....	30
6.7) Respuesta inmune frente a la infección por <i>Candida</i>	31
6.8) Epidemiología de candidiasis vulvovaginal.....	32
6.9) Biopelículas fúngicas.....	33
6.10) Genes asociados a la formación de la biopelícula.....	36
6.11) Determinación de la capacidad de formación de biopelícula, XTT.....	40
6.12) MALDI-TOF.....	42
6.13) PCR multiplex.....	46
7) Diseño metodológico.....	49
7.1) Universo, Población y muestra.....	49
7.2) Técnicas y procedimientos.....	49
7.2.1) Revisión bibliográfica.....	49
7.2.2) Selección y diseño de Primers.....	49
7.2.3) Métodos moleculares.....	50

7.2.4) Identificación de cepas formadoras de biopelícula mediante XTT.....	51
7.2.5) Recolección de muestra e identificación mediante técnica de MALDI-TOF.....	52
7.2.6) Procesamiento de las muestras.....	53
7.2.7) Correlación de los datos.....	53
8) Resultados.....	54
9) Discusión.....	65
10) Conclusiones.....	73
11) Referencias.....	76
12) Anexos.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfogénesis en *Candida* spp. durante la infección.

Figura 2. Prevalencia global de candidiasis vulvovaginal recurrente por 100.000 mujeres (en 2018)

Figura 3. Fases de formación de biopelículas de *Candida sp in vitro*.

Figura 4. Formación de biopelícula

Figura 5. Protocolo de trabajo para la determinación de la capacidad de adherencia en placas de poliestireno mediante el método de reducción del XTT

Figura 6. Esquema del procesamiento de muestras por MALDI-TOF

Figura 7. Porcentaje de la población segmentada según el número de episodios de recurrencia.

Figura 8. Porcentaje de recurrencia de las 15 muestras procesadas

Figura 9. Clasificación de recurrencia por edades entre febrero del 2018 y febrero del 2019.

Figura 10. Clasificación de recurrencia por edades entre febrero del 2018 y febrero del 2019 de las 15 muestras procesadas

Figura 11. Recurrencia de CVV asociada con el estado de gestación.

Figura 12. Recurrencia de CVV asociada con el estado de gestación para las 15 muestras procesadas

Figura 13. Crecimiento en cultivo según pH de la muestra.

Figura 14. Vaginosis bacteriana versus candidiasis

Figura 15. Resultado de electroforesis de PCR multiplex.

Figura 16. Resultados de D.O. con XTT para determinar la formación de biopelícula.

Figura 17. Cepas con capacidad formadora de biopelícula de acuerdo a la clasificación de Valentín y cols. (Valentín et al 2012) con modificaciones de Fernández⁷⁷.

Figura 18. Relación entre la recurrencia (número de episodios) con la capacidad de formación de biopelícula

Figura 19. Formación de biopelícula en relación a la presencia de los genes seleccionados

Figura 20. Correlación recurrencia, el número de episodios y el número de genes presentes.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de aislamiento de especies de *Candida spp.*

Tabla 2. Clasificación de la capacidad de formación de biopelícula de los aislados mediante el método de reducción del XTT.

Tabla 3. Clasificación de la capacidad de formación de biopelícula de los aislados mediante el método de reducción por cristal violeta.

Tabla 4. Estandarización de PCR Multiplex.

Tabla 5. Tamaño (pares de bases) del gen amplificado por cada primer.

Tabla 6. Clasificación adaptada de la formación de biopelícula.

Tabla 7. Resultados de la identificación de las muestras y clasificación de acuerdo a la capacidad de formación de biopelícula

Tabla 8. Aislamientos e identificación de las muestras y clasificación de acuerdo a la capacidad de formación de biopelícula.

Tabla 9. D.O. de las 15 muestras organizadas de menor a mayor y comparadas con el número de genes presente.

Tabla 10. Consolidado de resultados.

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de extracción de ADN.

Anexo 2: Protocolo para PCR multiplex.

Anexo 3: Programa termociclador, *Candida*-bio.

Anexo 4: Protocolo para identificación de levaduras mediante la técnica MALDI-TOF.

Anexo 5: Protocolo para técnica de XTT

.



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

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

RESUMEN

La candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR) se ha consolidado como un problema de salud pública debido a su alta prevalencia, recurrencia, frecuencia y difícil tratamiento en algunos casos. Es definida como 3 o más episodios de infección sintomática de vaginitis por *Candida* en un periodo de 12 meses. Aproximadamente, el 90% de los casos se debe a *C. albicans*; sin embargo, no es la única especie causante de esta patología, ya que al menos siete especies pueden estar involucradas.

Uno de los mecanismos de resistencia y persistencia de esta levadura es la producción de biopelícula, ya que el crecimiento adherido a superficie juega un papel importante en la patogénesis e infección humana. En esta, están implicados diferentes genes cruciales para el desarrollo y constitución de la biopelícula en distintas especies de *Candida*.

En el presente proyecto se seleccionan y aíslan muestras provenientes de pacientes con CVV y CVVR, se identifican por medio de MALDI-TOF, se evalúa la formación de biopelícula por medio de técnica espectrofotométrica XTT y se determina la presencia o ausencia de los genes HPW1, BCR1, ALS3, TEC1 amplificados por medio de PCR Multiplex para finalmente hacer una correlación global entre las variables mencionadas, la resistencia, recurrencia y las características demográficas de la muestra analizada.

Palabras clave: Candidiasis vulvovaginal recurrente, biopelícula, mecanismos de resistencia, XTT, PCR multiplex, MALDI-TOF.

Estudiantes: Daniela Alejandra Lindarte Celis, Jeimmy Alexandra Molano Aponte, Jessica María Montes Castillo

Docentes: Julián Esteban Muñoz Henao PhD, Jennifer Carolina Gutiérrez Suarez. M.Sc, Claudia Rocio Sierra Parada M.Sc.

Instituciones: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Universidad del Rosario, Laboratorio Clínico Colsanitas.

1. Introducción

Candida es una levadura que se encuentra en el hombre como parte del microbiota de piel y mucosas. No obstante, frente a múltiples factores, adquiere la capacidad de ser patógena. Las infecciones causadas por esta levadura pueden ser asintomáticas y estar localizadas en áreas como boca, conducto gastrointestinal y vagina¹.

Las especies de *Candida* se encuentran actualmente entre los principales responsables de la mayoría de las micosis oportunistas, como es el caso de la candidiasis vulvovaginal. La candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR) se ha consolidado como un problema de salud pública debido a su alta prevalencia, recurrencia, frecuencia y difícil tratamiento. Es definida como 4 o más episodios de infección sintomática de vaginitis por *Candida* en un periodo de 12 meses. Dentro de estas, la mayor parte de infecciones fúngicas son producidas por *C. albicans* (más del 50%)¹. Sin embargo, *C. albicans* no es la única especie causante de esta patología, ya que al menos siete especies pueden estar involucradas ².

Uno de los factores involucrados en la resistencia es la formación de biopelícula, la cual se considera un factor de persistencia de la infección. Para el caso de la CVVR, son muchos los mecanismos patogénicos y aspectos relacionados con la virulencia de la *Candida* relacionados con el proceso, generando una predisposición a la recurrencia en las pacientes que presenten la infección. La capacidad de los hongos para colonizar la superficie de catéteres y dispositivos médicos y formar biopelículas contribuye a la prevalencia de estos microorganismos como agentes etiológicos de infecciones nosocomiales, entre las que se encuentran las de las vías urinarias y la septicemia. En niños y neonatos *C. albicans* es el patógeno aislado con mayor frecuencia y ha sido asociado con el uso de catéteres venosos centrales ^{1,3}. El tratamiento de estas infecciones es difícil y costoso; por ello, es imperativo contar con una identificación pronta y precisa, no sólo para dar un tratamiento efectivo sino para prevenir la aparición de cepas resistentes a fármacos. Actualmente se están desarrollando alternativas

terapéuticas que buscan inhibir la formación de biopelícula, y que aporten en la disminución de los casos de candidiasis en la población.

Por tanto, entendemos la Candidiasis como un problema de salud pública y relevancia clínica que no ha sido explorado a profundidad y que sí está tomando auge en razón de la resistencia antifúngica que vienen mostrando los microorganismos como *C. albicans*, como consecuencia se requiere un mayor entendimiento acerca de los mecanismos que le permiten prevalecer y generar esta infección de forma recurrente.

2. Objetivos

2.1) Objetivo general

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

2.2) 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.

3. Justificación

Las especies de *Candida* se encuentran actualmente dentro de las principales causas de micosis oportunistas. Dentro de estas, la mayor parte de infecciones fúngicas son producidas por *C. albicans* (más del 50%)¹. De las diversas infecciones, actualmente la candidiasis vulvovaginal por *C. albicans* se presenta como un problema de salud pública, por su recurrencia, frecuencia y difícil tratamiento. Esto último debido principalmente a la producción de biopelícula, pues el rápido crecimiento y la capacidad de adherencia a la superficie les confieren mayor resistencia a los tratamientos antifúngicos como polienos, azoles y equinocandinas¹.

Sin embargo, esta no es la única especie en producir dicha patología, se tiene evidencia de que al menos siete especies, pueden estar involucradas, haciendo de la identificación y determinación frecuencial de cada una, un punto importante a la hora de definir el tratamiento de esta, enfatizando en el hecho de que cada especie puede presentar distintos mecanismos de resistencia a los antifúngicos usados hasta al momento de forma convencional.

Teniendo en cuenta que actualmente esta micosis se ha convertido en un problema de salud pública, y que en Colombia (específicamente Bogotá D.C) no se han realizado estudios suficientes que permitan identificar los factores que influyen en la recurrencia, patogenicidad y resistencia de pacientes con Candidiasis vulvovaginal recurrente es imperativo recopilar la información disponible y a partir de esta, investigar a fondo los puntos clave que determinarán una correlación clínica que permita dilucidar factores desconocidos y a su vez rutas de investigación para contribuir en el desarrollo de posibles tratamientos.

Dentro de la información disponible se hayan bases que sustentan la importancia a nivel social de dicha infección, como ejemplo, tenemos el estudio realizado por Edith Ángel-Müller, M.D. et. al., en el cual se determina la frecuencia de las infecciones del tracto genital femenino en dos poblaciones de Bogotá D.C., para las cuales el 16% de la muestra se veía afectada por Candidiasis vulvovaginal siendo así la segunda causa de infecciones vaginales después de la vaginosis bacteriana, adicionalmente en este estudio se menciona la poca información respecto a la prevalencia de las ITS y a la dificultad que se presenta en el tratamiento debido a esto mismo.² Por otro lado se encuentra un estudio escrito por Nora Cardona-Castro *et al*, que es más específico en cuanto a la prevalencia de la infección de carácter recurrente, puesto que realizan un seguimiento durante un año y evalúan la evolución clínica y la presencia de candidiasis vulvo vaginal recurrente (definiendo esta recurrencia como tres episodios o más en un año)^{4,5} sin embargo, se tienen en cuenta los casos que tuvieron un solo episodio y las especies con las que se relacionan, ofreciendo una visión parcial del porcentaje de pacientes de su muestra que presentan dicha infección según su recurrencia al año exponiendo que de su estudio el (57.5%) de las pacientes presentaron un episodio de candidiasis vulvovaginal por año, el (17.5%) de las pacientes experimentaron dos episodios y el (25%) tuvieron tres o más episodios de CVV por año. De las cuales el 83% fueron por *C. albicans* y el restante 17% se debieron a las especies *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. glabrata*.

Como se observa, dentro de la formación de biopelícula se ven implicados diferentes genes, de los cuales fueron seleccionados los genes HPW1, BCR1, ALS3, TEC1, de acuerdo a su importancia en el desarrollo y constitución de la biopelícula en distintas especies de *Candida*^{6,7}; pues en varios artículos relacionados con el tema se observa que estos genes son una diana de investigación por el papel que desempeñan en la formación de biopelícula. El papel de los genes mencionados cumple una función relevante, y demuestra que la formación de la biopelícula es un proceso de cooperación genética muy grande, del cual no se puede despreciar ninguna función, por lo cual se infiere que al analizar los cuatro genes seleccionados, se está tomando en cuenta pequeñas partes de todo el proceso de formación, no obstante, es posible

constatar que BCR1, TEC1, HWP1 y ALS3 en razón de la variedad de sus funciones (Transcripción, morfogénesis hifal y adhesión) pueden brindar información valiosa para la consecución de los objetivos de este proyecto, y quizá contribuya a develar un posible blanco de acción contra especies de *Candida* involucradas en CVV recurrente. Por tanto, entendemos la Candidiasis como un problema de salud pública y de relevancia clínica que no ha sido explorado a profundidad y que sí está tomando auge en razón de la resistencia antifúngica que vienen mostrando los microorganismos incluida *Candida spp*, y como consecuencia requiere un mayor entendimiento acerca de los mecanismos que le permiten prevalecer y generar esta infección de forma recurrente^{6,7}.

De acuerdo con lo mencionado en el apartado del impacto, la prevalencia y frecuencia de casos de mujeres con candidiasis vulvovaginal recurrente es importante no solo en Colombia si no en muchos países en vía de desarrollo, en zonas en que el acceso a educación sexual, salud y tratamiento se tornan inalcanzables para la población. Por tanto, como usuarios directos e indirectos tenemos a estas poblaciones vulnerables, además de mujeres que según una revisión bibliográfica hecha por M. C. Javier Pineda-Murillo *et al.* de la Unidad de Micología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México se encuentran en riesgo en razón de condiciones particulares como encontrarse en zonas de clima cálido, o condiciones genéticas, puesto que se haya una mayor prevalencia en mujeres de piel negra, personas con grupo sanguíneo ABO y fenotipo Lewis, historia familiar de vaginitis y pacientes atópicos además de uno de los determinantes más importantes que es la situación inmunológica de las pacientes, por lo cual se define a estas pacientes como los usuarios directos ⁸.

Por otro lado, en el mismo estudio, se estima el costo del evento, el cual en Estados Unidos alcanza un billón (109) de dólares por año. Debido a que los signos y síntomas de la VVC son similares a los de varias infecciones genitales, es muy difícil confirmar el diagnóstico de infección además de la resistencia antifúngica que complica aún más la

patología, por lo cual se propone a la industria farmacéutica y a las instituciones de salud como usuario indirecto.⁶

4. Impacto esperado

En la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca (UCMC)

- Entrega de la tesis a la biblioteca de la universidad para fines académicos.
- Entrega de base de datos demográficos y lote de muestras clínicas para futuras investigaciones
- Publicación de los resultados encontrados en artículo científico.
- Contribuir en el reconocimiento de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca como institución activa en el proceso de la investigación en áreas de la salud.

Instituciones participantes

- Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
- Universidad del Rosario
- Laboratorio Clínico Colsanitas (Keralty)

5. Antecedentes

5.1) Estado del arte

Existen diversos estudios en los cuales se destaca que muchas bacterias y hongos se encuentran predominantemente como comunidades adheridas a la superficie, que ahora nos referimos como biopelícula. La formación de biopelícula se ve a menudo como una vía de desarrollo, en la cual, las células adquieren componentes fenotípicos que son distintos de sus homólogos, volviéndose cada vez más claro que la formación de biopelícula es crítica para numerosas interacciones que afectan la salud humana, y que dentro de estas interacciones se expresan una variedad de proteínas específicas que contribuyen en su formación y desarrollo ³.

En el proceso de dilucidar estos mecanismos e interacciones, Nobile y Mitchell en 2006 se enfocaron en la formación de biopelícula por el patógeno fúngico invasor principal de los seres humanos, *C. albicans* ⁴. La investigación se orientó a manera de revisión destacando la interacción célula-célula de esta especie y lo que conlleva esto para su expresión génica. Propone un material de base y una lista de genes abstraídos de diversas investigaciones, que codifican para proteínas implicadas en biopelícula desde la formación, factores de transcripción, adherencia, crecimiento, activación, señalización celular, morfogénesis hifal, hasta resistencia a fármacos. Destaca la relación y el comportamiento de *Candida* cuando se encuentra en proceso de formación de biopelícula, su expresión y sobreexpresión de genes, como el aumento o disminución de actividades ⁹.

En cuanto a la atención prestada a la biopelícula formada por hongos, es baja, pues generalmente se da más relevancia al formado por bacterias, lo que conlleva a que no se comprenda en su totalidad los mecanismos patogénicos de infecciones causadas por hongos. Para el caso del género *Candida*, García-Sánchez en el 2004 presenta y destaca por primera vez la evidencia de un patrón de expresión génica específico de la biopelícula de *C. albicans*, sólo marginalmente influenciado por parámetros ambientales. Se estudiaron las poblaciones de biopelícula desarrolladas en diferentes condiciones de flujo, oxigenación y concentración de glucosa y se compararon sus perfiles globales de transcripción con los de poblaciones planctónicas ¹⁰.

Este estudio detectó 1.850 genes, de los cuales demostró que 325 se encuentran diferencialmente expresados entre biopelícula y condiciones planctónicas. Siendo de estos, 317 genes expresados independientemente de la formación de hifa, y 86 genes dependen del desarrollo micelial. Con los resultados obtenidos por García-Sánchez, es posible conocer los factores que intervienen en el proceso de candidiasis vulvovaginal recurrente, poder extrapolar y comparar la presencia de estos genes de *C. albicans* con los de otras especies de alta frecuencia implicadas en CVV; además de ser una base para seguir profundizando en el estudio de *C. albicans* ¹⁰.

En términos globales la CVV se considera una antigua enfermedad con nuevos desafíos que va tomando cada vez más fuerza, como lo resalta Foxman y colaboradores. En su investigación, se incluyeron a 6.000 mujeres provenientes de Alemania, Francia, Italia, Reino Unido y Estados Unidos, y determinaron que la prevalencia de CVVR para el 2013 fue del 9% y la probabilidad de que la CVV progrese a su forma recurrente fue alta. Los datos globales permiten estimar que esta forma de micosis afecta aproximadamente a 138 millones de mujeres en el mundo. Debido a sus características, como se resalta, esta enfermedad es preocupante por la recurrencia de los síntomas y su naturaleza refractaria a los tratamientos convencionales ¹¹.

El estudio de determinados genes y su relación con la biopelícula, demuestra la importancia de genes específicos para el mantenimiento de la misma. Jyotsana y

Pranab del Centro de Laboratorio de Referencia de Micología Médica en Cleveland, proporcionan un amplio conocimiento del efecto de diferentes variables, incluido el tiempo de crecimiento, los nutrientes y las condiciones fisiológicas, sobre la formación de biopelículas, la morfología y la arquitectura. Seleccionaron diferentes genes involucrados en la formación de biopelícula les realizaron algunas modificaciones, destacando que BCR1, TEC1, HWP1 y ALS3 son genes críticos para el desarrollo y mantenimiento de la biopelícula ¹².

El papel de los genes mencionados cumple una función relevante, y demuestra que la formación de la biopelícula es un proceso de cooperación genética muy grande del cual no se puede despreciar ninguna función. Además, los avances tecnológicos recientes han facilitado el desarrollo de nuevos enfoques para investigar la formación de Biopelículas e identificación de marcadores específicos. De manera que los hallazgos de las diversas investigaciones apuntan a la necesidad de comprender y analizar las biopelículas de *Candida* en los niveles morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular, lo que proporciona información detallada sobre su biología y patogénesis ². Pues este nuevo conocimiento alimentaría investigaciones futuras que probablemente conduzcan a un mejor manejo de las enfermedades asociadas con las biopelículas fúngicas.

6. Marco referencial

6.1) Generalidades del género *Candida*

Candida spp, pertenece al phylum *Ascomycota*, son levaduras mitospóricas alargadas o ligeramente redondas de 2 - 6 x 3 - 9 μm , poseen una reproducción asexual por blastoconidias y tienen un metabolismo principalmente aerobio¹³. El género *Candida* incluye aproximadamente 150 especies identificadas hasta el momento, que se han aislado de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos.

Es una especie dimórfica, es decir, llega a crecer como levadura o en forma de hifas, dependiendo de las condiciones ambientales. Puede ser un comensal de la superficie de la mucosa y en algunos casos forma parte de la biota normal de la piel y membranas mucosas (boca, vagina, vías respiratorias altas, tracto gastrointestinal) de mamíferos ⁹. Sin embargo, cuando las condiciones son permisivas se convierte en patógena, lo que puede conducir a infecciones mucosales e invasivas con alta mortalidad principalmente en personas inmunocomprometidas ¹⁴.

Las micosis causadas por el género *Candida* se denominan Candidiasis; una de las especies más relevantes del género *Candida* es *C. albicans*. La capacidad de un cambio morfogénico de esta levadura está asociada con el comensalismo, encontrándose en gran medida en el intestino y la vagina de hospederos asintomáticos y la formación de pseudohifas está asociada con patogenicidad y por tanto puede hallarse en muestras de tejidos invadidos incluidos los de mujeres con candidiasis vulvovaginal.

La formación de pseudomicelio se encuentra en la mayoría de las especies y variedades. Frecuentemente el pseudomicelio se diferencia en pseudohifa y blastofores, pudiendo formarse con verdadero micelio y clamidosporos ¹⁵. A excepción de *C. glabrata*, el resto de las especies asociadas a candidiasis pueden formar pseudomicelios; *C. albicans* y *C. dubliniensis* además son formadoras de hifas. Los blastosporos de *C. albicans* alcanzan diámetro de 1,5 a 5 micras ⁹.

Las especies de *Candida spp.* crecen entre 48 y 72 horas. En agar Sabouraud forman colonias cremosas de color blanco o crema, brillantes o ligeramente opacas, pueden ser lisas o rugosas y pueden observarse los filamentos que penetran en el agar ¹⁶. En cuanto al metabolismo, muchas especies de *Candida* presentan habilidades fermentativas y/u oxidativas ^{16,17}.

6.2) Identificación de especies de *Candida spp.*

Los métodos convencionales utilizados actualmente para el aislamiento y recuperación se realizan en agar Sabouraud dextrosa con 0.02% de cloranfenicol, incubado a 37°C por 24 – 48 h. Se realiza microscopía de láminas coloreadas con azul de lactofenol para la observación de las estructuras micóticas presentes (Levadura, hifa y pseudohifa). Posterior a la identificación del género de la levadura, las cepas son caracterizadas de forma manual, por medio del método tradicional de asimilación y fermentación de azúcares ¹⁸.

Para la micromorfología, las cepas son analizadas por medio de la observación morfológica tradicional, por el método del tubo germinal y a su vez por las pruebas de formación de clamidoconidias y blastoconidias en agar de arroz. Adicionalmente, se pueden realizar pruebas de crecimiento en agar Sabouraud dextrosa con cicloheximida al 0.01% o al 0.1%, con variaciones en las temperaturas (30°C, 37°C y 42°C) y tiempos de incubación (24h, 48h y 72h) ¹⁹

Otras pruebas incluyen la asimilación de la fuente de nitrógeno en donde se utilizan distintas bases de levadura de carbono como (YCB-Difco Laboratories o YNB-Difco Laboratories), el resultado positivo se hace evidente por medio del crecimiento alrededor de la fuente de nitrógeno ^{20,21}.

Los métodos automatizados, son un mecanismo simplificado, miniaturizado y automatizado, que en general resume las reacciones bioquímicas. El fundamento se basa en la inoculación de la cepa en pocillos que contienen distintos sustratos, que al momento de ser utilizados por la levadura producirán un cambio bioquímico que podrá ser leído en razón de los cambios que presenta; la lectura se realiza de forma automática dando un resultado que consiste en un código numérico que indica las reacciones halladas; lo que representa un patrón comparable con la biblioteca o base de datos que dispone ^{19,22}.

La posibilidad de identificación de microorganismos directamente de muestras biológicas por espectrometría de masas MALDI-TOF ofrece una ventaja sobre los procedimientos de microbiología tradicionales basados en el cultivo, pero es recomendable que su implementación esté integrada a algoritmos diagnósticos que integren los resultados de esta ²³.

6.3) Estructura antigénica

La estructura antigénica del género *Candida* es compleja; ha sido demostrada la existencia de antígenos citoplasmáticos de naturaleza proteica y antígenos glicoproteicos presentes en su pared celular, los cuales han sido químicamente definidos como manano-proteínas, glucano-proteínas y glucanomanano-proteínas; siendo el manano el de mayor actividad antigénica ²⁵.

Candida tiene varios atributos de virulencia para colonizar el huésped y ocasionar daño de forma directa, al activar, resistir o desviar los mecanismos de defensa de este. Los factores de virulencia expresados o requeridos por el microorganismo para causar infección pueden variar según el tipo, el sitio y la naturaleza de las defensas del

huésped. El delicado equilibrio entre el huésped y el hongo patógeno puede convertirse en una relación parásita y resultar en una enfermedad grave. Los hongos no son participantes pasivos en el proceso infeccioso; la interacción entre el hongo y el medio ambiente está afectada por su variabilidad antigénica, el cambio fenotípico y la transición dimórfica ²⁵.

Candida spp, cuenta con diversos factores potenciales de virulencia, como la morfología celular, la actividad enzimática extracelular y los factores de adhesión, que favorecen la formación de biopelículas ^{25,26}.

La transición de levadura a hifa es uno de los atributos de virulencia más relevantes de *C. albicans* para invadir los tejidos. Se ha comprobado, que el crecimiento de forma filamentosa tiene ventajas sobre la levadura en la penetración de la célula o tejido y disminución de la fagocitosis. La levadura, secreta enzimas capaces de degradar proteínas, lípidos y otros componentes celulares, esto facilita su infiltración en sustratos sólidos y tejidos; la hifa por otro lado es idónea para abrir la brecha entre las barreras tisulares ²⁷. Así, las levaduras predominan durante la colonización de la mucosa en el huésped sano, pero la hifa emerge cuando las defensas de éste declinan ²⁸.

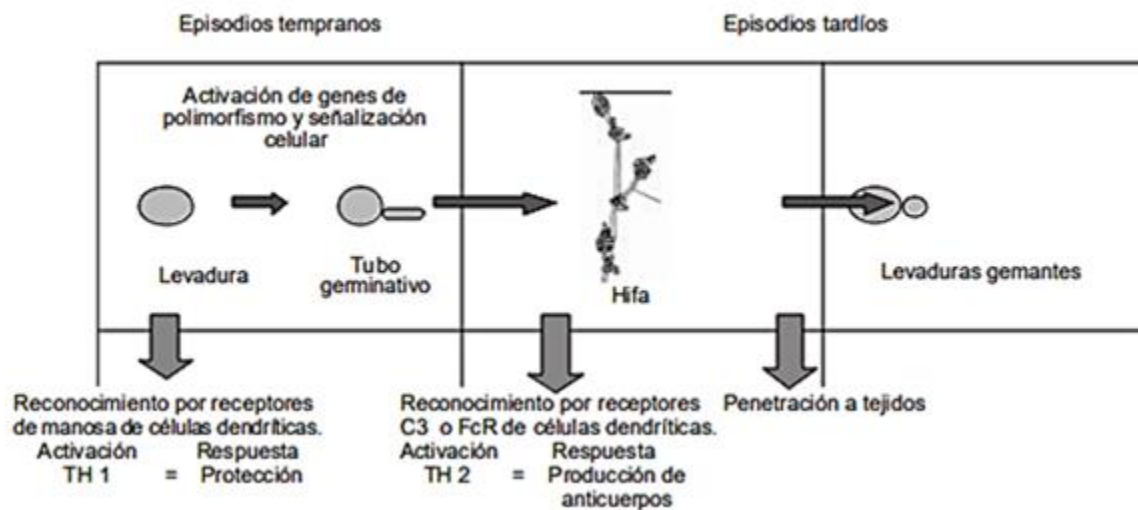


Figura 1. Morfogénesis en *Candida spp.* durante la infección. Dermatología Rev Mex Volumen 49, Núm. 1, enero-febrero, 2005²⁵

Las principales enzimas extracelulares relacionadas con la patogénesis de *Candida* son las proteasas, fosfolipasas y lipasas. En *C. albicans* se han descrito varios miembros de una gran familia de enzimas de secreción aspártico proteinasas (SAP), que han sido bastante estudiadas en estos hongos ^{29,25,27}. Las SAPs son codificadas por los genes de la familia SAP, la presencia de estos genes proporciona al hongo un sistema proteolítico eficiente y flexible que puede garantizar su éxito como patógeno oportunista ^{30,31,32}. Las SAP degradan la matriz extracelular y las proteínas de superficie del huésped, como queratina, colágena, laminina, fibronectina y mucina. Las proteínas que comprenden la familia SAP no se limitan sólo a *C. albicans*, ya que se ha demostrado su presencia en *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* ^{33, 34, 35}.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que especies de *Candida* se da una expresión diferencial de genes en reacción al medio ambiente lo cual favorece la estructura antigénica de esta. Por ejemplo, *C. albicans* muestra expresión diferencial de genes en respuesta al pH del medio, lo que puede ser importante para su patogénesis. Además, el género *Candida* cuenta con adhesinas, que promueven la adherencia a las células del huésped o a sus ligandos específicos. Estas biomoléculas unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV ^{35, 36, 37}. Existen diferentes tipos de adhesinas registradas en *Candida*, como la familia de las ALS, o Hwp1p, Int1p y Mnt1p que presentan una relación con el proceso de adhesión³⁷.

6.4) Candidiasis

El término Candidiasis comprende un espectro clínico causado por especies del género *Candida* extremadamente variado, desde una infección superficial hasta una diseminada, y puede afectar cualquier órgano o sistema.

El género *Candida* contiene aproximadamente 150 especies; sin embargo, esta cifra sigue en aumento. Menos de 15 especies han sido implicadas en infecciones clínicas,

algunas con más frecuencia que otras, en la tabla 1 se observa la frecuencia de aislamiento de especies de *Candida* ^{38, 39, 40}.

Tabla 1. Frecuencia de aislamiento de especies de *Candida spp.*

Especie	Frecuencia
<i>C. albicans</i>	50%
<i>C. tropicalis</i>	15-30%
<i>C. parapsilosis</i>	15-30%
<i>C. glabrata</i>	15-30%
<i>C. krusei</i>	~1%
<i>C. guilliermondii</i>	~1%
<i>C. lusitaniae</i>	~1%
<i>C. dubliniensis</i>	~1%

Obtenido de : Vazquez JA, Sobel JD. Candidiasis. Chapter. Essentials of Clinical Mycology, 2011;167-206.⁴¹

La colonización en piel y uñas es transitoria con predominio de las especies *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*. En mucosa oral, la prevalencia de especies de *Candida* varía entre el 2% y el 37% en población sana y entre el 13% y el 76% en pacientes hospitalizados. *C. albicans* predomina en candidiasis genital, oral y cutánea (>90%) ⁹.

En aproximadamente 95-97% de las infecciones invasoras están implicadas cinco especies (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*), de las cuales *C. glabrata* y *C. krusei*, tienen una resistencia intrínseca o adquirida a los azoles, así como a otros fúngicos utilizados comúnmente ⁴². Las infecciones restantes (3-5%) son causadas por 15-18 diferentes especies que incluyen a *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* y *C. rugosa*. Estas especies son consideradas como causa inusual de candidiasis y están asociadas a brotes, o bien exhiben resistencia adquirida o innata a los antimicóticos de uso común ¹⁶. Actualmente una *Candida* emergente multiresistente a llamado la atención de las autoridades de salud, *Candida auris* descrita en el 2009 causa infecciones asociadas a porcentajes altos de mortalidad, esto debido probablemente a su resistencia a tratamientos convencionales y la capacidad de fácil transmisión entre pacientes. La dificultad en el diagnóstico de esta infección hace con que el tratamiento en la mayoría de los casos no sea el adecuado, agudizando el cuadro de los pacientes. Frecuentemente es confundida con la *C. haemulonii*, y en los casos reportados se ha visto una resistencia a antifúngicos como los azoles, equinocandinas y anfotericina B; debido a esto se ha hecho importante su identificación para proporcionar una orientación a un tratamiento efectivo, disminuyendo la tasa de mortalidad que ha aumentado en los últimos años ⁴³.

6.5) Candidiasis Vulvovaginal

La candidiasis vulvovaginal (CVV) afecta la mucosa vaginal y es causada por diferentes especies del género *Candida* ⁴⁴. La CVV es monomicrobiana, sin embargo, su causa es multifactorial. Factores genéticos (polimorfismos en grupo sanguíneo), hormonales, uso de antibacterianos, edad, actividad sexual, patologías como la diabetes mellitus, causas idiopáticas, el empleo de dispositivo intrauterino (DIU), espermicidas, uso de protectores diarios y embarazo, predisponen a la colonización y al desarrollo de CVV ⁴⁵, ⁴⁶, ⁴⁷, ⁴⁸.

El microbiota de la vagina se encarga de mantener un microambiente que evita la colonización por agentes infecciosos, en esta predomina *Lactobacillus acidophilus*. Un

pH entre 3.8 y 4.2 favorece el crecimiento de estas bacterias comensales y puede dar la entrada a diferentes infecciones ^{46,49}.

Los receptores de las células del epitelio plano vaginal para *Candida*, son carbohidratos naturales y facilitan la adherencia al ser afectados principalmente por factores endógenos. Algunos cambios que afectan el microbiota vaginal incluyen el embarazo donde el pH se hace menos ácido y la terapia con anticonceptivos hormonales debido a la existencia de receptores estrogénicos en *C. albicans* ^{46,49}.

Candida puede adquirirse a partir del reservorio intestinal, por contacto sexual y por recaída después de un tratamiento que no erradicó la levadura. Accede al lumen vaginal desde la zona perianal. Tanto los blastoconidios como las pseudohifas son capaces de destruir el epitelio vaginal por invasión directa. Aunque los síntomas no siempre se relacionan con la carga fúngica, en general, la CVV se asocia a un mayor número de levaduras y pseudohifas ⁴⁵.

A pesar de que el prurito y la descarga vaginal son frecuentes en CVV, esta sintomatología no es específica. Generalmente se observa eritema e inflamación vaginal y la sintomatología aumenta la semana previa a la menstruación. Aunque los síntomas se presenten de manera clásica, el diagnóstico no puede realizarse sólo con la historia clínica y el examen físico. Se requiere microscopía y medición de pH, ya que en CVV es de 4,0-4,5 aproximadamente ^{8,45,46}.

6.6) Candidiasis vulvovaginal recurrente

La candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR) es definida como 4 o más episodios de infección sintomática de vaginitis por *Candida* en un periodo de 12 meses. Suele presentarse en un huésped con otras condiciones de base, como diabetes no controlada, uso de esteroides por lupus, en mujeres inmunocomprometidas, obesidad, uso de terapia de reemplazo hormonal, la administración tópica estrogénica, así como la necesidad de consumo de tamoxifeno, las dermatosis vulvares, liquen escleroso,

eczema y dermatosis atópica⁵⁰. No obstante, cerca de la mitad de las pacientes con CVVR no tiene algún factor de riesgo.

La patogénesis es idiopática e incomprensible. Se ha visto que existe cierta predisposición genética inmunológica en la CVVR idiopática. Pacientes con CVVR requieren una terapia prolongada. Usualmente, cada recurrencia sucesiva de vaginitis tiende a ser causada por la misma cepa de *Candida* que originó la crisis anterior. En la CVVR *C. glabrata* es el segundo agente etiológico más frecuente, luego de *C. albicans*⁵⁰.

En el diagnóstico diferencial de la CVVR, se debe considerar el tratamiento inadecuado de una CVV previa en donde la terapia fue inefectiva, duración insuficiente de la terapia o (en el caso de regímenes orales) interacciones con otras drogas que disminuyan el nivel de la droga administrada; otras infecciones (tricomoniasis, vaginitis bacteriana), dermatitis de contacto, vaginitis atrófica, hipersensibilidad, liquen plano erosivo, alergia, síndrome de Behcet, pénfigo, etc. Por otro lado, la enfermedad severa se suele acompañar de edema significativo, flujo, fisuras; por lo tanto, la paciente no va a encontrar mejoría antes de 72 o 96 horas. La resolución completa puede tomar 1 a 2 semanas⁵⁰.

6.7) Respuesta inmune frente a la infección por *Candida*

La defensa inmunitaria contra la *Candida* está mediada por células, pues, aunque la mayoría de las mujeres con candidiasis tienen anticuerpos tipo inmunoglobulina G, estos no son protectores. Los principales reguladores del crecimiento de la *Candida* en la vagina son los macrófagos y linfocitos T; es típico que no haya polimorfonucleares en este sitio. La región subepitelial de la lámina propia de la mucosa vaginal contiene células cebadas y macrófagos que acceden a la luz a través de una red de conductos subepiteliales⁴⁹. Los macrófagos producen prostaglandina E₂, la cual estimula la producción de tubos germinales en células de levadura de *C. albicans* y aumenta las concentraciones intracelulares de adenosín monofosfato cíclico, este aumento se ha relacionado con la formación de tubos terminales candidiásicos; además dicha

prostaglandina es un potente factor inmunosupresor de la inmunidad mediada por células. Todos los factores anteriormente descritos favorecen el desarrollo y la susceptibilidad a vaginitis por *Candida* ^{8,13}.

En situaciones de estrés o ejercicio físico vigoroso se libera β -endorfina por la hipófisis anterior; pruebas recientes demuestran que esta sustancia puede actuar como inmunoregulador. Los linfocitos T y los macrófagos tienen receptores para β -endorfina, de tal forma que cuando este se une a los macrófagos de la mucosa vaginal induce la liberación de prostaglandina E2, lo cual es un efecto indirecto en la germinación de *C. albicans* ⁴⁹. Es importante resaltar que este mecanismo solo se ha desarrollado en mujeres en periodo ovulatorio, lo cual plantea que la germinación candidiásica mediada por β -endorfina requiere un cofactor probablemente estrogénico ⁴⁹.

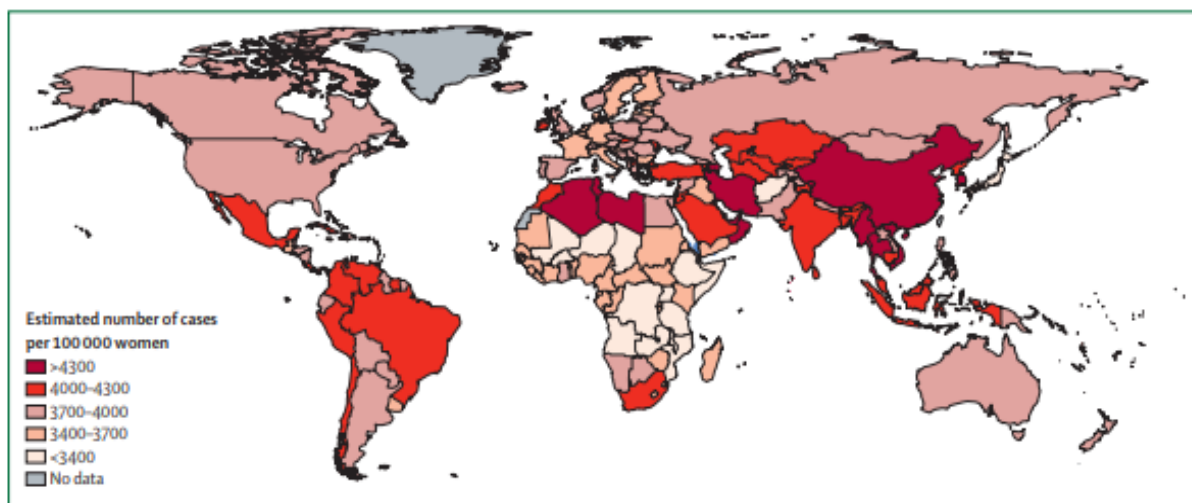
La inmunidad mediada por células desempeña un papel destacado ya que la asociación "linfocitos CD4-macrófono" ejerce un poder de vigilancia y su déficit redonda en una mayor facilidad de *Candida* para adherirse a las células epiteliales. La frecuencia y gravedad de las infecciones dependen, sobre todo, del nivel de células CD4 en sangre. Las candidiasis son evidentes en enfermos con recuentos inferiores a 400 linfocitos CD4/mm³ ^{51,52}.

Debe tenerse en cuenta que las mananas y las manoproteínas de la pared celular de *Candida* son activadoras de las células CD8 y deprimen la actividad de las CD4, potenciando el efecto inmunosupresor del VIH. Por esta razón, en pacientes VIH positivos, se ha propuesto la administración de tratamientos antifúngicos durante lapsos prolongados a fin de reducir el nivel de antígenos libres en sangre y tejidos, evitando un deterioro mayor de la inmunidad ⁹.

6.8) Epidemiología de candidiasis vulvovaginal

Afecta entre 70 y 75% de las mujeres en edad fértil y se estima que 40 y 50% experimentará recurrencia. Cinco a ocho por ciento de las mujeres desarrolla un cuadro

más grave, la CVV recurrente (cuatro o más episodios de CVV al año). Se estima que, en promedio, 20% (10 a 80%) de las mujeres sanas asintomáticas está colonizada por *Candida*⁵³. Sin embargo, debido a que la candidiasis no es una enfermedad de notificación obligatoria en el país, no se conoce la incidencia real de la CVV; adicionalmente se ve enmascarada por errores en el diagnóstico y por estudios poco representativos de la población general ⁵⁴.



En un estudio realizado en Colombia en la ciudad de medellín, en 150 pacientes con diagnóstico de vaginitis por *Candida* entre febrero de 2006 y noviembre de 2008, se observó una prevalencia de las diferentes especies de *Candida*: *C. albicans* 80% (120), *C. parapsilosis* 10% (15), *C. glabrata* 5,3% (8), *C. tropicalis* 2% (3), *C. guilliermondii* 1,3% (2), *C. kefyr* 0,7% (1) y *C. famata* 0,7% (1). El 90%, 135 de ellas, manifestaron síntomas asociados a infección por *Candida spp*; el 44,5%, 60 mujeres, presentaron simultáneamente prurito y flujo vaginal. El 6% de las pacientes presentó más de 4 episodios de candidiasis vulvovaginal en un año ⁴⁴. Siendo *C. albicans* la especie predominante seguida por *C. parapsilosis* y *C. glabrata*.

Figura 2. Prevalencia global de candidiasis vulvovaginal recurrente por 100.000 mujeres (en 2018) ⁵⁵

La prevalencia en Colombia de CVVR por 100.000 mujeres es de 4110 al 2018. En Colombia al 2018 hay 23.591.000 mujeres, de las cuales 13. 845.000 entre los 15 - 54 años.

6.9) Biopelículas fúngicas

De las infecciones humanas, 65% están relacionadas con la formación de biopelículas^{56,57}, que actúan como un reservorio de fuente persistente de infecciones, son difíciles de eliminar y a menudo se asocian con infecciones recidivantes, se asocian frecuentemente con infecciones vinculadas con catéteres y dispositivos médicos, lo que favorece las infecciones nosocomiales⁵⁸.

Son una asociación que puede estar formada por una sola especie bacteriana, fúngica, o por una comunidad derivada de múltiples especies microbianas, se produce cuando esta comunidad microbiana se une irreversiblemente a un sustrato y está embebida en una matriz extracelular auto producida, sus células muestran un fenotipo alterado con respecto a su velocidad de crecimiento y transcripción genética^{54, 59}.

Las ventajas que ofrece este mecanismo son la fuerte unión a superficies vivas o inertes, colonización a tejidos huésped, expresión de características de virulencia, cooperación metabólica, captura eficiente de nutrientes, comunicación célula a célula y favorece a que la comunidad microbiana puede sobrevivir en condiciones críticas.⁵⁶

La formación de una biopelícula es un proceso complejo que se inicia con la adherencia sobre una superficie abiótica, un tejido o en la interface aire-líquido; ocurre como un proceso continuo, de acuerdo con sus diferentes fases de desarrollo:

- a) acondicionamiento
- b) adhesión
- c) síntesis de matriz extracelular inducida por quorum sensing
- d) maduración
- e) dispersión

Estas fases conducen a la formación de una estructura uniforme en forma de depósitos homogéneos y acumulaciones viscosas celulares rodeadas de una matriz de polímeros con canales abiertos para el movimiento de agua. En general, la formación de biopelícula de cualquier organismo sigue una secuencia similar de estos sucesos y los hongos no son la excepción ⁶⁰.

La adhesión y colonización de las poblaciones fúngicas se favorece por diversos factores, como el flujo del medio que las rodea (orina, sangre, saliva y moco), el pH, la temperatura y la osmolaridad, entre otros; hay que recordar que la formación de la matriz extracelular favorece en buena medida la adhesión celular y la maduración de la biopelícula. Esta matriz proporciona a la célula protección contra factores hostiles, como la inmunidad del huésped y los antimicrobianos, debido a que es una malla de proteínas y azúcares que se forma alrededor de las células microbianas y crea una presión osmótica que fuerza a las biopelículas a hincharse y expandirse ⁶¹.

En el género *Candida*, la formación de biopelículas *in vitro* se puede descomponer en tres etapas básicas: (1) unión y colonización de células de levadura a una superficie, (2) crecimiento y proliferación de células de levadura para permitir la formación de una capa basal de células de anclaje y (3) crecimiento de pseudohifas e hifas extensas concomitantes con la producción de material de matriz extracelular (en la figura 3 se observa este fenómeno) ^{60, 62}.

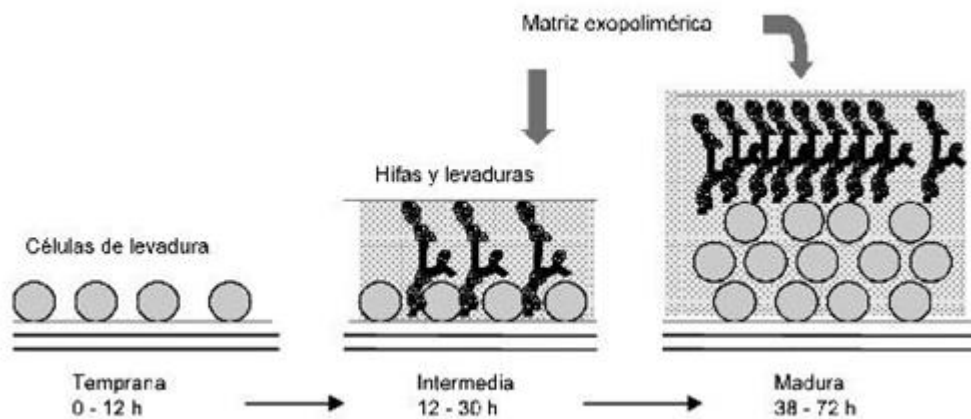


Figura 3. Fases de formación de biopelículas de *Candida sp in vitro*. La morfogénesis se activa cuando la levadura entra en contacto con la superficie y la capa de las células basales. Tiene un papel importante de anclaje de la biopelícula a la superficie, siguiendo el orden: adhesión temprana, crecimiento, proliferación y maduración. Dermatología Rev Mex Volumen 49, Núm. 1, enero-febrero, 2005⁶³.

La formación de biopelículas de *C. albicans* es un proceso que se inicia cuando las levaduras se adhieren a la superficie tisular y las biopelículas se forman como etapa temprana (8-11 horas), intermedia (12-30 horas) y madura (38-72 horas) (figura 3)⁶³.

La biopelícula madura consiste en una densa red de levaduras, hifas y pseudohifas, recubiertas por una matriz extracelular y está frecuentemente asociada con bacterias. La producción de la matriz extracelular aumenta con la edad de la biopelícula; además, su composición varía en función de los microorganismos que la forman: en *C. albicans*, el azúcar principal es glucosa; sin embargo, en *C. tropicalis* es hexosamina, lo que explica que esta composición sea la causa de una penetración diferente de los antifúngicos, por lo que resulta más lenta la difusión de 5-fluorocitosina y del fluconazol en las biopelículas de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* ⁶⁴.

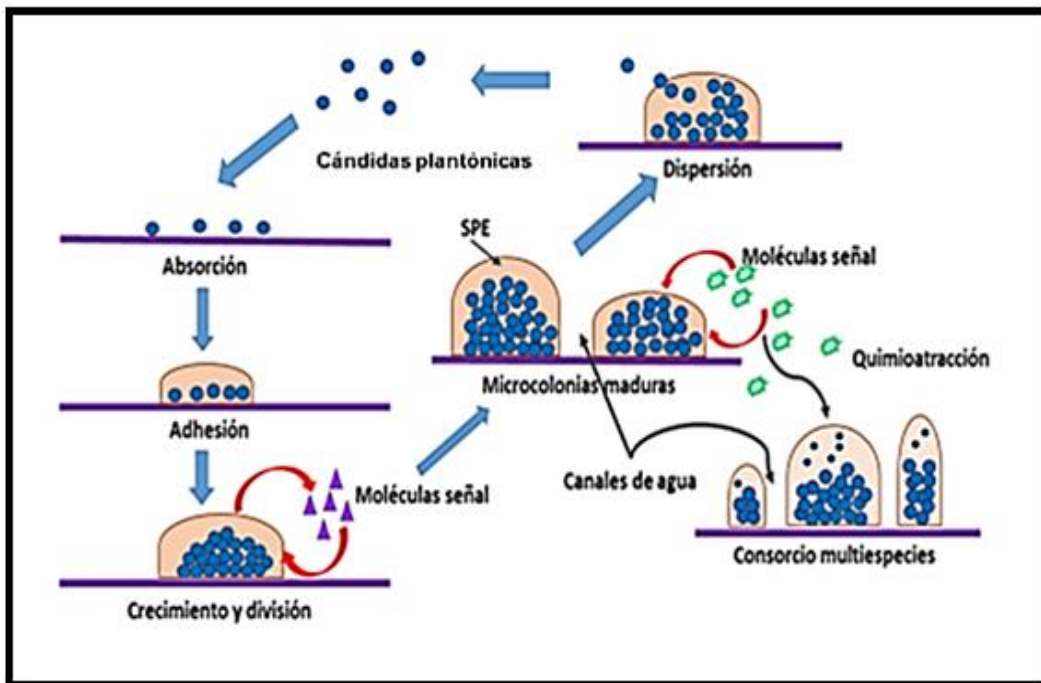


Figura 4. Formación de biopelícula, tomado de: Herramientas de análisis para mecanismos de resistencia en *C. albicans*. Gladys Pinilla et al., 2018 ⁶⁵.

Uno de los principales componentes en *C. albicans* es el β -1,3-glucano, que tiene la capacidad de secuestrar a los azoles y les confiere resistencia en las biopelículas, así como a las equinocandinas, las pirimidinas y los polienos. Este efecto se revierte con la β -1,3-glucanasa, que mejora la actividad antifúngica del fluconazol y la anfotericina B ⁶⁶.

6.10) Genes asociados a la formación de la Biopelícula

Se ha descrito la expresión de un patrón de genes diversos en las células que forman parte de las biopelículas (sésiles o adheridas), a diferencia de las células planctónicas (libres); su discrepancia se refleja con mayor detalle a nivel de la expresión genética, como la síntesis proteica de genes que codifican a proteínas ribosomales, recambio de proteínas y factores relacionados con la traducción ²⁵.

Varios mecanismos están implicados en la adquisición de estas características, entre ellos, el intercambio genético de biopelícula mediado, en parte, por ADN extracelular y, aunque se ha detectado ADN extracelular en biopelículas de *C. albicans*, el mecanismo principal de intercambio implica apareamiento y fusión celular de células (*a/a* o α/α) con fenotipo de colonias blancas a opacas por la liberación de feromonas, que inducen una respuesta de apareamiento y ocasionan un fenotipo adhesivo ⁶⁰. Los tres tipos de combinaciones de genes *a/a*, α/α y α/a en *Candida* forman biopelículas densas en las que los heterocigotos, en promedio, son 28% más gruesos que sus contrapartes homocigotas, lo que causa que sean impermeables a los antifúngicos ⁶⁷.

La formación y mantenimiento de la biopelícula está regulada por aproximadamente 325 genes, de los cuales 317 se expresan independientemente de la formación de hifa y 86 dependen del desarrollo micelial ⁶². Están implicados en la adherencia, morfogénesis hifal, control y señalización celular; además, en resistencia a los antimicóticos, contacto con la superficie celular, síntesis de proteínas, protección,

reparación, metabolismo de lípidos asociados a la membrana y metabolismo de aminoácidos ⁶².

Se ha demostrado que la morfogénesis de la hifa es necesaria para la formación de biopelícula ⁶³, así en especies de *Candida spp.* el gen Tec1 y Bcr1 están implicados en la morfogénesis hifal, son genes reguladores de las propiedades superficiales de las células a hifas ⁶⁸. Por ejemplo, el Bcr 1, es requerido por *C. parapsilosis*, y factor Ace 2 para *C. albicans*. También Efg1 y Cph1 están involucrados en la expresión de proteínas de superficie y son reguladores positivos principales de la transición de levadura a hifa.

EL gen CaPDE2 codifica la fosfodiesterasa de AMPc de alta afinidad. La vía dependiente de AMPc es una de las vías que regulan la morfogénesis de levadura a hifa, se ha demostrado que la delección de CaPDE2 causa niveles elevados de cAMP inhibiendo el desarrollo normal de hifas. Por otro lado, los genes KEM1, MDS3, NUP85 y SUV3 son necesarios para la formación de biopelículas *in vitro* ⁶⁹.

La adherencia es un paso fundamental en la formación de biopelícula, en las especies de *Candida spp.* en esta fase se da una sobreexpresión de genes; un ejemplo de esto es que la adhesina Als1 se sobreexpresa dramáticamente en la formación de biopelícula en *C. albicans* ⁶². Dentro de esta familia de adhesinas, Als3 es la adhesina de biofilm dependiente más crítica de Bcr1. El gen Hwp1 es una manano proteína unida a GPI y es un sustrato para la actividad de la transglutaminasa del huésped y, por tanto, media la unión covalente de *C. albicans* a las células huésped ^{2, 63}.

Los genes de la biosíntesis de aminoácidos están regulados principalmente por Gcn4p, este es un regulador del metabolismo de aminoácidos necesario para el crecimiento normal de biopelículas en *C. albicans* principalmente. Este factor de transcripción induce dos procesos diferentes en respuesta a la inanición de aminoácidos, bien sea la activación de la biosíntesis de aminoácidos, o, inducir el desencadenamiento de la morfogénesis ⁶².

Los genes sobreexpresados están implicados también en la biosíntesis de lípidos asociados a la membrana, tales como ergosterol (Erg25 y Erg16), esfingolípidos (SUR2 y FAT1) o fosfolípidos mitocondriales (PEL1). SEC14 codifica una proteína de transferencia de fosfolípidos que regula varios aspectos del tráfico de membrana y está implicada en la producción de vesículas secretoras del aparato de Golgi ⁶².

Una biopelícula precoz es más susceptible a los antifúngicos, ya que contiene más ergosterol, puesto que es el sitio de acción principal de antifúngicos, a medida que la biopelícula madura se da un enriquecimiento o redistribución de esteroides en membranas de la biopelícula disminuyendo la concentración de ergosterol, lo cual explica su resistencia a los agentes antifúngicos derivados de azoles ⁷⁰.

En especies de *Candida* se dan genes que codifican proteínas de choque térmico (por ejemplo, HSP70, HSP90, HSP104, CaMSI3 y SSA2). La producción de estas proteínas contribuye a la protección de las células del daño y la reparación del daño celular después del estrés.

Los genes que contribuyen a la resistencia de fármacos y que codifican a las bombas de eflujo a multifármacos causan un fenotipo de resistencia. En *C. albicans* y *C. dubliniensis* poseen dos tipos diferentes de bombas de eflujo: transportadores casete de unión de adenosín-trifosfato, codificados por los genes CDR (CDR1 y CDR2), y los facilitadores mayores, codificados por los genes MDR, se expresan durante el crecimiento como biopelícula^{34,67,68}.

Las cepas mutantes deficientes de bombas de eflujo e hipersusceptibles al fluconazol en células planctónicas retienen su fenotipo de resistencia en biopelícula, por lo que se sugiere que opera otro mecanismo de resistencia a este antibiótico. La producción de matriz extracelular es un componente esencial para la maduración de una biopelícula, por lo que se requiere la síntesis del betaglucono, que depende de la enzima b-(1,3) d-glucano sintetasa, que en su estructura tiene dos subunidades: Rho1p y Fskp, con funciones catalítica y reguladora, respectivamente. El sitio de unión de las

equinocandinas es Fskp1 y actúan inhibiéndolo, lo que produce la lisis celular por edema de la célula. Se reportaron cepas mutantes de *C. albicans* que requieren hasta 20 veces mayor dosis de equinocandinas para ejercer su actividad; en estas cepas hay sustitución de tres aminoácidos en una región definida HS1 y HS2, que corresponde a la subunidad Fks1 y a la familia Fsk ⁷¹. En el caso de la resistencia de *C. glabrata*, también se han reportado mutaciones en este gen ⁷². Este tipo de cepas tiene resistencia cruzada a anidulafungina y micafungina.

Alternativamente, las biopelículas pueden tener un requisito especial para proteínas ricas en metionina y cisteína, una idea apoyada por la sobreexpresión de genes en la rama de biosíntesis de cisteína. Finalmente, la activación de los genes para la biosíntesis de SAM podría estar relacionada con la producción de una molécula de detección de quórum asociada con la formación de biopelícula ⁷³.

6.11) Determinación de la capacidad de formación de biopelícula

El análisis de viabilidad celular y de formación de biopelícula envuelve una gran variedad de técnicas con distintas características, lo cual permite enfocar la metodología al estudio que se realiza. Para el análisis de biopelícula en microorganismos como *Candida* spp. se ha encontrado que las opciones más exploradas son el XTT y el cristal violeta además de ser las más asequibles. Sin embargo, existe la necesidad de investigar las ventajas y desventajas de todas las técnicas disponibles ⁷⁴.

En el estudio realizado por Taff, H. T. *et. al.* Donde se comparan las distintas pruebas disponibles para el análisis de biopelícula en cepas de *C. albicans* teniendo en cuenta variables como exactitud, precisión, reproducibilidad, eficiencia y costo, se concluye que la prueba que presenta un mejor desempeño a la hora de cuantificar la formación de biopelícula es el XTT, seguido de cerca por el cristal violeta. En dicho estudio se

analiza la formación de biopelícula en tres cepas (Nativa, con ALS3 silenciado y con ALS1 y ALS3 silenciados) por medio de XTT, Cristal violeta, UFC, DNA, Amplificación de DNA, cuantificación de proteínas y peso celular seco.⁷⁴

XTT demuestra ser la técnica más exacta, con buena reproducibilidad, menor tiempo de trabajo y bajo costo. En comparación con las demás XTT y cristal violeta demuestran un gran rendimiento analítico a un muy bajo costo. Sin embargo, es necesario definir la metodología a usar ya que por asequibilidad y experiencia el cristal violeta es una buena opción, sin embargo el cristal violeta presenta algunas limitaciones como lo son la pérdida de material debida a los pasos sucesivos, la solubilización de los exopolímeros dependiente de la elección del fluido de extracción, también que a menudo es necesario aumentar el área total colonizada debido a que la cantidad de exopolisacaridos es demasiado pequeña y que además como la especificidad de estos colorantes catiónicos a los polianiones se establece empíricamente, no siempre son detectores confiables de exopolisacaridos. Dicho esto y teniendo en cuenta la disponibilidad del XTT en el laboratorio, se opta por usar éste y no el cristal violeta.^{75,78}

XTT es una técnica espectrofotométrica que permite detectar la actividad metabólica de las células presentes en la biopelícula y por tanto es de gran utilidad para estudiar la capacidad de formación de biopelícula y sensibilidad de la misma a los antimicrobianos (Pierce et al. 2008). El 2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolio-5-Carboxanilida (XTT) es una sal de tetrazolio que se reduce por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas, dando lugar a un cristal de formazán soluble de color rojo, que puede medirse a una longitud de onda de 492. La DO_{492} es proporcional a la cantidad de células viables presentes sobre la superficie ^{76, 77, 79}. Para facilitar y acelerar la reducción del XTT, se incorpora en la reacción un dador de electrones, que habitualmente es la 2-metil-1,4-naftoquinona (menadiona).

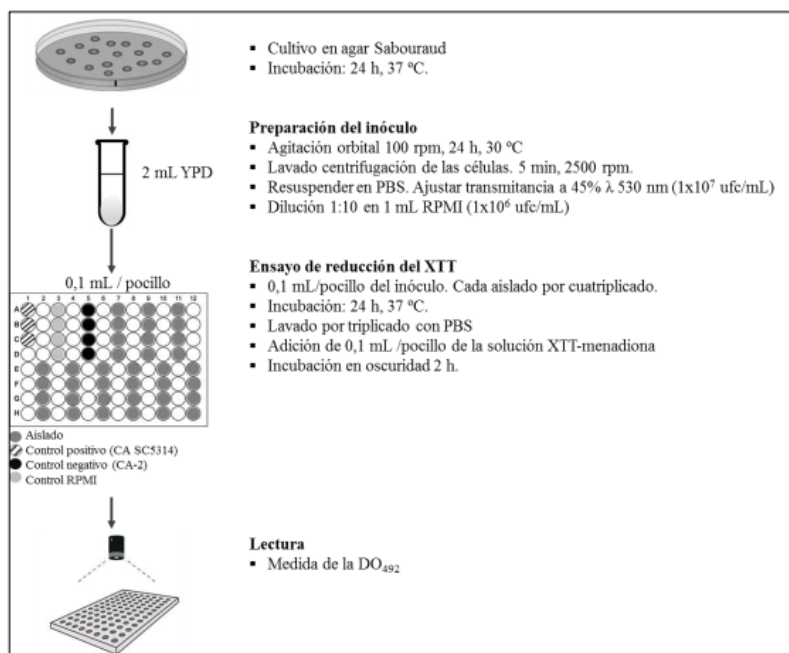


Figura 5. Protocolo de trabajo para la determinación de la capacidad de adherencia en placas de poliestireno mediante el método de reducción del XTT ⁷⁷

Valentín y cols. (Valentín et al 2012) proponen una clasificación, con algunas modificaciones de Fernandez⁷⁷ para el análisis de reducción del XTT. Los aislados de *Candida* spp (trabajados por Fernandez), se consideran no formadoras de biopelícula cuando la DO₄₉₂ fue menor de 0,2. La capacidad de adherencia de los aislados con DO₄₉₂ mayor de 0,2 se clasifica en categorías clasificadas como en la tinción de cristal violeta. A la DO₄₉₂ promedio de cada aislado se le resta la DO₄₉₂ de los pocillos que contengan solo RPMI (blanco).

Tabla 2. Clasificación de la capacidad de formación de biopelícula de los aislados mediante el método de reducción del XTT

DO ₄₉₂	Clasificación
DO < 0,200	No formadora
0,200 < DO < 0,399	Poco formadora
0,400 < DO < 0,999	Moderadamente formadora
DO > 1.000	Fuertemente formadora

Para realizar un estándar particular de la biopelícula es necesario utilizar las modificaciones que realiza Fernandez⁷⁷ en su tesis, en las cuales aplica los criterios que se usan para la técnica con cristal violeta, dispuesta a continuación.

Tabla 3. Clasificación de la capacidad de formación de biopelícula de los aislados mediante el método de reducción por cristal violeta

DO₅₇₀	Clasificación
DO < DO _c	No formadora
DO _c < DO < 2DO _c	Poco formadora
2DO _c < DO < 4DO _c	Moderadamente formadora
4DO _c < DO	Fuertemente formadora

6.12) MALDI-TOF (Espectrometría de masas, Espectrómetro de masas, Fuentes de ionización)

La identificación molecular es un método más preciso que permite el reconocimiento de cepas y especies en razón de su material genético, como alternativa la espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz o MALDI-TOF MS, brinda una opción que favorece de forma significativa la identificación ^{80, 81}.

Es un método confiable, específico y rápido de identificación de bacterias, micobacterias y hongos basado en su perfil de proteínas ^{83, 84, 85}. Por medio de esta técnica se analiza el perfil proteico de los microorganismos, especialmente las proteínas ribosómicas, a través de un espectro de masas que ha sido definido para cada especie. Por lo cual, se espera que al momento de analizar la muestra en estudio está arroje una serie de picos característicos del espectro que serán comparados con las bases de datos de los espectros de masas que emite cada microorganismo registrado por el equipo emitiendo así un puntaje o código característico ^{86,87}.

Se compone de tres unidades funcionales, una fuente de ionizante para transferir iones a las moléculas de la muestra en una fase gaseosa, un analizador de masas que separa los iones de acuerdo con su relación masa/carga y un dispositivo de detección para monitorizar los iones separados. El método emplea células intactas del microorganismo, una pequeña porción de una colonia de bacterias crecida en medio de cultivo sólido se deposita directamente sobre una placa metálica conductora; un pequeño número de células entre, 10^4 a 10^5 unidades formadoras de colonias son necesarias para el análisis ⁸⁸. Microorganismos cuya lisis es más difícil, como ciertas bacterias Gram-positivas, micobacterias, levaduras y mohos, a menudo requieren un tratamiento previo adicional con un ácido orgánico fuerte o por lisis mecánica ^{86, 87}. Posteriormente, a la placa con el microorganismo se adiciona una solución saturada de un compuesto orgánico de baja masa, denominada matriz. Tras el secado, la muestra del microorganismo y la matriz se cristalizan y forman un depósito sólido de muestra incrustado en la matriz, la cual es esencial para la ionización exitosa de la muestra pues actúa como un “andamio” en el cual puede ocurrir la ionización y como un proveedor de protones para la ionización ⁸⁹. Después de la cristalización de la matriz y del compuesto, la placa metálica se introduce en el espectrómetro de masas, en donde la mezcla es irradiada con pulsos cortos de un rayo láser UV (por lo general, un haz de láser con longitud de onda de 337 nm). La interacción entre los fotones de las moléculas de láser y de la matriz, causados por la absorción de la energía del haz, desencadena una sublimación de la matriz en una fase gaseosa, seguida por la ionización de la muestra del microorganismo con mínima fragmentación (por ello se denomina “ionización suave”). Al ionizarse, las proteínas son aceleradas a través de un campo electrostático y luego son expulsadas en un tubo de vuelo al vacío donde se separan en función de su velocidad o tiempo de vuelo, llegando finalmente al detector de masas que genera información característica de la composición del microorganismo mediante un espectro de picos, frente a su relación masa/carga (m/z), llamada también huella digital de la masa de los péptidos (peptide mass fingerprinting)^{89,90}. Una vez generado, el perfil espectral del microorganismo de prueba es comparado automáticamente mediante un programa informático con una base de datos de

espectros que es construida a partir de cepas de referencia, permitiendo la identificación del microorganismo ^{91,92}.

La identificación de los microorganismos por MALDI-TOF MS se basa en que las huellas digitales espectrales varían entre los microorganismos, algunos picos son específicos del género, otros de la especie y otros, a veces, de las subespecies ⁹³.

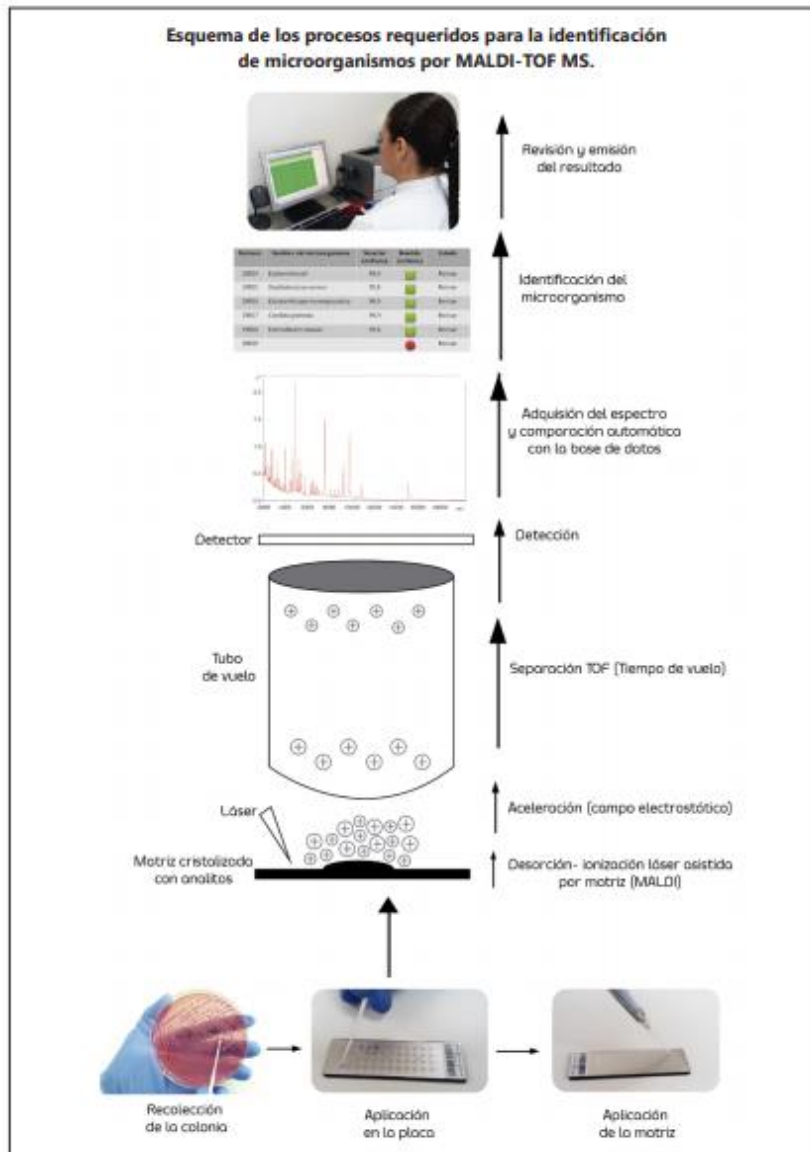


Figura 6. Esquema del procesamiento de muestras por MALDI-TOF ⁹³

En estudios realizados con MALDI TOF para la identificación de hongos se encuentra como principal dificultad el procesamiento de especies de hongos filamentosos,

contrario a lo que sucede con *Candida*, pues en artículos como el de Siller-Ruiz, M resaltan la excelencia de los resultados arrojados por el equipo en el análisis de levaduras, o para el caso de *Candida*, además se menciona que este método es capaz de realizar una identificación más precisa que otros métodos, dando énfasis a los hallazgos que permite el equipo en la diferenciación por ejemplo del complejo *Candida parapsilosis*^{92,93}. Por lo cual se espera que en la ejecución experimental de esta técnica, la identificación de las muestras sea exitosa.

6.13) PCR multiplex

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células⁹⁴. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión.

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. El ADN es una estructura en una doble hélice. La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del ADN es negativa y está dada por los grupos fosfatos⁹⁵.

En la PCR, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa⁹⁶, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*. El rasgo que distingue a esta enzima

bacteriana de otras ADN polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas, por lo que se le considera una enzima termoestable.

Para que la enzima funcione con alta especificidad y la reacción transcurra exitosamente, también se necesita de los elementos ya mencionados como primers, dNTPs, Mg +, buffer y H₂O. Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta, una denominada «forward» o sentido y otra «reward» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente)⁹⁷.

Los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa. El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1X. El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa. El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos ⁹⁷.

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplifica la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa ⁹⁸.

En el caso de una PCR múltiple, lo que se persigue es amplificar simultáneamente en un único tubo distintas secuencias específicas o secuencias blanco o dianas, lo cual necesariamente implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean

suficientes y adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibir la de las demás. Con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio y de primers, y el tipo y la cantidad de ADN polimerasa, pueden ajustarse experimentalmente. Para otros, en cambio, debe realizarse un diseño exhaustivo previo. En el caso de los cebadores y el programa de temperaturas utilizado, es necesario tener en cuenta varias premisas: a) escoger o diseñar oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, es decir, que no formen dímeros; b) que tengan temperaturas de alineamiento similares; c) que cada pareja amplifique una única secuencia diana, y) que generen amplicones (producto obtenido de la reacción de PCR) de tamaño suficientemente diferente para separarlos y diferenciarlos tras la amplificación. En cuanto a la calidad y cantidad de ADN molde, por supuesto debemos intentar partir de la concentración menor posible y con ausencia de sustancias inhibitoras que puedan interferir en la reacción. Para ello, los protocolos de purificación variarán en función del tipo de muestra de partida ^{98, 99, 100}.

7.0 DISEÑO METODOLÓGICO

Este trabajo es un estudio descriptivo el cual se enfocó en la relación de los aislamientos clínicos y las condiciones variables de cada paciente lo cual permitió obtener diferentes resultados asociados a la presencia de genes y formación de biopelícula conllevando a la candidiasis vulvovaginal recurrente.

7.1 Universo, población y muestra:

- **Universo:** Pacientes que han asistido a consulta por presencia de sintomatología asociada a candidiasis vulvovaginal o por control prenatal.
- **Población:** Pacientes femenina en edad fértil.
- **Muestra:** Aislamientos de *C. albicans* en pacientes con CVVR confirmado mediante criterios de inclusión, en un Laboratorio Clínico de referencia de Bogotá D.C.

7.2 Técnicas y procedimientos

7.2.1 Revisión bibliográfica:

Mediante un proceso de investigación apoyado en artículos y documentos científicos asociados a candidiasis vulvovaginal, se conocieron los diferentes estudios, técnicas y procedimientos realizados con anterioridad por otros autores sobre esta temática. Esto permitió una orientación de nuestro diseño metodológico con variables estandarizadas acordes a nuestros intereses y necesidades que conllevaron al cumplimiento de los objetivos planteados al inicio de esta investigación.

7.2.2 Selección y diseño de primers:

Teniendo en cuenta una investigación científica previa a la selección de primers, se realizó la identificación de los genes involucrados en la producción y mantenimiento de la biopelícula de *C. albicans*, siendo estos nuestras dianas de estudio en las muestras obtenidas. Los cuatro genes implicados y seleccionados en este proceso fueron:

- TEC 1: Factor de transcripción y morfogénesis hifal.
- BCR 1: Factor transcripcional y regulador principal de biopelícula.
- ALC 3: Pertenece a la familia de adhesinas implicadas en adhesión.
- HPW1: Cascadas transcripcionales, adhesinas, media interacción célula-célula.

Para el diseño de los primers se utilizaron los software NCBI BLAST y PCR ExPASy. Luego, a partir de los primers liofilizados se realizó la reconstitución con H2O Milli-Q (según indicaciones del fabricante): indican 250 µl para una [] 100 pmol/µl. Se procedió a preparar alícuotas a una concentración de 10 uM las cuales fueron conservadas a -80°C quedando disponibles para los experimentos posteriores.

7.2.3 Métodos moleculares: Para llevar a cabo la identificación de los genes involucrados en la biopelícula de *C. albicans* en cepas aisladas de las muestras clínicas, se realizó la extracción de ADN a partir del crecimiento del hisopado de la muestra en Agar Dextrosa Sabouraud incubado a 37°C durante 24 horas en condiciones aeróbicas. Posteriormente, los inóculos del cultivo se transfirieron a un eppendorf donde fueron incubados, centrifugados, lavados, tratados con etanol al 70% y resuspendidos en 50-100 µl de H2O destilada estéril para su conservación a -80°C. (Modified from Ferrer C et. Al JCM 2001).

Para verificar el rendimiento del DNA, se realizó la cuantificación y posteriormente la dilución adecuada para ser empleado en la PCR.

Para la amplificación de los productos de DNA se llevó a cabo una PCR multiplex en la cual se estandarizó una master mix con las siguientes concentraciones: 1,2 X buffer,

3Mm MgCl₂, 0,24 mM dNTPs, 0,5 mM de cada primer, 1,3 U Taq, 34,5 ng DNA. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl. La amplificación fue realizada en el termociclador Bio Rad c1000 touch basado en el programa *Candida* bio, el cual fue diseñado a partir de una revisión literaria previa. Posterior a ello se almacenaron los productos de PCR a -20°C para su conservación.

Los fragmentos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en Buffer TBE (0,75 g de medio+50 ml de TBE 1X). Se usó como intercalante de ácidos nucleicos el GelRed y se procedió a realizar la siembra de los productos de PCR a un volumen de 5 µl al igual que el marcador de peso molecular de 50 pb. Se realiza el corrido mediante la fuente de poder nano-pac 300 (Voltaje: 85, corriente: 120, tiempo: 30 minutos).

Una vez transcurrido este proceso se realiza lectura mediante el programa Quantity one basic generado por equipo Bio-rad.

7.2.4 Identificación de cepas formadoras de biopelícula mediante XTT:

A partir del hisopado sembrado en placas de agar dextrosa Sabouraud incubadas a 37°C por 24 horas, se realizó la transferencia de un inóculo de las diferentes cepas en 15 ml de caldo Sabouraud siendo incubadas nuevamente a 100 rpm de agitación constante con las mismas condiciones ambientales anteriores. Posteriormente, se realizó la visualización y conteo del número de levaduras viables mediante cámara de Neubauer y se procede a realizar una suspensión de células a 2×10^6 cel/ml en medio RPMI con MOPs (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid). Con esta suspensión, se sembró 100 µl de cada dilución en una placa de microtitulación de 96 pocillos por quintuplicado incubando a 37°C por 48 horas en cámara húmeda. Después del período de incubación, se realizaron 3 lavados con 200 µl de PBS en cada pocillo eliminando las células no adheridas. Finalmente se agregaron 50 µl de reactivo XTT activado en cada pocillo. Nuevamente las placas se incubaron de 2 a 4 horas, y se pusieron en agitación para dispersar mejor el reactivo.

Para obtener los resultados se leyó la absorbancia en un lector de ELISA utilizando 492 nm como filtro primario y 630 nm como filtro diferencial. A partir de los valores

obtenidos en la lectura, se clasificó la formación de biopelícula con los valores obtenidos y el valor del control negativo.^{76,77}

Tabla 2. Clasificación de la capacidad de formación de biopelícula de los aislados mediante el método de reducción del XTT

DO₄₉₂	Clasificación
DO < 0,200	No formadora
0,200 < DO < 0,399	Poco formadora
0,400 < DO < 0,999	Moderadamente formadora
DO > 1.000	Fuertemente formadora

Para realizar un estándar particular de la biopelícula es necesario utilizar las modificaciones que realiza Fernandez⁷⁷ en su tesis, en las cuales aplica los criterios que se usan para la técnica con cristal violeta, dispuesta a continuación.

Tabla 3. Clasificación de la capacidad de formación de biopelícula de los aislados mediante el método de reducción por cristal violeta

DO₅₇₀	Clasificación
DO < DO _c	No formadora
DO _c < DO < 2DO _c	Poco formadora
2DO _c < DO < 4DO _c	Moderadamente formadora
4DO _c < DO	Fuertemente formadora

7.2.5 Recolección de muestra e identificación mediante técnica de MALDI-TOF:

A partir de pacientes con diagnóstico confirmado de candidiasis vulvovaginal recurrente en un laboratorio clínico de la ciudad de Bogotá, se obtuvo 15 aislamientos de *C. albicans* provenientes de muestras clínicas. Estas fueron adquiridas para su procesamiento, posterior al consentimiento informado de las pacientes involucradas y la aceptación del comité de ética del laboratorio clínico de referencia.

Los aislados clínicos se cultivaron en agar papa modificado con cloranfenicol durante 48 horas a 37°C. Para la identificación se usó MALDI-TOF MS (VITEK® MS). Se sigue el protocolo de acuerdo a especificaciones del fabricante. El espectro de identificación se produjo a partir de láser de nitrógenos de 337 nm con enfoque fijo y una tasa de pulso Máxima - 50 Hz (50 disparos láser por segundo), cada lámina permitió analizar 48 muestras. Las muestras se montaron por triplicado, usando la configuración IVD del sistema VITEK®MS, el software compara el espectro obtenido con el espectro esperado de cada organismo o grupo de organismos contenido en la base de datos, obteniendo una identificación con un nivel de confianza que se calcula con base al porcentaje de probabilidad y el número de opciones de microorganismos posibles. El porcentaje de probabilidad se refiere a qué tanto el espectro observado se asemeja al espectro típico de cada organismo. El rango de probabilidades para una identificación correcta es 60-99% y valores cercanos a 99,9% indican una aproximación más exacta. Cuando el porcentaje de probabilidad es menor al 60% el microorganismo se considera como no identificado⁸⁹. Las identificaciones de las muestras se mantuvieron en rangos de nivel de confianza 98,5% - 99,9% para *C. albicans*.

7.2.6 Procesamiento de las muestras:

Luego de la identificación y aislamiento de las cepas presentes en las muestras clínicas, se procedió a desarrollar los diferentes procedimientos descritos anteriormente: extracción de ADN, visualización de genes (presencia o ausencia) y capacidad de formación de biopelícula.

7.2.7 Correlación de los datos:

Teniendo en cuenta que los aislamientos provienen de muestras clínicas, se pudo analizar y correlacionar los diferentes resultados obtenidos de los experimentos y la historia clínica de los pacientes, para poder evidenciar la variabilidad de los resultados y la diversidad de condiciones que conllevaron a las similitudes o diferencias entre cada paciente.

8.0 RESULTADOS

Se realizó una recolección de muestras de pacientes con candidiasis vulvovaginal, de las cuales se verificaron 1800 tubos germinales y 1350 frescos. A partir de allí, se revisaron las historias clínicas de las pacientes con resultado de *Candida* o levaduras positivo desde febrero de 2018 a febrero de 2019 y a partir de ahí se seleccionaron 73 muestras con CVV. De las pacientes anteriores, se agruparon 28 de las cuales cumplieron con los criterios de inclusión para CVVR (mínimo 3 episodios de CVV en un año) y finalmente se procesaron 15 muestras donde se tuvieron en cuenta pacientes con CVV Y CVVR, con el objetivo de desarrollar el diseño metodológico propuesto.

Resultados de estandarización para PCR

Se identificaron las concentraciones de los reactivos críticos (MgCl, Primers y ADN) para PCR por medio de montajes sucesivos probando distintas concentraciones para estos. A continuación, presentamos las concentraciones óptimas estandarizadas para un buen resultado en la amplificación del ADN levaduras:

Tabla 4. Estandarización de PCR Multiplex.

REACTIVO	C1 [] STOCK	C2 [] FINAL	Vol TUBO 1X
Buffer	5X	1.2X	6 µl
MgCl ₂	25mM	3 mM	3 µl
dNTPS	10 µM	0,24 mM	0,6 µl
PRIMERS	HPW1 F	10µm	0,5 µM
	HPW1 R	10µm	0,5 µM
	ALS3 F	10µm	0,5 µM
	ALS3 R	10µm	0,5 µM
	BCR1 F	10µm	0,5 µM
	BCR1 R	10µm	0,5 µM
	TEC1 F	10µm	0,5 µM
	TEC1 R	10µm	0,5 µM
Taq	5U	1.3U	0.26 µl
H ₂ O	-	-	0.14 µl
ADN	-	34.5 ng	5 µl
Vol FINAL	-	-	25 µl

Resultados del muestreo y el análisis poblacional:

Recurrencia:

De las muestras obtenidas el 62% fue de pacientes que presentaron CVV en dos ocasiones, 27% pacientes con tres episodios de CVV y 11% pacientes quienes presentaron cuatro episodios, entre febrero de 2018 a febrero de 2019. Teniendo en cuenta que la recurrencia está determinada a partir de tres episodios o más, contamos con un porcentaje de 38% de pacientes con CVVR.

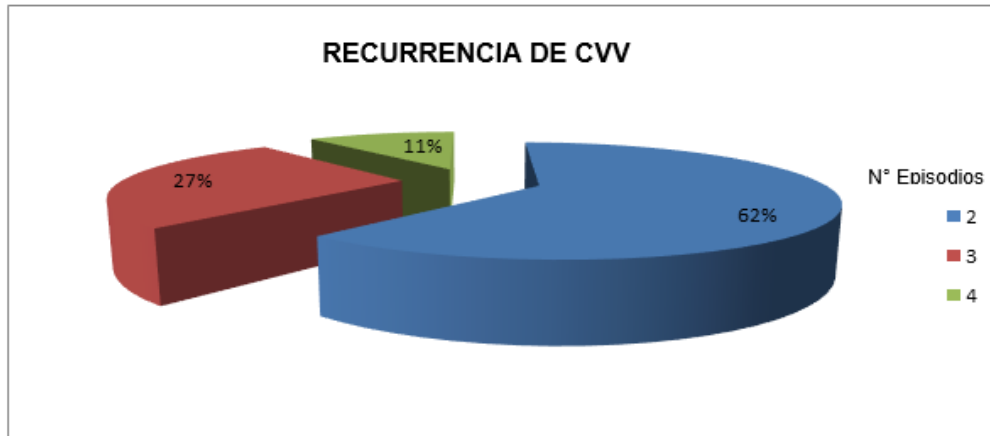


Figura 7. Porcentaje de la población segmentada según el número de episodios de recurrencia.

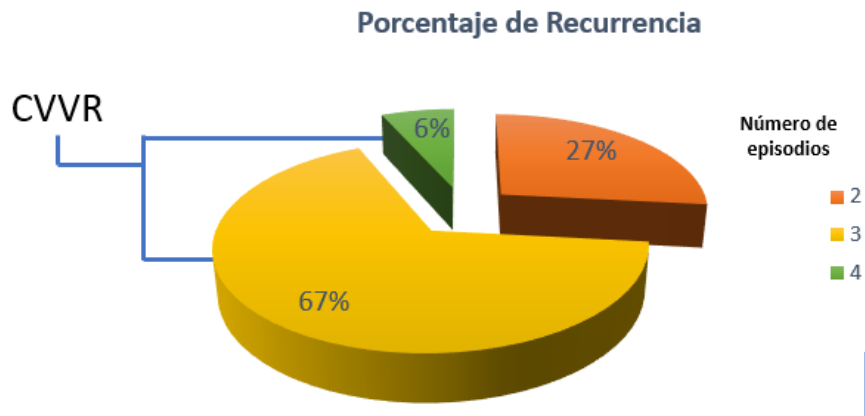


Figura 8. Porcentaje de recurrencia de las 15 muestras procesadas

Recurrencia asociada con la edad:

En cuanto a las características demográficas de la población, se encontró la relación entre edades de las pacientes y el número de episodios que presentaron en el último año. Se observa, que el mayor número de pacientes está segmentado en el grupo

etario de 24 a 29 años, independiente del número de episodios. Los demás grupos etarios se encontraron distribuidos de forma homogénea entre las recurrencias de 2 y 3 episodios, así mismo, en las recurrencias de 4 episodios. En esta última no se presentaron pacientes en el grupo entre los 30 y los 35 años.



Figura 9. Clasificación de recurrencia por edades entre febrero del 2018 y febrero del 2019.



Figura 10. Clasificación de recurrencia por edades entre febrero del 2018 y febrero del 2019 de las 15 muestras procesadas

Recurrencia de CVV asociada con el estado de gestación:

De los frotis de flujo vaginal revisados de las pacientes que consultan por sintomatología o control prenatal, se agruparon de acuerdo a la recurrencia que presentaron en el último año y a su estado actual.

De las 73 pacientes 62 estaban embarazadas; de estas, 38 presentaron dos episodios, 17 presentaron tres episodios y 7 de cuatro episodios. De las pacientes que consultaron por sintomatología y no por control prenatal, 7 presentaron dos episodios, 3 presentaron tres episodios y 1 cuatro episodios.



Figura 11. Recurrencia de CVV asociada con el estado de gestación.

Recurrencia y gestación

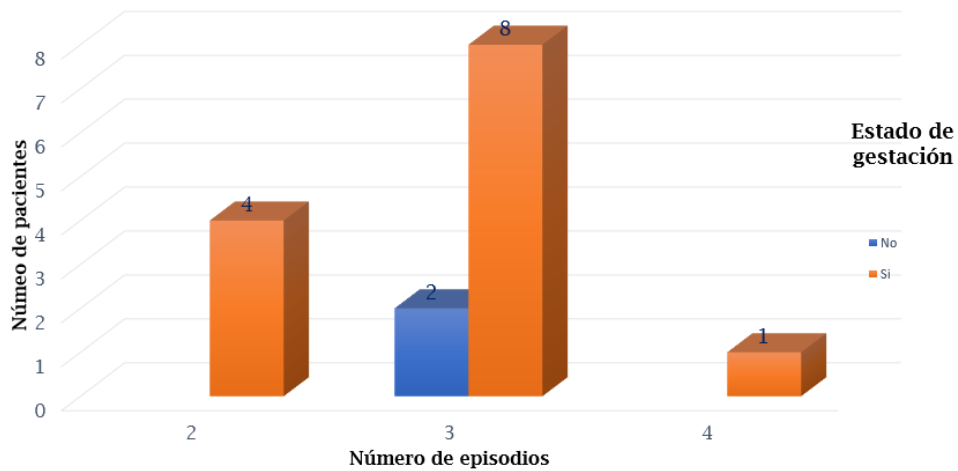


Figura 12. Recurrencia de CVV asociada con el estado de gestación para las 15 muestras procesadas

C. albicans y su relación con cambios en el pH vaginal:

En cuanto al análisis primario de las muestras se encontraron los resultados de pH y su relación con el crecimiento en cultivo, para esto, solo se tuvieron en cuenta las pacientes a las cuales se les ordenaron dichos exámenes, es decir, 59 pacientes.

De estas, se observó que el 63% de ellas tuvieron un pH de 6.0, de las cuales 21 mostraron crecimiento abundante de *C. albicans* y el 32% tuvieron un pH de 5.0, de las cuales 10 de ellas presentaron crecimiento abundante y 7 con crecimiento moderado.

También, se encontraron 3 pacientes con pH elevados (7.0 y 8.0), dos de ellas con crecimiento abundante de *C. albicans*.

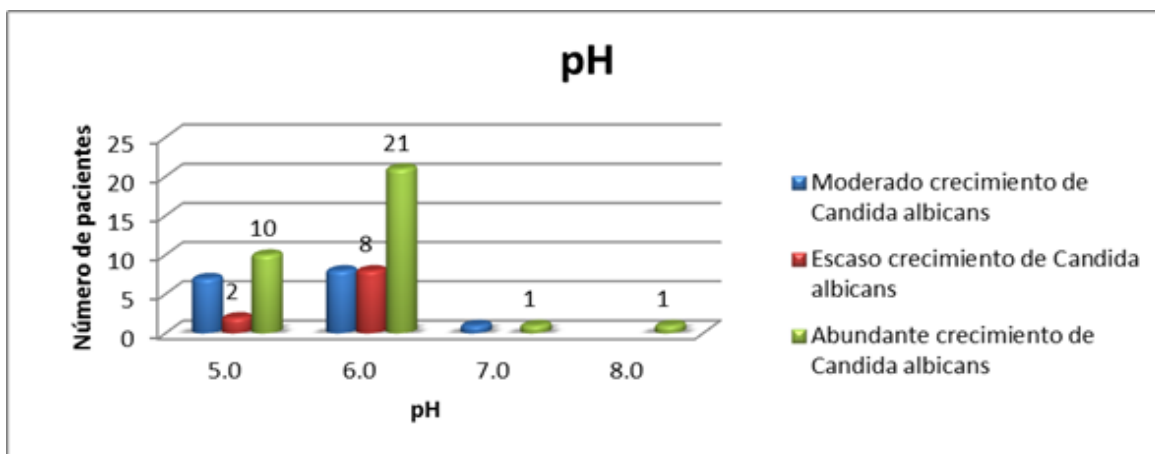


Figura 13. Crecimiento en cultivo según pH de la muestra

Vaginosis bacteriana vs candidiasis:

De las 73 muestras se realizó la lectura de fresco a 70 muestras. De acuerdo a la lectura de los frescos realizados en el laboratorio clínico, se dividieron las muestras en razón de la presencia o ausencia de células guía (criterio de diagnóstico para vaginosis bacteriana) y el resultado cualitativo de la lectura de levaduras y micelios. Se destacó que en presencia de vaginosis bacteriana el desarrollo de levaduras y micelios es menor en comparación con el grupo que no presenta células guía, aunque en ambos grupos el desarrollo y crecimiento de *Candida* no se vio afectado por la presencia o ausencia de agentes externos. El 77 % de las pacientes no presentó células guía, mientras que de éstas el 61% presentó un resultado positivo para levaduras y micelios. Por otro lado, el 23% de las 70 pacientes presentó células guía. De estas últimas el 57% no presentó levaduras y micelios.

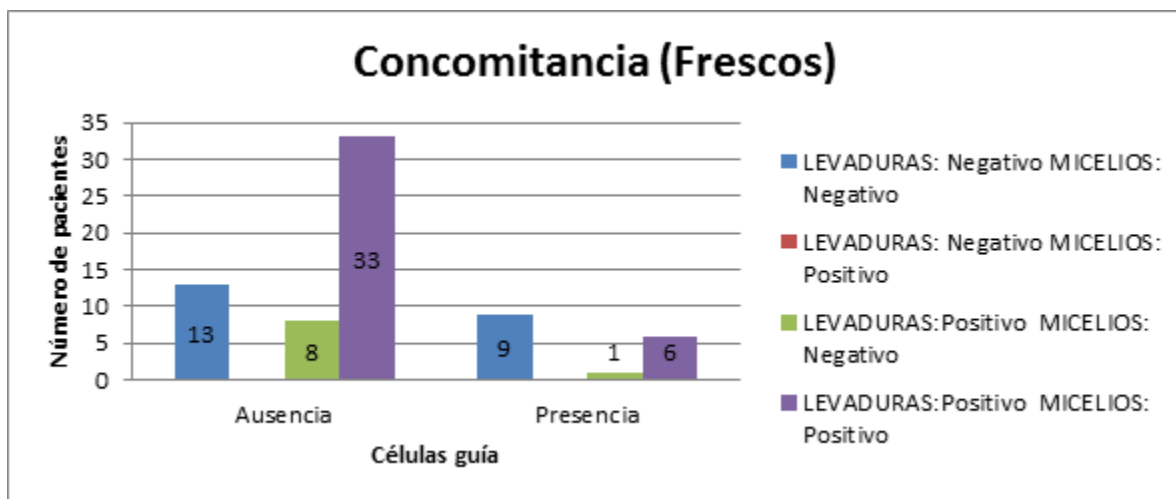


Figura 14. Vaginosis bacteriana versus candidiasis

Los aislamientos clínicos fueron obtenidos a partir de frotis de flujo vaginal y tubos germinales, que posteriormente se identificaron por técnica de MALDI-TOF MS dando como resultado *C. albicans* para las 15 muestras, con un nivel de confianza entre los rangos 98,5 - 99,9.

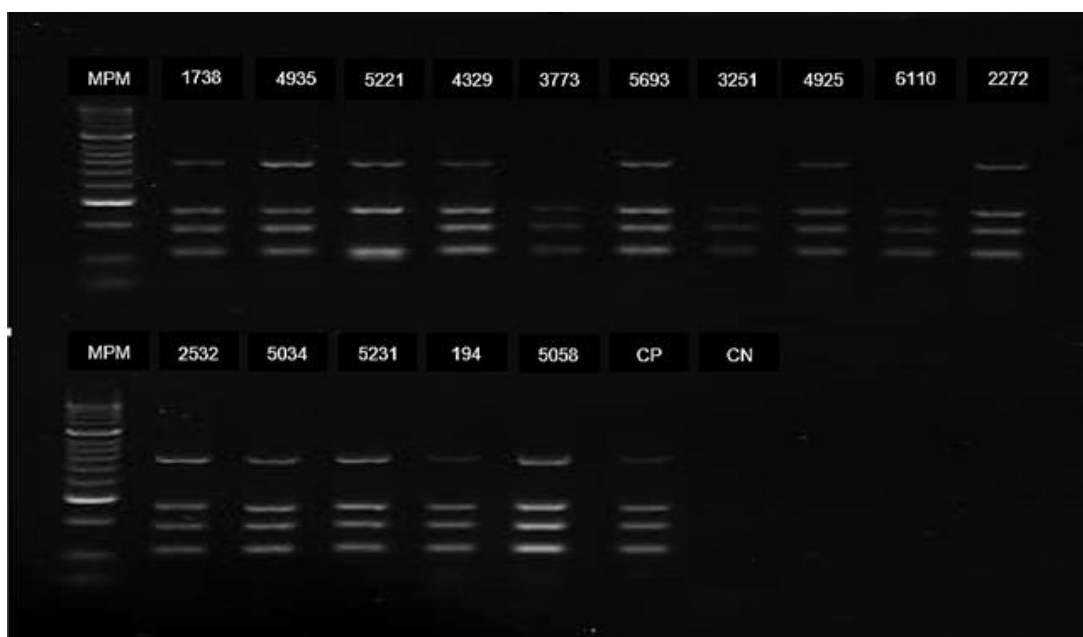
PCR Multiplex:

Por medio de PCR multiplex se amplificaron los siguientes genes:

Tabla 5. Tamaño (pares de bases) del gen amplificado por cada primer.

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

Se logró identificar la presencia de los cuatro genes a analizar en 11 muestras, 3 muestras presentaron los tres genes correspondientes a ALS3, HWP 1 y BCR 1, y 1 muestra presentó tres genes correspondientes a ALS3, BCR 1 y TEC 1.



Figur

a 15. 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.

Capacidad de formación de biopelícula (XTT)

Tabla 6. 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

De los 15 aislamientos procesados con XTT para el análisis de la formación de biopelícula, se observó que, según los resultados obtenidos, 14 de ellas fueron fuertemente formadoras de biopelícula y 1 moderadamente formadora. Esto se concluye a partir de la clasificación de Valentín y cols. (Valentín et al 2012) con modificaciones de Fernandez⁷⁷ para el análisis de reducción del XTT. Como controles se utilizaron: la cepa ATCC 10231 como control positivo y como control negativo medio RPMI el cual se utilizó como medio en la suspensión de las células usadas en dicho experimento.

Tabla 8. Resultados de la identificación de las muestras y clasificación de acuerdo a la capacidad de formación de biopelícula

Origen	Id Local	Código de identificación clínica	DO 492 de las mx	DO 492 - DO CN	CLASIFICACIÓN
<i>Cepa ATCC</i>	CP	CP	0,151	0,111	Moderadamente formadora
<i>RPMI</i>	CN	CN	0,034	0	NA
FFV	1	1738	0,251	0,211	Fuertemente formadora
FFV	2	4935	0,146	0,106	Moderadamente formadora
FFV	3	5221	0,232	0,192	Fuertemente formadora
FFV	4	20114329	0,298	0,258	Fuertemente formadora
FFV	5	3773	0,254	0,214	Fuertemente formadora
FFV	6	13105693	0,303	0,263	Fuertemente formadora
FFV	7	3251	0,257	0,217	Fuertemente formadora
FFV	8	4925	0,215	0,175	Fuertemente formadora
FFV	9	6110	0,279	0,239	Fuertemente formadora
FFV	10	2272	0,306	0,266	Fuertemente formadora
FFV	11	2532	0,321	0,281	Fuertemente formadora
FFV	12	5034	0,357	0,317	Fuertemente formadora
FFV	13	3105231	0,270	0,277	Fuertemente formadora
FFV	14	194	0,317	0,230	Fuertemente formadora
FFV	15	5058	0,243	0,203	Fuertemente formadora

Producción de biopelícula de las muestras de pacientes con Candidiasis vulvovaginal recurrente:

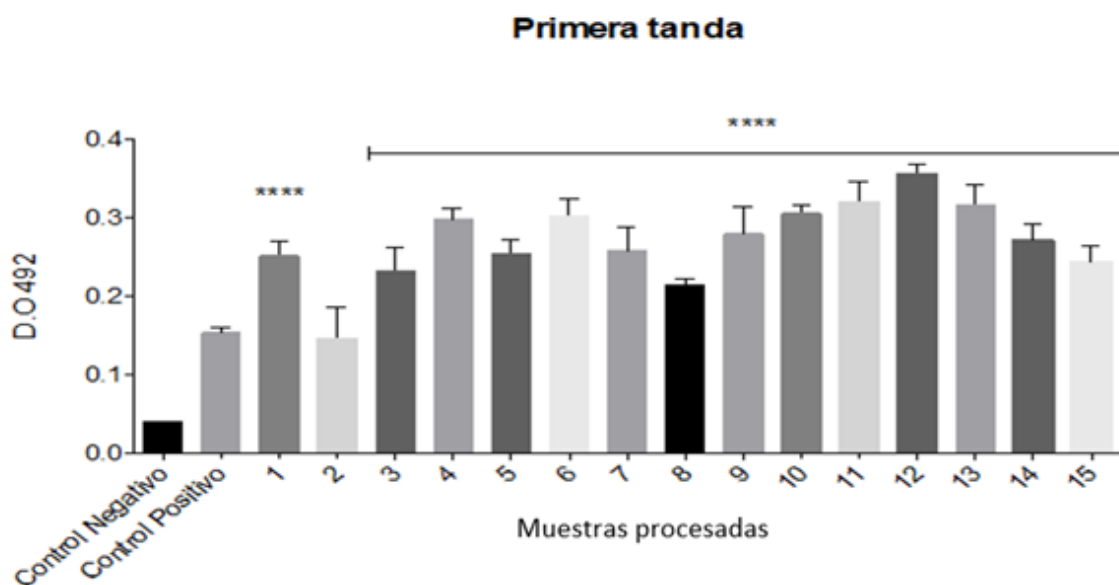


Figura 16. Resultados de D.O. con XTT para determinar la formación de biopelícula. Producción de biopelícula de las muestras de pacientes con Candidiasis vulvovaginal recurrente, se utilizó como control positivo la producción de biopelícula por la cepa ATCC 10231. Los experimentos fueron realizados en quintuplicado y fue aplicado el test estadístico de ANOVA con un pos test de múltiple comparación, Dunnett's. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

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

De acuerdo a los cálculos realizados, el 93% de las muestras fueron fuertemente formadoras y el 7% moderadamente formadoras.

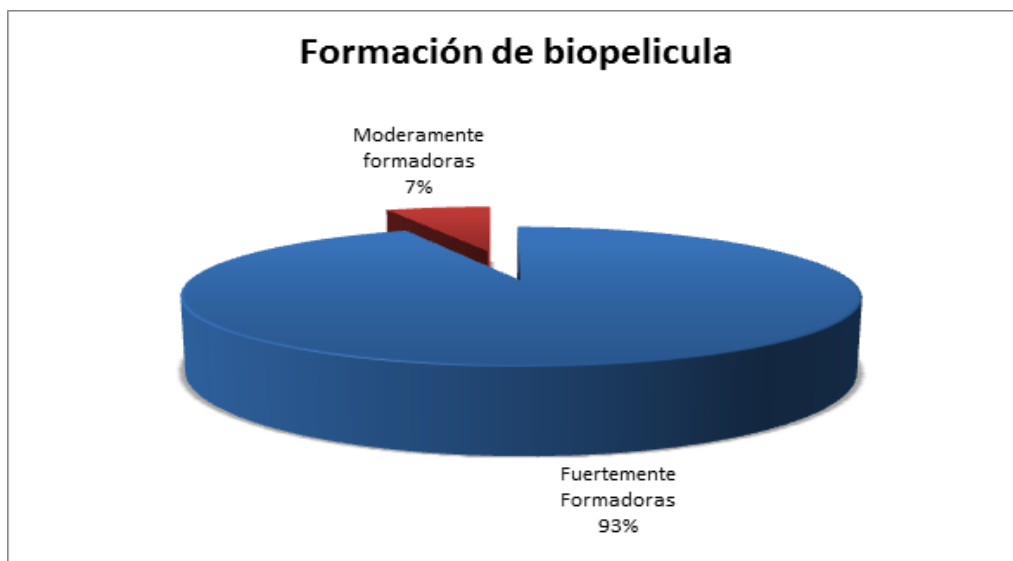


Figura 17. Cepas con capacidad formadora de biopelícula de acuerdo a la clasificación de Valentín y cols. (Valentín et al 2012) con modificaciones de Fernández⁷⁷.

ZZ

Tabla 9. D.O. de las 15 muestras organizadas de menor a mayor y comparadas con el número de genes presente.

DO	Id MX	Número de genes
0,106	2	4
0,175	8	4
0,192	3	3
0,203	15	4
0,211	1	4
0,214	5	3
0,217	7	3
0,230	14	4
0,239	9	3
0,258	4	4
0,263	6	4
0,266	10	4
0,277	13	4
0,281	11	4
0,317	12	4

Tabla 9. Consolidado de resultados.

#	Casos	Maldi TOF	D.O.	D.O.-CN	Clasificación	ALS3	HWP1	BCR1	TEC1	Genes
1	3	<i>C.albicans</i>	0,251	0,211	Fuertemente Formadoras	Presente	Presente	Presente	Presente	4 genes
2	3	<i>C.albicans</i>	0,146	0,106	Moderamente formadoras	Presente	Presente	Presente	Presente	4 genes
3	3	<i>C.albicans</i>	0,232	0,192	Fuertemente Formadoras	Presente	Ausente	Presente	Presente	3 genes
4	3	<i>C.albicans</i>	0,298	0,258	Fuertemente Formadoras	Presente	Presente	Presente	Presente	4 genes
5	2	<i>C.albicans</i>	0,254	0,214	Fuertemente Formadoras	Presente	Presente	Presente	Ausente	3 genes
6	2	<i>C.albicans</i>	0,303	0,263	Fuertemente Formadoras	Presente	Presente	Presente	Presente	4 genes
7	3	<i>C.albicans</i>	0,257	0,217	Fuertemente Formadoras	Presente	Presente	Presente	Ausente	3 genes
8	3	<i>C.albicans</i>	0,215	0,175	Fuertemente Formadoras	Presente	Presente	Presente	Presente	4 genes
9	3	<i>C.albicans</i>	0,279	0,239	Fuertemente Formadoras	Presente	Presente	Presente	Ausente	3 genes
10	2	<i>C.albicans</i>	0,306	0,266	Fuertemente Formadoras	Presente	Presente	Presente	Presente	4 genes
11	3	<i>C.albicans</i>	0,321	0,281	Fuertemente Formadoras	Presente	Presente	Presente	Presente	4 genes
12	2	<i>C.albicans</i>	0,357	0,317	Fuertemente Formadoras	Presente	Presente	Presente	Presente	4 genes
13	3	<i>C.albicans</i>	0,317	0,277	Fuertemente Formadoras	Presente	Presente	Presente	Presente	4 genes
14	4	<i>C.albicans</i>	0,270	0,230	Fuertemente Formadoras	Presente	Presente	Presente	Presente	4 genes
15	3	<i>C.albicans</i>	0,243	0,203	Fuertemente Formadoras	Presente	Presente	Presente	Presente	4 genes

Recurrencia y biopelícula

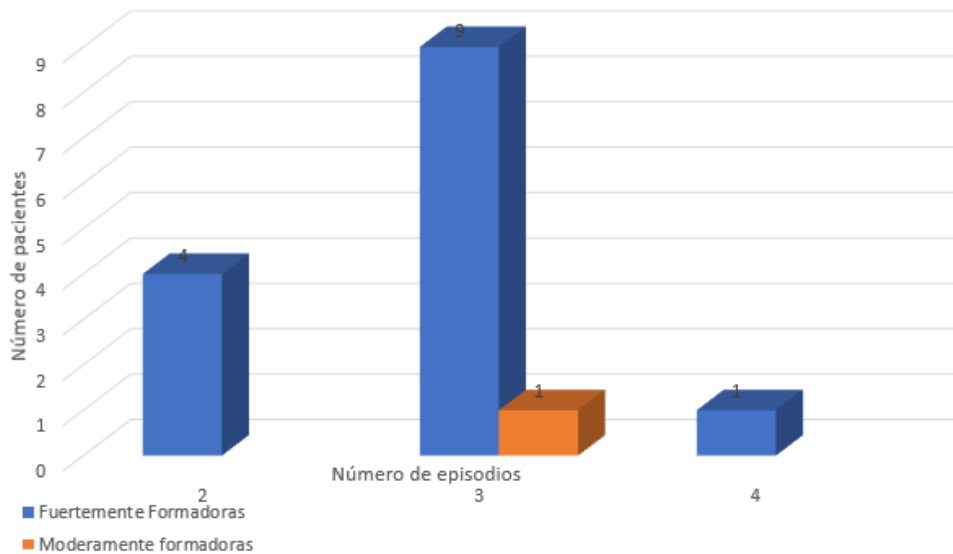


Figura 18. Relación entre la recurrencia (número de episodios) con la capacidad de formación de biopelícula

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

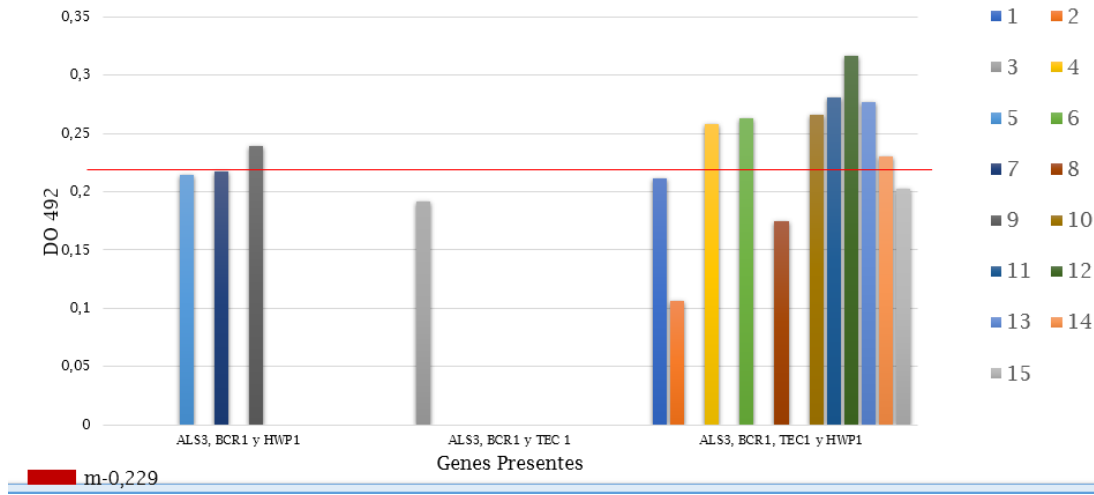


Figura 19. Formación de biopelícula en relación a la presencia de los genes seleccionados

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

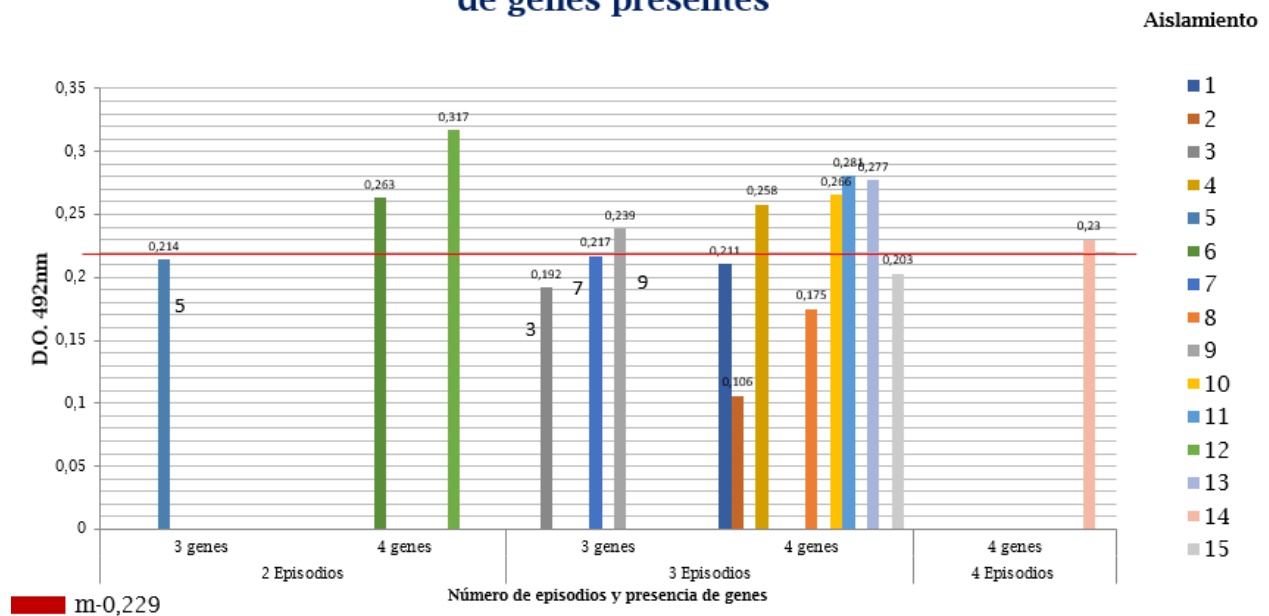


Figura 20. Correlación recurrencia, el número de episodios y el número de genes presentes.

9.0 DISCUSIÓN:

La Candidiasis vulvovaginal recurrente tiende al incremento y en la práctica clínica se ha convertido en un desafío. La revisión efectuada de las pacientes seleccionadas conlleva a una evaluación exhaustiva de la historia clínica, en las cuales se evidencian determinadas limitaciones respecto a los criterios de inclusión pues, se encuentra que la mayoría de las pacientes con CVV 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.

Así mismo, es evidente que los exámenes no son ordenados de forma estándar, es decir, que algunas pacientes se les solicitó cultivo de FFV mientras que a otras solo se les solicita los frescos y además en episodios particulares, hay pacientes a las cuales se les encuentra levaduras y micelios en el Gram de orina, lo cual podría llegar a relacionarse con CVV, pero al no ser prueba estándar, las pacientes no son examinadas a fondo ni diagnosticadas de forma precisa.

Otra de las limitaciones, es que se desconoce el perfil de resistencia antifúngica presentado en los episodios anteriores, así como el tratamiento prescrito o el manejo que se le da a la infección, ya que la recurrencia de *Candida* bien puede ser por factores intrínsecos en la expresión de este agente, por un medicamento ineficaz, o negligencia en el tratamiento por parte del paciente, lo que colectivamente sesga el análisis.

En cuanto a la estandarización de la PCR multiplex, cabe destacar la importancia de tener en cuenta el tipo de microorganismo a trabajar al momento de hacer este tipo de PCR, puesto que son varios los factores que influyen para obtener una amplificación óptima. En el caso de *Candida*, 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 ^{100,101} en el cual se analiza la ocurrencia de contaminación con DNA fúngico en reactivos para PCR y se buscan mecanismos para la descontaminación de estos. En este trabajo, mencionan que las conidiosporas en el aire y pequeñas cantidades de DNA fúngico son una importante

fuentes de contaminación. En sus resultados identifican la presencia de ADN fúngico en primers liofilizados y sondas TaqMan, en master mixes para PCR en tiempo real provenientes de casas comerciales reconocidas y para resolver el problema utilizan DNAsas y otros descontaminantes, afianzando así mismo el resultado de contaminación. Para nuestro caso, se corrige la contaminación cambiando todos los reactivos de PCR puesto que este tipo de ADN dificulta la identificación del reactivo contaminado.

Como se ha mencionado la CVV es monomicrobiana, sin embargo, su causa es multifactorial. En la presente investigación se logra detectar a partir de las historias clínicas la influencia de factores como la edad, estado de gestación, cambios en la microbiota vaginal y variación del pH.

La recurrencia fue un criterio de inclusión difícil de cumplir puesto que muchas de las pacientes con candidiasis no consultan frente a un nuevo episodio, así como no se hacen los exámenes pertinentes y en algunos episodios incluso llegan a automedicarse. El porcentaje de episodios con CVV (2) episodios fue de un 62% (45), valor elevado, sin embargo, proveían muy poca información en su historia clínica; a diferencia de los episodios que cumplen para CVVR, que presentaron resultados con mayor información tanto de cultivos como frescos. Sin embargo, el número de pacientes no fue el esperado, pues tan solo el 38% del total corresponde a CCVR.

Al relacionar la recurrencia de las pacientes y su edad, se observa que el grupo etario con mayor número de episodios es el de 24 a 29 años seguido por las pacientes de 16 a 23 años, lo cual se correlaciona con lo que dice David W Denning *et al.* en su artículo, menciona que el grupo de edad de 25 a 34 años tiene la prevalencia más alta en CVV, rango cercano a nuestro grupo etario. Este rango de 24 a 29 años tiene relación parcialmente causal con la característica dada por la fertilidad de dichas edades y la frecuencia sexual media para dicho grupo ¹⁰².

En cuanto a otras condiciones, se resalta que la mayoría de los episodios tanto de CVV como CVVR son de pacientes gestantes, llevando a deducir una relación causal de tipo

biológico o que dichos resultados se encuentran dispuestos de esta manera debido a que las pacientes gestantes en cumplimiento de sus controles prenatales permiten un seguimiento óptimo de la evolución de la infección haciendo más evidente la ocurrencia de episodios. Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente, el estado de gestación se encuentra relacionado con la deficiencia de la respuesta inmune celular debida a la inmunosupresión biológica debida al embarazo, o también a la presencia estimulante de hormonas como el estrógeno; así como lo sustenta la investigación realizada por Aguin, T. J., & Sobel, J. D, 2015 ^{49,102}; donde se expone que las mujeres embarazadas tienen más probabilidades de tener infecciones vaginales sintomáticas causadas por *Candida* durante el segundo y tercer trimestre del embarazo y que esta se encuentra asociada con factores intrínsecos del embarazo como lo son alteraciones inmunológicas, aumento de los niveles de estrógeno y aumento de la producción de glucógeno vaginal ¹⁰², coincidiendo igualmente con los resultados aquí obtenidos donde el 85% de las pacientes con CVV están embarazadas y de estas el 11% presenta CVVR.

En cuanto a pH se encuentra que el 95% de las muestras tenían un pH entre 5 y 6 lo cual se encuentra sustentado por otros estudios en los que se halla una relación entre el crecimiento y colonización de *Candida spp.* en pH primordialmente ácido (4.5-5)¹⁰³. *C. albicans* tiene la facultad de adaptarse y crecer en situaciones de pH extremo, gracias al gen PHR1 cuya función es sintetizar la pared celular, este gen a pH neutro se expresa al máximo; sin embargo, a un pH ácido su expresión se inhibe; a pesar de ello, *C. albicans* posee la capacidad de transformarse para llevar a cabo su función en un pH de 2 a 4; no obstante como se observa en la Figura 10., 31 pacientes presentaron abundante crecimiento de *Candida* a un pH ácido entre 5 y 6 pero tres pacientes presentan un resultado de pH alcalino (7 y 8) con un crecimiento abundante de la levadura, esto se puede bien relacionar ya sea a la expresión genética del gen PHR1 o a que la levadura esté asociada con bacterias, pues como explica Sánchez J. A et al, 2017, cuando *C. albicans* no se asocia a bacterias aumenta la acidez del pH (menor a 4), provocando la aparición de síntomas; si se asocia a bacterias será mayor a 4.7 ¹⁰³. Este pH alcalino no es el acostumbrado en casos de CVV, puesto que como

observamos su actividad metabólica tiene tendencia a la acidificación del pH vaginal. Aparte de las razones anteriores, algunos autores también destacan que las relaciones sexuales son un factor que también influye, reportan que la frecuencia de éstas, mayor a una vez por semana, se asocia a la disminución del H₂O₂ producido por los lactobacilos, lo cual puede deberse a que el semen cambia el pH de la vagina alcalinizándolo hasta por 10 horas ^{104, 105}. De manera que con los resultados obtenidos se determina que el crecimiento de *C. albicans* es independiente del pH vaginal en que se encuentre, puesto que 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, pero que aun así cuenta con la capacidad de adaptarse al medio ¹⁰⁶.

En los frotis aparte de observar estructuras micóticas, se pudo evidenciar la presencia de células guía lo cual indicaba que la paciente a parte de presentar una candidiasis, estaba cursando por un vaginosis bacteriana ya que las células guía se consideran un criterio diagnóstico de dicha patología como se describe en el artículo: Actualización sobre vaginosis bacteriana en el que se tiene como parámetro diagnóstico los criterios de Amsel ¹⁰⁷.

En los resultados obtenidos teniendo en cuenta el número de pacientes asociados a presencia y ausencia de células guía versus candidiasis, se observa que, en el momento de la ausencia de estas, la proliferación de micelios y levaduras es mayor, pero en presencia de estas *Candida* presenta un crecimiento bajo y número menor de episodios, aunque aun así logra desarrollarse de manera normal.

En nuestros resultados pudimos identificar que la candidiasis es la infección que se presenta con mayor frecuencia frente a la *Gardnerella* o en conjunto refiriéndose a una infección mixta, esto podemos corroborarlo con un estudio del artículo: “prevalencia de trichomonas vaginalis, candida albicans y gardnerella vaginalis en mujeres sin síntomas de vaginitis” ¹⁰⁸ donde la infección más frecuente fue la candidiasis, en 45 pacientes, lo que representaba el 25,14 % de todos los diagnósticos realizados y a continuación vaginosis bacteriana. También exponen que *C.albicans* es responsable del 80 al 90%

de la vaginitis por hongos, pero que actualmente se han aislado levaduras emergentes relacionadas con episodios de candidiasis vulvovaginal recurrente.

Aun así, es necesario destacar que las infecciones vaginales independiente del microorganismo que sea, van a presentarse siempre y cuando haya una alteración del microambiente, pero cada uno de estos va a tener características diferentes o similares que promuevan la facilidad o dificultad de su diagnóstico como lo expone el artículo “Vaginosis bacteriana y vaginitis por *Candida* spp.: ¿diagnósticos contradictorios o compatibles?”^{6, 105}.

En cuanto a la identificación de los aislamientos por medio de la técnica de MALDI-TOF MS, obtuvimos que el 100% de las muestras correspondió a *C. albicans* con un nivel de confianza del 98,5-99.9%. Sin embargo, cabe destacar que la muestra no es suficientemente significativa para afirmar que la especie más prevalente sea *C. albicans* en la candidiasis vulvovaginal recurrente puesto que la revisión literaria realizada a lo largo de este proyecto indicó que hay otras especies involucradas en dicha patología^{86,87}.

Respecto a la relación de los genes con la biopelícula se puede observar que en promedio las muestras con DO más alta, fueron las cepas que presentaron los 4 genes relacionados, exceptuando a las cepas número 2, 8, 1 y la cepa 15 quienes presentaron una DO menor a las demás con cuatro genes (14, 4, 6, 10, 13, 11, 12) que en conjunto tienen un promedio de 0,270 que para la media general (0,229) es considerablemente alto. Estas cuatro cepas (2, 8, 1 y 15) aunque tuvieron los cuatro genes asociados, no cuentan con una DO comparable con las de su misma clase poniendo en discusión la influencia de otros factores como la expresión genética de los mismos o de otros genes, condiciones de base u otras variables que pudieron ser determinantes para la formación de biopelícula y que no pudieron ser evaluados en este trabajo^{76,77}.

Por otro lado, encontramos las cepas 3, 5, 7 y 9, que solo mostraron tres de los genes asociados, siendo la cepa 3 la más interesante debido a que fue la tercera cepa con DO más baja y la única cepa que no tuvo banda para el gen HWP1 esencial para el apareamiento, el desarrollo hifal normal, las funciones adhesivas de célula a célula necesarias para la integridad del biofilm, la unión al huésped y la virulencia.

También es importante resaltar que los valores de DO presentados por las cepas 5, 7 y 9 fueron considerablemente cercanos y similares: 0,214 0,217 y 0,239; de igual manera se sustenta el resultado con la presencia de las mismas tres bandas (ALS3, HWP1 y BCR1) para las tres cepas; dando lugar al análisis de impacto que determina la ausencia de TEC1 (implicado en morfogénesis hifal) ya que si bien las lecturas de DO para estas muestras no fueron las más bajas sí estuvieron por debajo de la media de aquellas con los cuatro genes relacionados y por lo mismo se corrobora con lo descrito por Panariello B. et al ¹⁰⁶. donde precisamente se destaca que la inactivación del gen TEC1 en *C. albicans* influye en la composición de la matriz extracelular y la morfología del biofilm. Destaca un experimento en el que demuestran que la ausencia del factor de transcripción Tec1 producido por una cepa mutante nula *tec1* (Δ / Δ *tec1*) presentó una biopelícula rudimentaria, con menos de 20 μm de profundidad y compuesto por células de levadura, mientras que su cepa parental formó un biofilm de 250–450 μm de profundidad que incluía muchos filamentos hifales ¹⁰⁶. Por lo tanto, las cepas mutantes defectuosas en los genes de filamentación TEC1 siendo la cepa 5, 7 y 9, se podrían considerarse menos virulentas que sus homólogos y que presentan niveles reducidos de infectividad en las células endoteliales ¹⁰⁶.

Igualmente es importante resaltar que la constante presencia de BCR1 y ALS3 son indicativos importantes para la formación de la biopelícula, pues como se evidenció en los resultados de XTT y PCR relacionados, el 97% de las muestras fueron fuertemente formadoras y el 7% restante moderadamente formadora y a su vez en la PCR el 100% de ellas mostraron banda para los genes BCR1 y ALS3, lo cual indico que estos genes juegan un papel fundamental en el proceso de formación de biopelícula, como se menciona en el trabajo realizado por Clarissa J Nobile, et.al. Donde se explica que la

expresión de BCR1 y ALS3 está íntima y mutuamente relacionadas puesto que en sus ensayos con mutantes de ambos genes se evidenció que las cepas con el mutante de ALS3 son capaces de formar biopelícula *in vivo* debido a la capacidad de BCR1 de compensar el defecto de ALS3 por medio de la señalización alternativa por parte de genes como HWP1.^{4,110} Y que así mismo, en las cepas con BCR1 mutante las vías alternativas son capaces de restablecer parcialmente la formación de la biopelícula *in vitro*. Sin embargo, se deja claro que el ALS3 es medida y gobernada por la expresión de BCR1. Por lo cual, se presenta estos genes como un blanco terapéutico potencial, enfocado principalmente al BCR1 uno quien es el gen mandatorio para la formación de biopelícula ^{107,110}.

Por último, la recurrencia como se ha mencionado anteriormente es uno de los aspectos que define la patogenicidad de la CVV y hallar la causalidad de ésta en la formación de biopelícula y la presencia de los genes seleccionados, es el objetivo principal de este trabajo; por lo cual, hacemos la relación entre las variables, “recurrencia”, “genes asociados” y “Formación de biopelícula”.

El 60% de las pacientes con CVVR (3 y 4 episodios) presentaron banda para los 4 genes, el restante 20% con CVVR presento 3 genes y por otro lado las pacientes con CVV (2 episodios) presentaron banda para 3 y 4 genes siendo el 6.7% y el 13.3% de la muestra respectivamente. Por lo cual, se infiere que efectivamente el porcentaje de pacientes con mayor número de episodios presentó bandas para los cuatro genes analizados; sin embargo, está el resultado de la formación de biopelícula visto desde la D.O que arrojó, en donde se puede ver que el comportamiento de la formación de biopelícula no es tan claro, ya que como observamos en la clasificación dada por el XTT todas son fuertemente formadoras a excepción de una y en la Figura 16. observamos que la D.O. no se ve directamente influenciada ni por la recurrencia, ni por la presencia de genes ¹¹⁰.

Si bien es cierto que la D.O. fue más alta para las muestras de pacientes con CVVR y la presencia de 4 genes, fue evidente también que las muestras de pacientes con 2

episodios y presencia de 4 genes tuvo D.O alta al igual que las de cuatro episodios , por lo cual es importante mencionar que estas son las muestras que tienen mayor potencial para generar recurrencia y que probablemente aunque no tengan más episodios documentados, ya sea por falta de consulta médica, automedicación o que efectivamente presenten solo dos episodios, la cepa infectante es suficientemente patógena a nivel genotípico y fenotípico, pues demuestro que además de tener los genes, es capaz de expresarlos eficientemente en forma de biopelícula, y ya que en este trabajo no se pudo analizar la expresión genética es difícil saber si este es el factor que determina la diferencia entre estas cepas y sus pares con bandas para los 4 genes.

En contraste, no se puede pasar por alto que dos de las cepas con CVVR y presencia de los 4 genes, arrojó una D.O. menor a las demás de su grupo (Figura 16., 3 episodios - 4 genes), por lo cual no se halló una relación clara entre la presencia de los genes, la recurrencia y la formación de biopelícula sustentando así la afirmación anterior respecto a la expresión genética o la influencia de otras variables no analizadas.

Los resultados obtenidos en concordancia con lo reportado por diferentes autores permiten evidenciar que BCR1 juega un papel importante en el desarrollo de la biopelícula y que a su vez puede interactuar con otros genes como HWP1, TEC1 y ALS3 ¹¹⁰. No obstante, es importante mencionar que estos no son los únicos involucrados en el proceso de formación y permanencia de la biopelícula, por lo que sería interesante realizar un estudio más exhaustivo, incluyendo un panel más amplio de genes y su vez un análisis de expresión de estos, ya que en nuestro estudio se realizó la búsqueda de la presencia o no de genes, pero no se determinó la expresión de estos.

6.0 CONCLUSIONES

Las infecciones asociadas con biopelículas fúngicas han cobrado una gran relevancia en los últimos años, como el caso de la candidiasis por *C.albicans*, quien por ser el agente responsable de la mayoría de las infecciones micóticas en los seres humanos está en el centro de muchos estudios. En el presente trabajo se destaca la correlación entre la capacidad patogénica de la levadura, analizada desde su genotipo (presencia-ausencia de genes), su fenotipo (formación de biopelícula) y la recurrencia con la que se presentó la infección.

La espectrometría de masas MALDI-TOF ha demostrado ser una tecnología precisa y rápida para la identificación de microorganismos. Este método logró identificar que el 100% de las muestras clínicas con CVV y CVVR eran *C.albicans*. Se concluye que la identificación de microorganismos directamente de muestras biológicas por espectrometría de masas MALDI-TOF ofrece una ventaja sobre los procedimientos de microbiología tradicionales basados en el cultivo. Se debe tener en cuenta que aunque en este trabajo el 100% de las muestras fueron *C.albicans* actualmente se registra un auge de los casos de CVVR ocasionados por especies no albicans.

Igualmente, el ensayo XTT sigue siendo una herramienta valiosa para examinar el comportamiento de las levaduras, se logró analizar la actividad metabólica de las células de *C.albicans*, obteniendo que el 93% de las muestras fueron fuertemente formadoras y el 7% moderadamente formadoras. Independientemente de la técnica que se use existe una estrecha correlación entre las mediciones obtenidas y el

metabolismo de la célula; sin embargo, se debe tener en cuenta que la formación de biopelículas depende de la especie, se ha reportado incluso que cepas de la misma especie de *Candida* en distintos ensayos tienden a metabolizar el XTT de diferente manera, lo que resulta en lecturas variables; por lo cual es importante realizar este ensayo mínimo por triplicado en nuestro caso se realizó por quintuplicado.

Se encontró que, aunque la relación entre la presencia de los genes, la formación de biopelícula y la recurrencia no es suficientemente clara, si fue evidente la complementariedad de los genes seleccionados, pues se demostró y corroboró bibliográficamente; como ALS3 se complementa con HPW1, como ambos dependen de BCR1 y este a su vez de la expresión de TEC1. Se demostró la diferencia entre la formación de biopelícula para las cepas con tres y cuatro genes, no sin tener en cuenta que se requiere más muestras para obtener una mayor significancia estadística y que para determinar de forma contundente el papel de cada gen en la formación de biopelícula y así mismo de la recurrencia es necesario realizar estudios más profundos tales como la expresión de los genes ya definidos y de otros que también puedan estar implicados no solo en la formación de biopelícula si no en otros mecanismos de resistencia.

Se resalto el papel de factores intrínsecos de cada paciente, hallando una correlación importante entre variables como la edad, el embarazo, el pH y la concomitancia, se observaron ligeras tendencias hacía condiciones como el estado de gestación, el pH de 5.0, edades entre 24 y 30 años entre otros. Se concluyó que la mayor prevalencia de especies está centrada en *C. albicans* pues fue el 100% de la muestra y además de esto se identificaron las limitaciones administrativas para lograr establecer una mejor relación causal para la patogenicidad de la CVVR, tales como el infrareporte y la falta de seguimiento, la heterogeneidad de los exámenes ordenados a las pacientes y a su vez la diversidad en cuanto a los estándares de validación de resultados.

Finalmente, al igual que en los estudios previos, se observó que la versatilidad y resiliencia de la *C. albicans* como patógeno, refleja contundentemente su persistencia frente a diversos ambientes y situaciones de estrés, en las que, por medio de sus

circuitos transcripcionales, logra adaptarse y resistir convirtiéndose en un microorganismo patógeno de gran importancia a nivel clínico.

7.0 REFERENCIAS

1. Buitrón García R, Bonifaz A, Amancio Chassin O, Basurto Kuba E, Araiza J, Romero Cabello R. Correlation between clinical characteristics and mycological tests in the vulvovaginitis by *Candida*. Ginecol Obstet Mex [Internet]. 2007 [Consulted 2018 Sep 5]; Vol. 75(2):68–72. Available in: <http://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2007/gom072c.pdf>
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>

3. Edith Ángel-Müller, M.D, María Patricia González, MSP., Lilian Núñez, Jorge Pacheco, Jorge E. Tolosa, M.D., M.Sc., Luz Amparo Díaz, M.D., Elkin Osorio, M.D., M.Sc., Ariel Ruiz-Parra, M.D., M.Sc., Hernando Gaitán-Duarte, M.D., M.Sc,A. Pilot study of the frequency of genital tract infection in symptomatic women and the use of rapid diagnostic tests in two groups of women from Bogotá, Colombia,2008. Rev Col. de Obst. Y Gine [Internet]. 2010 [Consulted 2018 Sep 02]; Vol. 61(3). Available in: <http://www.redalyc.org/html/1952/195215351006/>
4. Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yue F, Phan Q-T, et al. Critical Role of Bcr1-Dependent Adhesins in *C. albicans* Biofilm Formation In Vitro and In Vivo. PLOS Pathogens [Internet] 2006 [Consultado 2019 Abr 08]; Vol. (2):e63. Available in: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0020063>
5. Gunther LSA, Martins HP, Gimenes F, et al. Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. São Paulo Med J [Internet]. 2014 [Consultado 2019 Abr 08]; Vol. (132):116–20. Disponible en:http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S151631802014000200116&script=sci_arttext
6. Aspiroza C, Navarro C, Boned B. Vaginosis bacteriana y vaginitis por *Candida spp.*: ¿diagnósticos contradictorios o compatibles?. Elsevier [Internet] 2000 [Consultado 2019 Abr 08]; 20, 164-174. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-vaginosis-bacteriana-vaginitis-por-Candida-8537>

7. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. Cell Microbiology [Internet]. 2006 [Consulted 2017 Sep 17]; Vol. 8(9):1382–91. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16848788>
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>
9. Castañón L. CANDIDIASIS o CANDIDOSIS. UNAM [Internet]. [Consultado 2018 sep 2]. Disponible en : <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
10. García-Sánchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo J-M, D'Enfert C. *Candida albicans* Biofilms: a Developmental State Associated With Specific and Stable Gene Expression Patterns. American Society for microbiology [Internet]. 2004 [Consulted 2017 Sep 17]; Vol. 3(2):536–45. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075282>
11. Burton, E., Yakandawala, N., LoVetri, K., & Madhyastha, M. S. . A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology [Internet]. 2006 [Consulted 2019 Mar 05]; Vol. 34(1):1–4. Disponible en: https://www.academia.edu/28413940/A_microplate_spectrofluorometric_assay_for_bacterial_biofilms
12. García-Effron G, Lee S, Cleary JD, Perlin DS. Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutation on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. Antimicrob Agents

Chemother [Internet]. 2009 [Consulted 2019 Mar 05]; Vol. 53:3690-3699. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2737881/>

13. González A, Tobón A. Infecciones micóticas oportunistas en pacientes con VIH/SIDA. Infection [Internet]. 2006 [Consultado 2018 Ago 25]; Vol. 10(4): 279-288. Disponible en : <http://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/188/164>

14. Min K, Ichikawa Y, Woolford CA, Mitchell AP. *Candida albicans* Gene Deletion with a Transient CRISPR-Cas9 System. mSphere [Internet]. 2016 [Consulted 2017 Oct 22]; Vol. 1(3) Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27340698>

15. Lacaz, C.S. Tratado de Micología médica. Rev. Inst. Med. trop [Internet]. 2002 [Consultado 2018 Ago 25]; Vol. 44 (5):297-298 Disponible en : https://www.researchgate.net/publication/26345561_Tratado_de_Micologia_Medica_Lacaz

16. Bedout C, Gómez B. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. Infectio [Internet]. 2010 [Consultado 2018 Ago 26]. ; Vol. 14(S2): S159-S171. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14s2/v14s2a08.pdf>

17. Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). Crit Care Med. [Internet]. 2009. [Consultado 2018 Ago 26]

Vol. 37:1612- 1618. Available in: <https://www.elsevier.es/es-revista-infectio-351-articulo-Candida-candidiasis-invasora-un-reto-S0123939210701338>

18. Cletus Kurtzman J.W. Fell. The yeasts, a taxonomic study. Elsevier Science 4. ed. Amsterdam, Elsevier, 1998. eBook ISBN: 9780080542690.

19. Leguizamon Rodriguez G, Fiori A, Lopez L, Gomez B, Giraldo Parra C, Gomez Lopez A, Suarez C, Ceballos A, Van Dijck P, Patarroyo M, et al. Characterising atypical *Candida albicans* clinical isolates from six third-level hospitals in Bogotá, Colombia. BMC microbiology [Internet]. 2015 [Consulted 2018 Sep 05]; Vol 15 (199). Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4594647/>

20. GRAF, B.; ADAM, T.; ZILL, E. & GOBEL, U.B. Evaluation of the VITEK system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. J. clin. Microbiol [Internet]. 2000 [Consulted 2018 Ago 27]; Vol. 38 (5): 1782-1785. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86587/>

21. Santos G, Teixeira E, Baroni F. An evaluation of manual and mechanical methods to identify *Candida spp.* from human and animal sources. Rev Inst Med Trop S Paulo [Internet]. 2006 [Consulted 2018 Ago 27]; Vol. 48(6):311-5. Available in: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652006000600002

22. N. Maldonado, et al. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. Infectio [Internet]. 2018 [Consultado 2018 Sep 05]; Vol. 22(1): 35-45. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v22n1/0123-9392-inf-22-01-00035.pdf>

23. Andrade M. Identificación de las especies del género *Candida* en gestantes con candidiasis vulvovaginal que acuden al Hospital Gineco-obstétrico. ECORFAN-Bolivia. Sucre [Internet]. 2011 [Consulted 2018 Ago 26]. Recuperado de: http://www.ecorfan.org/bolivia/series/Topicos%20Selectos%20de%20Quimica_I/Articulo%205.pdf
24. Carta al editor. *Candida albicans* serotipo B en pacientes seropositivos al virus de inmunodeficiencia humana. Rev Cubana Med Trop [Internet]. 2001 [Consultado 2018 Ago 25]; Vol. 53(3):222-3. Disponible en : http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602001000300013
25. Castrillón L, Palma A, Padilla C. Factores de virulencia en *Candida sp.* Dermatología Rev Mex [Internet]. 2005 [Consultado 2018 Ago 27]; Vol. 49:12-27. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2005/rmd051c.pdf>
26. Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. Microbes Infect [Internet]. 2009 [Consulted 2018 Ago 26]; Vol. 11(8- 9):753- 761. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457909000951>.
27. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology [Internet]. 2001 [Consulted 2018 Ago 26]; Vol. 147:1997-2005. Available in: https://www.researchgate.net/publication/11848733_Candida_albicans_proteinases_Resolving_the_mystery_of_a_gene_family .

28. Allistair JP, Brown AR, Gow AR. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. Trends Microbiol [Internet]. 1999 [Consulted 2018 Ago 26]; Vol. 7(8):333-8. Available in: [https://www.cell.com/trends/microbiology/pdf/S0966-842X\(99\)01556-5.pdf?code=cell-site](https://www.cell.com/trends/microbiology/pdf/S0966-842X(99)01556-5.pdf?code=cell-site)
29. Naglik J, Challacombe S, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. Microbiology and Molecular Biology Reviews [Internet]. 2003 [Consulted 2018 Ago 26]; Vol. 67 (3):400–428. Available in: <https://mmbbr.asm.org/content/mmbbr/67/3/400.full.pdf>
30. Koelsh G, Rockwell N, Wang GT, Krafft GA, Fuller RS. Enzymatic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2000 [Consulted 2018 Ago 26]; Vol.1480:117-31. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167483800000686>
31. Gilfillian GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NA. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. Microbiology [Internet]. 1998 [Consulted 2018 Ago 27]; Vol. 144:829-38. Available in: https://www.researchgate.net/publication/13705061_Candida_dubliniensis_Phylogeny_and_putative_virulence_factors
32. Zaugg C, Borg-Von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D, Monod M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. Infect Immun [Internet]. 2001 [Consulted 2018 Ago 26]; ;69:405-12. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC97897/>.

33. Monod M, Tongi G, Hube B, Sanglard D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. Mol Microbiol [Internet]. 1994 [Consulted 2018 Ago 26]; Vol. 13:357-68. Available in: https://www.researchgate.net/publication/15215354_Multiplicity_of_genes_encoding_aspartic_proteinases_in_Candida_species
34. Hube B. Possible role of proteinases in *Candida* infections. Rev Iberoam Micol [Internet]. 1998 [Consulted 2018 Ago 26]; Vol. 15:68-71. Available in: <http://www.reviberoammicol.com/1998-15/065068.pdf>
35. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2000 [Consulted 2018 Ago 26]; Vol. 3:122-43 Available in: <https://cmr.asm.org/content/13/1/122>
36. Sturtevant J, Calderone R. *C. albicans* adhesins: biochemical aspects and virulence. Rev Iberoam Micol [Internet]. 1997; [Consulted 2018 Ago 26]; Vol. 14:90-97. Available in: <http://www.reviberoammicol.com/1997-14/090097.pdf>
37. Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. With epithelial and endothelial surfaces. Clin Microbiol Rev [Internet]. 1994 [Consulted 2018 Ago 26]; Vol. 7:29-42. Available in: https://www.researchgate.net/publication/15080041_Adhesins_and_ligands_involved_in_the_interaction_of_Candida_spp/download
38. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, Cryptococcus and other yeast of medical importance In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry MI, Pfaller MA, editors. Manual of clinical Microbiology, 9th ed. Washington, DC: ASM press; 2007. p. 1762-1788.

39. Johnson EM. Rare and emerging *Candida* species. Current Fungal Infection Reports [Internet]. 2009 [Consulted 2018 Ago 27]; Vol. 3:152-159. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12281-009-0020-z>
40. Lockhart SR, Diekema DJ, Pfaller MA. The Epidemiology of Fungal Infections, In: Anaissie EJ, Pfaller MA, editors. Clinical Mycology. 2nd ed. Oxford, UK: Elsevier; 2009. p. 1-14.
41. Vazquez JA, Sobel JD. Candidiasis. Chapter. Essentials of Clinical Mycology, 2011;167-206, DOI: 10.1007/978-1-4419-6640-7_11
42. Schwarzmüller T, Ma B, Hiller E, Istel F, Tscherner M, Brunke S, et al. Systematic Phenotyping of a Large-Scale *Candida glabrata* Deletion Collection Reveals Novel Antifungal Tolerance Genes. PLOS Pathog [Internet]. 2014 [Consulted 2017 Sep 17]; Vol.10 (6). Available in: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004211>
43. Kumar D, Banerjee T, Pratap CB, Tilak R. Itraconazole-resistant *Candida auris* with phospholipase, proteinase and hemolysin activity from a case of vulvovaginitis. J Infect Dev Ctries. [Internet]. 2015 [Consulted 2018 Ago 27]; Vol. 9(4):435–7. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25881537>
44. Duque C, Gómez B, Uribe O, Alarcón J, Soto F, Uran L, Montiel S. Caracterización de la candidiasis vulvovaginal en mujeres de la ciudad de Medellín, Colombia. NOVA [Internet]. 2009 [Consultado 2018 Ago 27]; Vol. 7 (12):111-174. Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ART_ORIG6_12.pdf

45. Tapia C. Candidiasis vulvovaginal. Rev Chil Infect [Internet]. 2008 [Consultado 2018 Ago 25]; Vol. 25 (4): 312-312. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000400016
46. Rivero M, Díaz J, Centeno S. Frecuencia de especies de *Candida* aisladas en pacientes embarazadas con vulvovaginitis. Rev Soc Ven de Microbiol [Internet]. 2003 [Consultado 2018 Ago 25]; Vol. 23 (2):148-152. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562003000200009
47. Buscemi L, Nigrona, R. Estudio de 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. [Internet]. 2004 [Consultado 2018 Ago 25]; Vol. 21:177-181. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2004-21/177181.pdf>
48. García M, García S, Copolillo E, Cora M, Barata A, Vay C, et al. Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y susceptibilidad a los antifúngicos. Rev. Argentina Microbiol [Internet]. 2006 [Consultado 2018 Ago 25]; Vol. 38:9-12. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412006000100003
49. Guía de atención en medicina, general, infección vaginal. Colombiana de salud S.A. [Internet] 2015. [Consultado 2018 Ago 25]. Disponible en: http://www.colombianadesalud.org.co/GUIAS_ATENCION_MEDICINA/GUIA%20INFECCION%20VAGINAL%20C%20EXTERNA%202015%202020.pdf

50. Ciudad-Reynaud. Infecciones vaginales por *Candida*: diagnóstico y tratamiento. Rev Per Ginecol Obstet [Internet]. 2007 [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 53:159-166. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ginecologia/vol53_n3/pdf/a04v53n3.pdf
51. Proyecto AECID 2012. Procesamiento de muestras vaginales. ehas [Internet]. 2012 [Consultado 2018 Ago 28]. Disponible en: <http://www.telemicroscopia.ahas.org/assets/diagnostico-infecciones-vaginales.pdf>
52. Olea D. Presencia de *Candida albicans* y su relación con los valores de CD4+ en pacientes con infección por VIH. Tesis Doctoral Universidad de Granada [Internet]. 1995 [Consultado 2018 Ago 28]. Disponible en: <http://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/1325/16448704.pdf;jsessionid=BB1538EFF03CAFEB9B9E665672C2A52E?sequence=1>
53. Tapia C. Candidiasis vulvovaginal. Rev Chil Infect [Internet]. 2008 [Consultado 2018 Ago 25]; Vol. 25 (4): 312-312. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000400016
54. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2002 [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 15:167-193. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932229>
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

56. Castrillon, Laura & Ramos, A.P. & Padilla Desgarenes, M.C. Biopelículas fúngicas. *Dermatología Revista Mexicana*. [Internet]. 2013 [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 57. 350-361. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2013/rmd135g.pdf>
57. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*. [Internet]. 1999 [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 283:1837-1839. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10206887>
58. Pemán J, Cantón E, Valentín A. Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida*. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2008 [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 25:124-128. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140608700305>
59. Stoodley PK, Sauer, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2002 [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 56:187-209. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142477>
60. Vila J, Soriano A, Mensa J. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2008 [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 26:48-55. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X0872651X>

61. Castrillón L, Palma A, Padilla M. Biopelículas fúngicas. *Dermatol Rev Mex* [Internet]. 2013 [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 57:350-361. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2013/rmd135g.pdf>
62. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010 [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 8:623-633. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676145>
63. Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo J-M, D'Enfert C. *Candida albicans* Biofilms: a Developmental State Associated With Specific and Stable Gene Expression Patterns. *Society* [Internet]. 2004 [Consultado 2019 Abr 08] Vol. 3(2):536–45 Available in: <https://ec.asm.org/content/3/2/536.full>
64. Ramage G, VandeWalle K, Wickes LB, López–Ribot J. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2001 [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 18:163-170. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15496122>
65. Pinilla G, Muñoz JE, Navarrete J, Muñoz LC, Lindarte DA, Molano JA, Monte JM. Herramientas de análisis para mecanismos de resistencia en *C. albicans*. *Rev Mexicana Imbiomed* [Internet]. 2018 [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 38(3):86-92. Disponible en : http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=112235&id_seccion=3546&id_ejemplar=10969&id_revista=212.
66. Al-Fattani AM, Douglas J. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2004 [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 48:3291-3297. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328087>

67. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, et al. Putative role of β -1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2007 [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 51:510-520. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17130296>
68. Anderson, JM, Soll, DR. Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *J Bacteriol* [Internet]. 1987 [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 169:5579-5588. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC213989/>
69. Nobile CJ, Mitchell A P. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol* [Internet]. 2006 [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 8(9):1382–91. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16848788>
70. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, Mc Cormick T, Ghannoum MA, et al. Genetic Control of *Candida Albicans* Biofilm Development. *Natl Revieew Microbiol* [Internet]. 2001 [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 9 (18): 109–18. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=95423&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
71. Abdul A, Mukherjee P, Chandra J, Welti R, Mahmoud R, Ghannoum M. Lipidomics of *Candida albicans* biofilms reveals phase-dependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation. *Microbiology*. [Internet]. 2011 Nov [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 157(Pt 11): 3232–3242. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3352276/>

72. Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drug. Drug Resist Updat 2007 [Internet]. 2011 Nov [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 10:121-130. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17569573>
73. García-Effron G, Lee S, Cleary JD, Perlin DS. Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutation on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2009 [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 53(9): 3690–3699. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546367>
74. Taff, H. T., Nett, J. E., & Andes, D. R. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. Medical Mycology [Internet]. 212 Feb [Consulted 2019 Mar 05]. Vol. 50(2), 214–218. Available in: <https://academic.oup.com/mmy/article/50/2/214/993996>
75. Burton, E., Yakandawala, N., LoVetri, K., & Madhyastha, M. S. . A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology [Internet]. 2006 [Consulted 2019 Mar 05]; Vol. 34(1), 1–4. Available in: https://www.academia.edu/28413940/A_microplate_spectrofluorometric_assay_for_bacterial_biofilms
76. Jyotsana C, Pranab M. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. Microbiol Spectr [Internet]. 2015 [. 3(4) Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4566167/pdf/nihms-713268.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

78. Marcos L, Escribano P, Bouza E, Guine J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. International Journal of Medical Microbiology [Internet]. 2014 [Consulted 2018 Abr 25]; Vol. 304(8): 1192-1198. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422114001118>

79. Deren YT, Ozdek S, Kalkanci A, Akyurek N, Hasanreisoglu B. Comparison of antifungal efficacies of moxifloxacin, liposomal amphotericin B, and combination treatment in experimental *Candida albicans* endophthalmitis in rabbits. Can J Microbiol. 2010;56:1–7

80. Castrillon L, Palma A, Padilla M. Biopelículas fúngicas. Dermatol Rev Mex [Internet]. 2013 jun [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 57(5): 350- 361.

Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2013/rmd135g.pdf>

81. Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. A subpopulation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilm cells are highly tolerant to chelating agents. FEMS Microbiol Lett. [Internet]. 2007 [Consulted 2018 Abr 25]; Vol. 272:172–81. Available in: <https://academic.oup.com/femsle/article/272/2/172/637750>

82. Gutiérrez M, Araiza J, Hernández M, Chávez J, Rodríguez O, Bonifaz A. Estudio in vitro de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del Hospital general de México OD. Dermatol Rev Mex. [Internet]. 2012 mar [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 56(2): 93-101. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=34982>

83. Díaz A, Garcés C. Uso Actual de los antifúngicos triazoles en niños. Infectio. [Internet]. 2012 jun [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 16(3); 82-93. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-infectio-351-articulo-uso-actual-los-antifungicos-triazoles-S0123939212700310>
84. Castrillon L, Palma A, Padilla M. Biopelículas fúngicas. Dermatol Rev Mex [Internet]. 2013 jun [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 57(5): 350- 361. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2013/rmd135g.pdf>
85. J. Pemán, E. Martín-Mazuelos, M.C. Rubio Calvo (Eds.), Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica (2.a ed.), Rev Iberoam Micol, Bilbao. Med Mycol [Internet]. 2007 [Consultado 2018 Ago 28]. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/>
86. Bader, M. Weig, L. Taverne-Ghadwal, R. Lugert, U. Gross, M. Kuhn. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2011 [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 17(9):1359-65. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20946411>
87. Clark, E. Kaleta, A. Arora, D. Wolke. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2013 [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 26:547-603. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23824373>
88. Relloso M, Nievas J, Fares S, Farquharson V, Mujica M, Romano V, Zarate M, Smayevsky J. Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras Rev. argent. microbiol. [Internet]. 2015 [Consultado 2018 Ago 28]; Vol. 47 Disponible en:

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412015000200004

89. Maldonado I, García D, Striebeck P, Lafage M, Fernández L. Espectrometría de masas MALDI-TOF: evaluación de la etapa preanalítica para la identificación de hongos miceliales. *Revista Argentina de Microbiología* [Internet]. 2017 [Consultado 2018 Ago 29]; Vol. 49 (1); 7-14 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754116300931>
90. Alizadeh M, Kolecka, A, Boekhout T, Zarrinfar H, Ghanbari Nahzag, M. A., Badiiee, P. Najafzadeh, M. J. Badiiee P , Rezaei A , Fata A , Dolatabadi S , Najafzadeh M. Identification of *Candida* species isolated from vulvovaginitis using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Current Medical Mycology* [Internet]. 2017 [Consulted 2018 Ago 28]; Vol. 3(4), 21–25. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5917097/>
91. Ashutosh Panda, Anup K. Ghosh, Bijay R. Mirdha, Immaculata Xess, Saikat Paul, Jyotish C. Samantaray, Alagiri Srinivasan, Shehla Khalil, Neha Rastogi, Yubhisha Dabas, et al. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. [Internet]. [Consulted 2018 Sep 05]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25541362>
92. Ivana Maldonado*, Dolores García Ramírez, Pablo Striebeck, Marcelo Lafage y Liliana Fernández Canigia Espectrometría de masas MALDI-TOF: evaluación de la etapa preanalítica para la identificación de hongos miceliales [Internet]. 2017 [Consulted 2018 Sep 05]; Vol. 49 (1):7-14 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754116300931>

93. Siller-Ruiz, M., Hernández-Egido, S., Sánchez-Juanes, F., González-Buitrago, J. M., & Muñoz-Bellido, J. L. (2017). Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-TOF, medios cromogénicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Internet]. 2017 [Consultado 2018 Sep 05]; Vol. 35(5):303-313. Available en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X16304037>
94. Foxman, B., Muraglia, R., Dietz, J-P., Sobel, J.D. , Wagner, J. Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: Results from an internet panel survey. *Genit Tract Dis*, [Internet]. 2013 [Consulted 2019 Mar 05]; Vol. 17, pp. 340-34. Available in: <http://dx.doi.org/10.1097/LGT.0b013e318273e8cf> Medline
95. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* [Internet]. 1990 [Consulted 2019 Mar 06]; Vol. 262: 56-61. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2315679>
96. Watson JD, Crick FH. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* [Internet]. 2003 [Consulted 2019 Mar 06]; Vol. 23;421(6921):397-8. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569935>
97. Fusco da Costa, A. Desarrollo de PCR multiplex para detección y diferenciación de categorías de *Escherichia coli* diarreogénicos. *Rev Pan-Amaz Saude* [Internet]. 2010 [Consultado 2019 Mar 06]; Vol.1(2):77-84. Disponible en: http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v1n2/es_v1n2a09.pdf }
98. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Inv en Dis* [Internet]. 2013 [Consultado 2019 Mar 05]; Vol. 2(2): 70-78. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2013/ir132d.pdf>

99. Cendejas-Bueno E, Kolecka A, Alastruey-Izquierdo A, Theelen B, Groenewald M, Kostrzewa M, et al. Reclassification of the *Candida haemulonii* Complex as *Candida haemulonii* (C. haemulonii Group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (C. haemulonii Group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: Three Multiresistant Human Pathogenic Yeasts [Internet]. 2012 [Consulted 2018 Sep 05]; Vol. 50 (11). Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3486233/>
100. Pérez de Castro, A. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). ETSIAMN [Internet]. 2012 [Consultado 2019 Mar 05]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>
101. Czurda S, Smelik S, Preuner-Stix S, Nogueira F, Lion T. Occurrence of fungal DNA contamination in PCR reagents: approaches to control and decontamination. J Clin Microbiol [Internet]. 2016 [Consulted 2019 Mar 06]; Vol. 54: 148–152. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4702712/>
102. Denning DW, Kneale M, Sobel JD, Rautemaa-Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. Lancet Infect Dis [Internet]. 2018 [Consulted 2019 Mar 06]. Available in: <https://www.gaffi.org/wp-content/uploads/Denning-Recurrent-VVC-global-burden-Lancet-Infect-Dis-2018.pdf>
103. Aguin, T. J., & Sobel, J. D. Vulvovaginal Candidiasis in Pregnancy. Current Infectious Disease Reports [Internet]. 2015 [Consulted 2019 Mar 07]; Vol. 17(6) Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24199471>

104. Sánchez-Hernández J, León B, Rojas K, Muño G. Prevalencia de *Candida albicans* y su relación con cambios en el pH vaginal. Elsevier [Internet]. 2017 [Consultado 2019 Mar 08]; Vol. 24 (1): 1-48 Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-atencion-familiar-223-articulo-prevalencia-Candida-albicans-su-relacion-S1405887117300056>
105. P.A.A. González, Z.C. Ortiz, M.R. Dávila, G.C.M. Infecciones cervicovaginales más frecuentes; prevalencia y factores de riesgo. Rev Cubana Obstet Ginecol [Internet]. 2007 [Consultado 2019 Mar 08]; Vol. 33: 1-12. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2007000200007
106. Ouyang W, Chen S, Liu Z, Wu Y, Li J. Local Th1/Th2 cytokine expression in experimental murine vaginal candidiasis. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci [Internet]. 2008; [Consultated 2019 Abr 08]; Vol. 28:352–5 Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18563341>
107. Panariello BHD, Klein MI, Pavarina AC, et al. Inactivation of genes TEC1 and EFG1 in *Candida albicans* influences extracellular matrix composition and biofilm morphology. J Oral Microbiol [Internet]. 2017, [Consulted 2019 Abr 08]; Vol. 9(1):1385372. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5646609/>
108. Martínez Martínez Wilmer. Actualización sobre vaginosis bacteriana. Rev Cubana Obstet Ginecol [Internet]. 2013 Dic [Consultado 2019 Abr 08]; Vol. 39(4): 427-441. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2013000400012&lng=es.
109. Rodrigues, M.L., Reyes, O.G., Miranda, L.S. and Limia, O.C. Prevalencia de *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* y *Gardnerella vaginalis* en mujeres sin síntomas de vaginitis. Revista Ciencia Médica La Habana [Internet]. 2014

[Consultado 2019 Abr 08]; Vol. 20, 164-174. Disponible en:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/revciemmedhab/cmh-2014/cmh142e.pdf>

110. Gunther LSA, Martins HP, Gimenes F, et al. . Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. São Paulo Med J [Internet].2014 [Consulted] 2019 Abr 08]; Vol. 132:116–20 Available in:
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-31802014000200116&script=sci_arttext

111. Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yue F, Phan Q-T, et al. Critical Role of Bcr1-Dependent Adhesins in *C. albicans* Biofilm Formation In Vitro and In

12. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de extracción de ADN para cultivos de hongos (Modified from Ferrer C et. al. JCM 2001)

Materiales y reactivos:

- Buffer liss 100 ml (0,5 g SDS, 1,4g NaCl, 0,73g EDTA, 20 ml Tris-HCl 1M).
- Mercaptoetanol.
- Fenol-cloroformo-isoamyl alcohol (v:v:v:25:24:1).
- Isopropanol.
- Etanol 70%.
- Agua estéril.
- Agar sabouraud.

Equipo:

- Gabinete de seguridad biológica
- Centrífuga
- Agitador
- Vortex
- Cuantificador de ácidos nucleicos
- Congelador
- Puntas amarillas estériles
- Tubos eppendorf

Procedimiento

1. Transferir la mitad del inóculo del cultivo en agar Sabouraud previamente hecho, a un tubo eppendorf y almacenarlo a -20°C durante 30 minutos o toda la noche.
2. Agregar 500 ul de solución lisis buffer y 5 ul de 2-, mercaptoetanol.

3. Vortex vigorosamente.
4. Incubar a 65°C por 1 hora (Vortex durante la incubación).
5. Agregar 500 ul de fenol:cloroformo: isoamyl alcohol (v:v:v:25:24:1) y mezclar por dos minutos para obtener una suspensión homogénea.
6. Centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos
7. Remover la capa acuosa superior la solución y mezclar con un volumen igual de isopropanol. Precipitar el sobrenadante a -20°C por 30 minutos. (La precipitación toda la noche mejora el rendimiento del ADN.
8. Centrifugar a 14.000 rpm 4°C por 15 minutos y descartar el sobrenadante.
9. Lavar el pellet con 500 ul con solución acuosa de etanol al 70%.
10. Centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos.
11. Decantar el sobrenadante. Dejar secar el pellet.
12. Resuspender el pellet de DNA en 50-100 ul (1 hora) de H2O destilada estéril.
13. Determinar la concentración de DNA y diluir de acuerdo a su uso.

Anexo 2: Protocolo para PCR multiplex.

		C1 [] STOCK	C2 [] FINAL	Vol TUBO 1X
Buffer		5X	1.2X	6 µl
MgCl ₂		25mM	3 mM	3 µl
dNTPS		10 µM	0,24 mM	0,6 µl
	HPW1 F	10µm	0,5 µM	1.25 µl

PRIMERS	HPW1 R	10µm	0,5 µM	1.25 µl
	ALS3 F	10µm	0,5 µM	1.25 µl
	ALS3 R	10µm	0,5 µM	1.25 µl
	BCR1 F	10µm	0,5 µM	1.25 µl
	BCR1 R	10µm	0,5 µM	1.25 µl
	TEC1 F	10um	0,5 µM	1.25 µl
	TEC1 R	10µm	0,5 µM	1.25 µl
Taq		5U	1.3U	0.26 µl
H2O		-	-	0.14 µl
ADN		-	34.5 ng	5 µl
Vol FINAL		-	-	25 µl

1. Se preparan los materiales necesarios, se deja la cabina en uv antes de montar.

2. Se sacan del revco los elementos necesarios para la PCR excepto la taq (se saca hasta el momento en que se agrega), se dejan atemperar se vortexean y se centrifugan antes de usar.
3. Se toma un eppendorf para realizar un Mix sin agregar la taq aún, se pipetea primero el volumen indicado para buffer, luego, MgCl₂, dNTPs, Primers y el H₂O finalmente.
4. Se divide la mezcla en los tubos necesarios y se procede agregar la taq de manera individual en cada eppendorf para PCR.
5. Se pasa a la zona Post PCR donde se agrega el volumen de ADN en cada tubo.
6. Finalmente se lleva al termociclador (35 ciclos)

Programa de ciclaje

35 ciclos

1. 94° --> 0:30
2. 60°--> 0:30
3. 72.0 --> 1:00

MONTAJE DE ELECTROFORESIS

1. Preparar agarosa (1.5% con TBE), se deja en microondas por dos minutos, una vez pasado el tiempo mezclar que la agarosa quede homogénea y transparente.
2. Agregar 2ul de zyber cei colorante intercalante y mezclar nuevamente.
3. Servir el medio en la cámara de electroforesis previamente montada y dejar gelificar por 10 a 15 minutos.
4. Retirar las paredes y el peine, poner en posición la cámara de electroforesis agregar el buffer TBE 1X hasta la marca indicada.
5. Se procede a sembrar en los pozos. En el primer pozo el marcador de peso molecular (5ul) en las siguientes las muestras (7ul).
6. Se conecta el nano pac -300, Voltaje 85 -90 / Corriente 120 / Tiempo 45 minutos.
7. Realizar lectura en equipo BIORAD.

Anexo 3: Protocolo para identificación de levaduras mediante la técnica MALDI-TOF

1. Se prepara la tarjeta
2. Se ingresa la identificación de la muestra.
3. Se tomar con asa calibrada de 0.01ml una colonia de la cepa a identificar. Se realiza por triplicado el montaje.
4. Se monta en el pozo central la cepa control (*E.coli* ATCC 3539)
5. Para levaduras, agregar 50 lambdas de matriz CHCA dejar cristalizar y agregar 50 lambdas de matriz FA.
6. Escanear código de barras de la tarjeta e ingresarla al sistema VITEK MS.
7. Ver resultados en el sistema Myla®

Anexo 4: Protocolo de ensayo XTT para análisis de la capacidad de formación de biopelícula en los aislamientos.

Materiales y reactivos:

- Agar Sabouraud-dextrosa, para preparar placas.
- Caldo Sabouraud dextrosa.
- RPMI-1640 sin bicarbonato de sodio complementado con L-glutamina y tamponado con ácido morfolinopropanosulfónico.
- Solución salina tamponada con fosfato estéril PBS.
- Sal sódica XTT.
- Menadiona.

Equipo:

Autoclave.

- Placas de Petri.
- Tubos de centrifuga cónicos de 15 ml.
- Tubos eppendorf.
- Gabinete de seguridad biológica.
- Vortex.
- Agitador orbital.
- Centrifuga.
- Hemocitómetro – Cámara de Neubauer.
- Microscopio.
- Placas de microtitulación de 96 pocillos: poliestireno, fondo plano, tratamiento de tejidos.
- Parafilm.
- Pipeta multicanal.
- Puntas azules y amarillas estériles.
- Incubadora 30°C-37°C
- Lector de placa de microtitulación.

Preparación de XTT activado

1. Descongele el reactivo XTT y el reactivo de acoplamiento de electrones antes de usar.
2. Mezcle 0,1 ml de reactivo de acoplamiento de electrones con 5 ml de XTT correctamente para formar una solución de XTT activada.
3. Esta cantidad será suficiente para una placa de 96 pocillos (50 µl / pocillo).
4. Equilibre el reactivo XTT activado a temperatura ambiente antes de usar.

NOTA: realizar los cálculos necesarios para saber el volumen final de xtt de acuerdo con el total de muestras a analizar.

Preparación de las células

1. A partir del hisopado sembrar en placas de Agar Dextrosa Sabouraud, incubar por 24 h a 37° C.
2. Tomar una colonia de la placa e inocular en tubos conicos (falcon 15 ml) con 10ml de Caldo Sabouraud, incubar por 24 h a 37° C con agitación constante.
3. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y lavar 2 veces con PBS estéril.
4. Resuspender el sedimento final de células en 20 ml de medio RPMI, vortexear por 20 segundos para homogenizar bien.

Paso crítico: Debido a que las células fúngicas tienden a asentarse y /o agregarse, las suspensiones celulares deben agitarse vigorosamente después de los lavados y antes de pipetear las diferentes manipulaciones utilizadas en este y otros pasos sucesivos.

5. Tomar 1ml de la preparación anterior y agregar en un tubo falcon estéril (de 15ml) con 9 ml del mismo medio para preparar dilución 1:10.
6. Con la dilución anterior realizar recuento de levaduras en cámara de Neubauer y conteo de células viables. Llevar las levaduras a una concentración de 1×10^6 células/ml. Realizar los cálculos y las diluciones necesarias hasta obtener la concentración requerida.

Paso Critico: La densidad de células fúngicas del inóculo inicial es muy importante para el correcto desarrollo de la biopelícula, ya que los mecanismos de detección del quórum juegan un papel importante en la formación de la biopelícula. Las densidades celulares que son demasiado altas o bajas probablemente resulten en biopelículas pobres.

7. Realizar los cálculos necesarios para preparar un inóculo con volumen 2ml (1×10^6 células/ml) para cada muestra que se analizará. Una vez preparado el inóculo sembrar INMEDIATAMENTE en placas de microtitulación de 96 pocillos fondo plano.

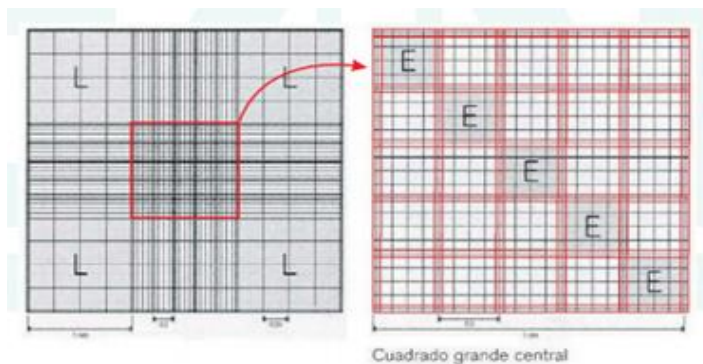
Procedimiento para conteo de levaduras en cámara de Neubauer

Preparación de la muestra:

1. Lavar la cámara y el cubre con agua destilada y alcohol 96%.
2. Secar bien con papel suave.
3. Poner el cubreobjetos encima de la cámara.
4. Homogeneizar removiendo bien el cultivo en donde residen las levaduras.
5. Tomar con pipeta una muestra (20ul).
6. Poner la punta de la pipeta en una de las dos ranuras de la cámara y, por capilaridad, las levaduras se distribuirán en la cámara.
7. Si se crea una cámara de aire repetir la operación desde el principio.
8. Fijar la cámara de recuento en la platina del microscopio para realizar la observación microscópica.
9. Esperar unos minutos antes de contar para que las levaduras se depositen en la cámara

Contabilizar levaduras totales:

1. Se centra el objetivo del microscopio a ojo en el centro teórico de la cruz de la cámara, luego se coloca el objetivo lo más cerca posible del cubre objetos, pero sin tocarlo y posteriormente se irá alejando hasta que la imagen sea lo más clara y nítida posible. 40X
2. Ubicar la zona central donde se llevará a cabo el recuento de levaduras.



- El conteo se realiza de forma diagonal contando los cinco (o cuatro dependiendo de la cámara) cuadros. Contar el número de levaduras en cada uno de estos.

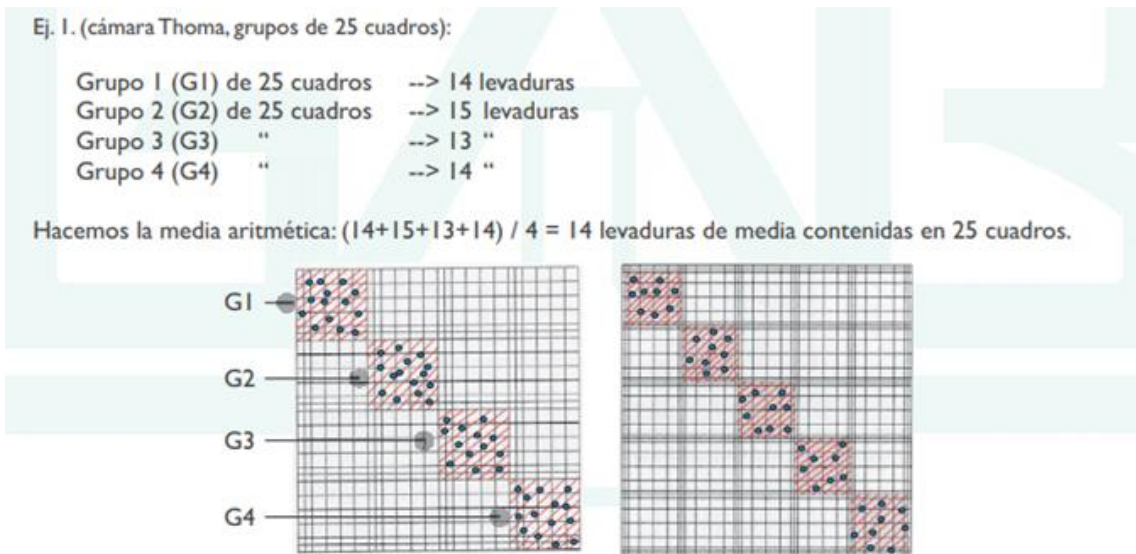


Fig. 4: Ejemplo de recuento por grupos en cámara Thoma y Neubauer improved

Y aplicar la fórmula genérica siguiente:

$$\frac{X \text{ levaduras}}{Y \text{ cuadros}} \times \frac{\# \text{ cuadros cámara}}{\text{Volumen cámara}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3 (\text{o } 1 \text{ mL})} = x \text{ millones de levaduras / mL}$$

Ejemplo:

Si se encuentran 14 levaduras en 25 cuadros en la cámara Thoma, los cálculos serían como prosiguen:

$$\frac{14 \text{ levaduras}}{25 \text{ cuadros}} \times \frac{400 \text{ cuadros}}{0.1 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3 (\text{o } 1 \text{ mL})} = 2.24 \text{ millones de levaduras / mL}$$

Procedimiento para contabilizar levaduras viables (% levaduras viables)

- Mezclar una gota pequeña de colorante con una gota pequeña de mosto en fermentación en el portaobjetos normal.
- Se tapa con un cubre.

3. Se visualiza en un microscopio.
4. Las levaduras teñidas están muertas y las no teñidas están vivas.
5. Se visualizan 3 campos en la diagonal del cubre como muestra la fig. 6. Se cuentan todas las levaduras contenidas en cada campo y se hace una lista de vivas y muertas y a partir de aquí se calcula el porcentaje de viables.
6. Para el cálculo del % de viables se cuentan las vivas respecto el total.

Nota 1: El colorante puede ser cualquiera conocido. Si se usa el azul de metileno hay que tener en cuenta que se hace más difícil el contaje porque mancha mucho de azul la solución por lo que habrá que diluirlo antes de mezclarlo con la muestra a analizar o bien utilizar rodamina. Ésta tiene un color rosado suave por lo que hace más simple el recuento. Ambos colorantes pintan las levaduras muertas.

Procedimiento para determinar la proliferación celular

1. Sembrar 100 ul / pozo de cada muestra y control negativo, hacerlo por triplicado. Cubrir la placa con su tapa y sellar con Parafilm.

Ejemplo: lectura a las 4h, 12h, 24h y 48h cada una por triplicado

Para una muestra se requerirá en total 1200 ul.

2. Incubar a 30°C por 24h con agitación constante (tiempo sujeto a hora de lectura).
3. Una vez transcurrido el tiempo, después de la formación de biofilm aspire el medio con cuidado para no tocar y romper el biofilm. La mejor forma de hacerlo es, utilizando una pipeta multicanal, incline las puntas de las pipetas hacia las esquinas de los pocillos, minimizando así el contacto con la biopelícula.

Punto crítico: Si el biofilm se ve afectado al momento de aspirar descartar.

4. Lavar 3 veces con 200ul de PBS estéril para eliminar las células no adheridas. Drenar la placa en cada lavado en una posición invertida, secándolas con toallas de papel para eliminar cualquier PBS residual.

5. Equilibre el reactivo XTT a temperatura ambiente antes de usar. Agregue 50ul de reactivo XTT activado a cada pocillo incluido el control negativo.
6. Cubrir con su debida tapa y con papel aluminio. Incube por 3 horas a 37°C con agitación constante.
7. Lea la absorbancia en el espectrofotómetro o un lector ELISA utilizando 450 nm como filtro primario y 630 nm como filtro diferencial.

Procesamiento de los datos

1. Reste los valores de absorbancia promedio de 450 nm de los pozos de control de los valores de absorbancia promedio de 450 nm de los pozos experimentales correspondientes.
2. Graficar una absorbancia de 450 nm versus la concentración del agente de prueba.

Por ejemplo Si A1, A2 y A3 son absorbancias de los pozos de prueba por triplicado a 570 nm, la absorbancia promedio A es,

$A = (A1 + A2 + A3) / 3$ De manera similar, si C1, C2 y C3 son absorbancias de los pozos de control por triplicado a 570 nm, la absorbancia promedio C es, $C = (C1 + C2 + C3) / 3$

3. Calcule la absorbancia normalizada restando C de A. Grafique los valores de las absorbancias normalizadas frente a la concentración del agente de prueba.