

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LA CANDIDIASIS VULVOVAGINAL (CVV) EN
GESTANTES EN ARGENTINA.**

Tesina para optar el título de Magíster en Biología Molecular Médica, presentada por:

Bioquímica María Josefina Mucci

Directora: Prof. Dra. María Teresa Mujica- Co-directora: Dra. María Lujan Cuestas

Centro de Micología del Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología

Médica

(IMPam-CONICET), Facultad de Medicina, UBA

2015

Dedicado a mi familia Pedro, Mateo y Emma, a mi tía María Inés y a mis padres Ana y Miguel.

AGRADECIMIENTOS

- Al Instituto de de Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM,UBA-CONICET) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, especialmente al Centro de Micología.
- A la Universidad de Buenos Aires por financiar este trabajo.
- A la Dra. María Teresa Mujica por todo el trabajo y el apoyo constante.
- Al Hospital Materno Infantil “R. Sarda”, especialmente al servicio de obstetricia y al Laboratorio de Microbiología.
- A María Lujan Cuestas por toda su colaboración.
- A Pedro Bavio por su apoyo y colaboración.
- A José Bavio por su colaboración.
- A mis padres Ana y Miguel y a mi Tía María Inés por estar siempre.

INDICE TEMÁTICO	Páginas
1. INTRODUCCION.	
1.1 El ecosistema vaginal.	7
1.2 Infecciones del tracto vaginal.	8
1.3 Complicaciones ginecológicas y obstétricas.	11
1.4 Diagnóstico microbiológico.	13
1.5. Diagnóstico molecular.	14
2. HIPOTESIS DE TRABAJO.	17
3. OBJETIVOS.	17
4. Materiales y métodos.	18
4.1. POBLACIÓN Y MUESTRA.	18
4.1.1. Población en estudio.	18
4.1.1.2 Criterios de inclusión.	18
4.1.1.3. Criterios de exclusión.	18
4.1.1.4. Obtención de datos epidemiológicos.	18
4.1.1.5. Diseño experimental.	19
4.1.2. Unidades experimentales o unidades de análisis.	19
4.1.2.1. Recolección de las secreciones vaginales y procesamiento en las gestantes.	19
4.1.2.2. Investigación de levaduras, vaginosis bacteriana y tricomoniasis.	19
4.1.2.2.1. Procesamiento de las muestras.	20
4.1.2.3. Estudio de la presencia de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Ureaplasma spp</i> y <i>Mycoplasma hominis</i> .	21
4.2. Población y Muestra. Investigación de la asociación entre <i>S. agalactiae</i> (EGB) y <i>Candida spp</i>.	22
4.2.1. Población en estudio:	22
4.2.1.2. Criterios de inclusión.	22
4.2.1.3. Criterios de exclusión.	22
4.2.1.4. Obtención de datos epidemiológicos.	22
4.2.1.5. Diseño experimental.	23
4.2.2. Unidades experimentales o unidades de análisis.	23
4.2.2.1. Recolección de las secreciones vaginales y del hisopado ano-rectal. Procesamiento en las gestantes.	23
4.2.2.2. Investigación de EGB y de levaduras.	23
4. 3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE CANDIDA.	24
4.3.1 Identificación molecular de las colonias verdes recuperadas del medio cromogénico (CHROMagar, <i>Candida</i>).	24
4.3.1.2. Identificación molecular de <i>C. dubliniensis</i> .	25
4.3.2. Identificación molecular de colonias rosadas recuperadas en medio cromogénico (CHROMagar, <i>Candida</i>) del complejo de <i>C. parapsilosis</i> : <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i> .	26
4.3.3. Identificación molecular del complejo de colonias púrpuras-blancas recuperadas en medio cromogénico (CHROMagar, <i>Candida</i>) <i>C. glabrata</i> , <i>C. bracarensis</i> y <i>C. nivariensis</i> (complejo <i>C. glabrata</i>) y <i>S. cerevisiae</i> .	28

4.4. Procesamiento y análisis estadísticos de los datos.	29
4.5. ANEXOS	30
4.5.1 Anexo I: Formulario de consentimiento.	
4.5.2 Anexo II: Ficha de recolección de datos del paciente.	
5. RESULTADOS.	
5.1 Características poblacionales y clínicas de las gestantes estudiadas.	33
5.1.1 Características de la población de las gestantes estudiadas.	33
5.1.2 Antecedentes clínicos obtenidos de las respectivas historias clínicas.	34
5.1.3 Complicaciones del embarazo.	35
5.1.4 Manifestaciones clínicas de las gestantes.	36
5.2. A. Estudios microbiológicos.	37
5.2. A.1. Reacción inflamatoria en las gestantes.	37
5.2. A.2 Examen micológico. Investigación de las especies de <i>Candida</i> .	37
5.2. A.2 Cultivo en medio cromogénico (CHROMagar, <i>Candida</i>).	39
5.2. A.3 Identificación de las especies de <i>Candida</i> .	41
5.2. A.3.1 Distribución de las especies de <i>Candida</i> en las secreciones vaginales de las gestantes.	46
5.3. Estudios microbiológicos. Investigación de vaginosis bacteriana (VB).	47
5.4. Estudios microbiológicos. Investigación de <i>Mycoplasma hominis</i>.	48
5.5. Estudios microbiológicos. Investigación de <i>Ureaplasma</i> spp.	48
5.6. Estudios microbiológicos. Investigación de <i>Chlamydia trachomatis</i>.	49
5.7. Estudios microbiológicos. Investigación de <i>Trichomonas vaginalis</i>.	50
5.8. Asociación de <i>Candida</i> spp con <i>Streptococcus agalactiae</i> (EGB).	52
5.8.1 Características de la población de las gestantes estudiadas.	52
5.8.2 Antecedentes clínicos obtenidos de las respectivas historias clínicas.	54
5.8.3 Manifestaciones clínicas de las gestantes.	54
5.8.4. Estudios microbiológicos. Investigación de especies de <i>Candida</i> .	54
5.8.4.1 Examen microscópico directo. Observación de levaduras y pseudomicelios.	54
5.8.4.1.3 Cultivo en medio cromogénico (CHROMagar, <i>Candida</i>).	54
5.8.5 Estudios microbiológicos. Investigación de <i>Streptococcus agalactiae</i> (EGB).	55
5.2. B. Estudios moleculares para la identificación de especies de <i>Candida</i>.	56
5.2. B.1 Identificación molecular de las colonias verdes recuperadas del medio cromogénico (CHROMagar, <i>Candida</i>).	56
5.2. B.1.1 Identificación molecular de <i>C. dubliniensis</i> .	56
5.2. B.1.2 Identificación molecular de <i>C. albicans</i> y <i>C. africana</i> .	57
5.2. B.1.3. Identificación molecular del complejo <i>C. parapsilosis</i> .	58
5.2. B.1.4. Identificación molecular del complejo <i>C. glabrata</i> .	59
6. DISCUSION.	62
7. CONCLUSIONES.	70
8. BIBLIOGRAFIA.	73

ABREVIATURAS

VV: vulvovaginitis.

VB: vaginosis bacteriana.

CVV: candidiasis vulvovaginal.

ACO: anticonceptivos orales.

CVVR: candidiasis vulvovaginal recurrente.

TGI: tracto genital inferior.

CC: candidiasis congénita.

RN: recién nacido.

EGB: *Streptococcus* β - hemolítico grupo B.

CDC: Centro para el control y prevención de las enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention*).

SGF: secreción genital femenina.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

rDNA: DNA ribosomal.

ITS: espaciador transcrito interno (*Internal Transcribed Spacer*).

HWP1: proteína de la pared (*Hyphal Wall Protein 1*).

MICs: concentración mínima inhibitoria (*Minimum Inhibitory Concentration*).

Gen *FKS*: gen que codifica la Glucan Sintetasa.

MLST: tipificación multilocus de secuencias (*Multilocus Sequence Typing*).

FSV: fondo de saco vaginal.

CG: células guía.

APP: amenaza de parto prematuro.

HIE: hipertensión inducida por el embarazo.

RPM: ruptura prematura de membrana.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 El ecosistema vaginal.

El tracto vaginal es un ecosistema dinámico en donde la homeostasis depende fundamentalmente de la interacción hospedero-microbiota y sufre alteraciones tanto por factores intrínsecos como extrínsecos. La vagina es colonizada por diferentes microorganismos durante las primeras 24 horas del nacimiento, pero numerosos factores tienen el potencial de alterar dicho nicho ecológico. Es ampliamente conocido, que bajo ciertas circunstancias algunas especies de microorganismos pueden alcanzar el epitelio vaginal, desplazar parte de la flora normal, romper el equilibrio homeostático y crear condiciones patológicas para la vagina y la vulva. Se distinguen una variedad de circunstancias que pueden crear un desbalance ecológico local para que tales microorganismos puedan progresar, entre las que deben citarse alteraciones hormonales, tratamiento antibiótico, enfermedades que comprometen las defensas del hospedero (como diabetes), utilización de ciertas jaleas espermicidas, presencia de cuerpos extraños en la vagina, falta de higiene, entre otras causas (1). En tales circunstancias, se observa un franco aumento de la descarga del flujo vaginal o leucorrea e inflamación local, lo que constituye un síndrome conocido como vulvovaginitis. Se trata de un síndrome muy común que puede ser controlado rápidamente con el tratamiento adecuado.

La vagina normal de la mujer adulta contiene una biota normal compuesta por numerosas especies de microorganismos. Cabe destacar, que la composición de esta biota varía muy poco durante el embarazo, y solo se observan pequeñas variaciones durante el ciclo menstrual (1).

Los lactobacilos constituyen el grupo de microorganismos dominantes de la biota normal de la mujer adulta en su etapa reproductiva (2). Este predominio es benéfico para un ecosistema vaginal saludable. Los mecanismos más importante descriptos por el cual los

lactobacilos contribuyen a este microambiente favorable son el mantenimiento de un pH ácido y la producción de H₂O₂ (2).

Diferentes levaduras forman parte de la biota del ser humano y tanto la colonización como la infección vaginal micótica son más frecuentes durante el embarazo y en mujeres que poseen otros factores predisponentes. Generalmente, las infecciones suelen ser de origen endógeno por modificación del ecosistema microbiano intestinal o vaginal (1).

1.2 Infecciones del tracto vaginal.

La vulvovaginitis aguda (VV) constituye una de las principales causas de la consulta ginecológica en mujeres de todas las edades, en especial en la etapa sexualmente activa, y presenta una prevalencia del 7 al 28% según diferentes autores (3). Es considerada la más frecuente de los procesos infecciosos del tracto genital femenino y se caracteriza por dolor vulvovaginal, prurito, inflamación, disuria y descarga aumentada del flujo vaginal con cambios en las características del mismo. La VV pueden ser de etiología bacteriana, protozoaria, viral o fúngica (4).

La vaginosis bacteriana (VB), la candidiasis vulvovaginal (CVV) y la infección por *Trichomonas vaginalis* constituyen los principales agentes etiológicos causantes del 90% de los diagnósticos microbiológicos de VV (5,6).

La VB, cuya prevalencia a nivel mundial es del 20%, se caracteriza por una alteración en la flora bacteriana normal de la vagina, constituida fundamentalmente- como se mencionó anteriormente- por bacilos Gram positivos (*Lactobacillus* spp.), la cual es sustituida por cocobacilos Gram negativos (*Gardnerella vaginalis*) y diversas especies bacterianas anaerobias no esporuladas como *Mobiluncus* spp. y micoplasmas (complejo GAM) que en conjunto desplazan la flora normal de la vagina (*Lactobacillus* spp.) (7,8).

La infección por *T. vaginalis* es considerada la ETS más frecuente a nivel mundial y en la embarazada está asociada a partos prematuros y recién nacidos de bajo peso. La prevalencia en EE.UU en mujeres en edad reproductiva es del 3,1 % (9).

La CVV es una enfermedad inflamatoria de la vagina producida por diferentes especies del género *Candida*. En los últimos años se ha documentado un paulatino aumento de la misma, constituyendo en la actualidad la segunda causa más frecuente de VV en todo el mundo (10).

Las levaduras causantes de VV forman parte de la biota de la piel y de las mucosas de los tractos gastrointestinal, genitourinario y respiratorio del ser humano. La historia natural de la colonización por *Candida* spp. en la vagina aún no se conoce, pero se cree que dicha colonización puede durar meses e incluso años y que la infección se desencadena ante factores del hospedero que favorecen el sobrecrecimiento y la expresión de diferentes factores de virulencia de *Candida* spp. (4).

La portación asintomática de *Candida* spp. en la vagina de mujeres no gestantes en edad fértil se estima que es del 10-20%. La mayor proporción de casos fue descrita en regiones de clima tropical o subtropical y en mujeres con dietas ricas en hidratos de carbono (7, 11,12). En embarazadas la prevalencia es mayor y alcanza cifras de hasta un 35% (7,13).

La CVV es una patología estrógeno-dependiente y actualmente, se reconocen una serie de factores dependientes del hospedero que predisponen a su desarrollo. Entre ellos, el embarazo y conforme avanza el tiempo de gestación se incrementa la colonización por las distintas especies de *Candida*, con el consiguiente riesgo de CVV, y la mayor recurrencia y severidad clínica de las mismas. Se sabe que los gestágenos incrementan el contenido de glucógeno en las células del epitelio vaginal y favorecen la germinación y adherencia de *Candida* spp. Por otro lado, se han descrito receptores hormonales para estrógenos y progesterona en el citosol de las células de las levaduras (14). Aunque el empleo de anticonceptivos orales (ACO) de altas dosis de estrógeno incrementa la tasa de CVV, en las

usuarias de ACO de bajas dosis no se ha descrito una mayor incidencia de CVV (3). En el primer caso, el aumento de incidencia de la candidiasis parece estar mediado por un incremento del glucógeno del epitelio vaginal. Otro factor de riesgo que cumple un papel muy importante en el desarrollo de CVV es la diabetes no controlada. Asimismo, el empleo de antibióticos de amplio espectro incrementa la frecuencia de CVV al eliminar la biota bacteriana vaginal normal que tiene un papel protector al competir por los nutrientes y los sitios de adherencia (3, 12). Otros factores también asociados son la obesidad, la ropa interior ajustada, la promiscuidad sexual, el tratamiento con corticoides, el empleo local de productos químicos irritantes, las enfermedades debilitantes y los estados de inmunosupresión, entre otros (3).

Se considera que aproximadamente el 75% de las mujeres adultas experimentarán en algún momento de su vida un episodio de CVV, y que el 40% de las mismas presentarán más de uno y que el 5% padecerá CVV recurrente (CVVR). Se define CVVR cuando se producen más de cuatro episodios en un año (14).

Tradicionalmente se asumió que la transición de colonización asintomática a sintomática se produce como consecuencia de una interrupción de la integridad física o de una pérdida de la inmunidad local, aunque también puede deberse a factores que aumenten la virulencia del hongo.

Diferentes factores de virulencia pueden ser expresados por el hongo en la superficie de la mucosa cumpliendo un papel muy importante en el desarrollo de la infección (15). Aunque la presencia de síntomas no siempre se encuentra asociada a la carga fúngica, la CVV sí se halla en estrecha relación con el aumento en los niveles de *Candida* spp. (16).

Como se mencionó anteriormente, la CVV constituye la segunda causa de VV en mujeres en edad fértil, y es una enfermedad inflamatoria que se caracteriza por flujo vaginal inodoro, blanco y grumoso que tiene apariencia de “leche cortada” y por prurito, ardor, eritema y edema vaginal.

La prevalencia de CVV en mujeres adultas es del 6-18%. Sobel *et al* (14) describieron que en el 80-90% de los casos de CVV se aísla *C. albicans* mientras que en el 10-20% restante se aíslan otras levaduras no-*Candida albicans* como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En los últimos años se ha observado un incremento en la frecuencia de aislamientos de *Candida* no-*albicans* en ciertas poblaciones (17) las cuales muestran una mayor resistencia a los antifúngicos de primera línea. Diferentes estudios de vigilancia epidemiológica han demostrado que la resistencia a los azoles es rara en los aislamientos de *C. albicans* (<1%) aunque bastante frecuente en *C. glabrata* (>15%) y en otras especies no-*albicans* (18).

Como se mencionó anteriormente, el embarazo es un factor predisponente para el desarrollo de VV debido a que los altos niveles de estrógeno favorecen el crecimiento de las levaduras (19,20) y aumentan la adherencia de las mismas a la mucosa vaginal (14). En las embarazadas la prevalencia de CVV es del 24-38% y se halla a *C. albicans* como el principal agente etiológico seguido en frecuencia por *C. glabrata*- el cual se relaciona con vaginitis crónica-, *C. krusei* y otras *Candida* spp. (21, 22).

1.3 Complicaciones ginecológicas y obstétricas.

La detección de las infecciones del tracto genital inferior (TGI) es de suma importancia dado que los cambios hormonales que se producen predisponen con mayor frecuencia a la aparición de infecciones, las cuales están asociadas a un gran número de complicaciones gineco-obstétricas. Entre ellas, el parto prematuro, la ruptura prematura de membranas, el aborto espontáneo, la corioamnionitis, la endometritis posparto, la enfermedad inflamatoria pélvica, el retardo del crecimiento intraútero y el bajo peso al nacer (20,23,24).

La candidiasis congénita (CC), aunque es baja la presentación, es generalmente secundaria a una corioamnionitis candidiásica y se presenta entre las 24 h y los 6 días de vida (25). La adquisición intraútero de *Candida* spp. puede generar un amplio espectro clínico en el recién nacido (RN), desde una infección mucocutánea de curso benigno y generalmente

autolimitada hasta una enfermedad sistémica grave que puede provocar la muerte temprana del neonato. Los principales factores de riesgo para la adquisición de la CC son la presencia de dispositivos intrauterinos, ruptura prematura de membranas y cerclaje (26). *C. albicans* puede producir una infección congénita en más del 80% de los casos, y es seguida en orden de frecuencia por *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (27).

La candidiasis neonatal puede ser adquirida durante el pasaje por el canal de parto o posteriormente por contacto directo. Suele manifestarse clínicamente, luego del 6^{to} día de vida como dermatitis del pañal y/o como afección de la mucosa oral (28).

Por otro lado, *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo β hemolítico grupo B- EGB) es un coco Gram positivo que se encuentra también como colonizante de los tractos gastrointestinal y genital en el 10-30% de los adultos sanos (29,30). En la embarazada puede dar origen a infecciones urinarias, coriamnionitis, endometritis, endocarditis y fiebre siendo la causa más frecuente de sepsis bacteriana y meningitis neonatal (31).

En el 40% y 72% de los RN de madres portadoras de *S. agalactiae*, la colonización se produce durante el parto y entre ellos el 2% desarrolla enfermedad invasiva de origen precoz (31).

Desde su reconocimiento como patógeno en la década del '70, los estudios realizados aportaron datos sobre la colonización materna, la incidencia de la afección neonatal, la sensibilidad a los antimicrobianos y la eficacia de las guías clínicas de prevención. En el año 2002 a partir de los resultados publicados por Schrag *et al* (32), el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) actualizó las guías de prevención de EGB para determinar qué pacientes deben recibir profilaxis antibiótica y recomendó como estrategia la detección de la colonización por *S. agalactiae* a través del cultivo de la zona vaginal y ano-rectal de todas las mujeres embarazadas entre la semana 35-37 de gestación. Este *screening* tiene un valor predictivo positivo del 85% y negativo del 95% (33). En el año 2010, las nuevas recomendaciones publicadas por el CDC sostienen la estrategia basada en el cultivo para la

detección de EGB (34). En Argentina, a partir del año 2008 se aprobó la ley N° 26369 que establece la obligatoriedad de la realización del cultivo para detectar EGB en todas las embarazadas del país. Dado que EGB y *Candida* spp. son colonizantes frecuentes uno de los objetivos de la tesis fue investigar si existe asociación entre la colonización por *Candida* spp. y EGB en mujeres embarazadas entre la semana 35 y 37 de gestación.

1.4 Diagnóstico Microbiológico.

El estudio de la secreción genital femenina (SGF) utilizando técnicas convencionales permite la detección de los distintos agentes etiológicos asociados con VB y VVC (o su asociación), como así también de vaginitis por *T. vaginalis* e infecciones bacterianas endocervicales por *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* y *Ureplasma* spp. El estudio microbiológico de las SGF incluye a- la observación microscópica de la muestra con solución fisiológica para la visualización de células, parásitos, levaduras y la correspondiente reacción inflamatoria, b- la realización de extendidos para la coloración con las técnicas de Gram y de May-Grünwald Giemsa para la observación de la biota bacteriana y de *T. vaginalis* respectivamente; y c- la siembra en medios de cultivo (agar sangre para el aislamiento bacteriano, Sabouraud y medios cromogénicos (CHROMagar *Candida* company, París, Francia) para el aislamiento de levaduras y medio Thayer Martin para la recuperación de *N. gonorrhoeae*) y la posterior realización de las pruebas bioquímicas de identificación convencionales para cada grupo determinado (35,36,37). Por otra parte, para el estudio de *C. trachomatis*, *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* se han desarrollado técnicas comerciales relativamente simples y rápidas de realizar (38, 39,40).

Históricamente el agente etiológico de CVV fue *C. albicans* representando en todo el mundo alrededor del 45- 90% de los casos, pero en los últimos años en algunos países se han observado cambios epidemiológicos con mayor número de casos y de recurrencias asociados

a *Candida no-albicans* (17) las cuales muestran mayor resistencia a los antifúngicos de primera línea.

Por lo anteriormente mencionado, la identificación de las especies de *Candida* es necesaria. Además, los métodos tradicionales de diagnóstico microbiológico consumen mucho tiempo y con algunas especies no resultan concluyentes. De ahí la necesidad de implementar métodos moleculares para el diagnóstico microbiológico.

1.5. Diagnóstico Molecular.

La identificación molecular de microorganismos ha sido evaluada para varios grupos de hongos de importancia médica (41,42). En la práctica clínica, el uso como herramienta diagnóstica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los ácidos nucleicos de diversos hongos de importancia médica se ha incrementado en los últimos años. Los genes que codifican para el DNA ribosomal (rDNA) se encuentran en todos los microorganismos y la heterogeneidad de la secuencia dentro de la región de los ITS (*internal transcribed spacer*) es útil para la separación en géneros y especies. La comparación de la secuencias nucleotídicas dentro de esta región tiene una alta probabilidad de identificar al microorganismo. Recientemente, un consorcio para determinar el código de barra de los hongos (*fungus barcoding consortium*) (43) propuso la región de los ITS del rDNA como un código de barra fúngico. Sin embargo, debemos considerar que para algunos grupos de hongos presenta un bajo poder discriminatorio (42) y además existen detractores a esta propuesta (44).

C. albicans es la especie más frecuentemente aislada de las infecciones humanas y está relacionada a otras especies de levaduras como *C. dubliniensis* y *C. africana*. *C. africana* es considerada un aislamiento atípico de *C. albicans* que no forma clamidoconidios, por lo que se ha propuesto como una nueva especie dentro del género *Candida*. *C. africana* es primariamente un patógeno recuperado de muestras genitales y especialmente de secreciones vaginales (45).

Estudios filogenéticos, basados en la secuencia de la región D1-D2 del gen para el 26 S ribosomal han demostrado que los aislamientos de *C. albicans* se encuentran muy relacionados para separar a *C. africana* como una nueva especie (46, 47, 48) *C. albicans* var. *africana* se sugiere como un nombre más adecuado para este aislamiento atípico de *C. albicans* que no produce clamidoconidios (47, 49, 50). Estas especies y/o variantes se discriminan fácilmente con el uso de técnicas moleculares (49, 51, 52). En el año 2001, Tietz *et al.* (45) describieron a *C. africana* como una nueva variante de *C. albicans* aislada de humanos en Angola, Madagascar y Alemania. Esta levadura se recuperó de vagina, región perianal y muestras de piel. Posteriormente, se documentó la presencia de *C. africana* en muestras de secreción vaginal aisladas de Arabia Saudita, España e Italia. Cabe destacar, que la identificación de *C. africana* por Odds *et al.* (53) a partir de una muestra de sangre proveniente de Chile, sugiere que esta levadura podría estar más ampliamente difundida a nivel mundial y en diversos materiales clínicos.

Romeo *et al.* (49) describieron un método molecular que permite discriminar entre *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana* usando un par de cebadores derivados del gen que codifica para una proteína de la pared de la hifa 1 (HWP1: *hyphal wall protein*). La HWP1 es inducida durante la formación del tubo germinativo y es característica de cada una de estas tres especies. Las características fenotípicas compartidas entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* ha producido en el pasado una incorrecta identificación de los aislamientos de *C. dubliniensis* como *C. albicans*. En los últimos años se describieron diversos métodos fenotípicos para la identificación de *C. dubliniensis* y su diferenciación de *C. albicans* (51, 53, 54). Sin embargo, variaciones fenotípicas en *C. dubliniensis* pueden dar lugar a dificultades para su correcta identificación (45). Por ello, las técnicas moleculares son más adecuadas para la exacta identificación y diferenciación de *C. albicans* (51, 55, 56) de las otras especies de *Candida* relacionadas.

C. parapsilosis constituye la segunda especie en orden de frecuencia aislada del torrente sanguíneo en América Latina y Asia (57, 58). Esta especie está particularmente asociada con infecciones sistémicas en neonatos, y con candidemias asociadas a catéteres y a alimentación intravenosa (59). *C. parapsilosis* es sensible a la mayoría de los compuestos antifúngicos actualmente utilizados pero elevados valores de CIM (concentración mínima inhibitoria) se han observado para las equinocandinas debido a una intrínseca mutación en el gen *FKS* que codifica para la glucan sintetasa (60).

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante el uso de diferentes métodos moleculares (61), se determinó que *C. parapsilosis* es un complejo de tres grupos (I, II y III). Detallados estudios, que incluyen a MLST (*Multilocus Sequence Typing*) reconocieron a *C. parapsilosis* como Grupo I, y a *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* como grupos II y III, respectivamente.

Recientemente, se describieron a dos especies muy relacionadas con *C. glabrata*: *C. bracarensis* y *C. nivariensis* que son difíciles de identificar por métodos convencionales, por lo que, basado en las características fenotípicas se identifican como *C. glabrata* (62, 63). Estudios recientes, describieron métodos moleculares en los que se emplean cebadores específicos para poder diferenciar a estas especies relacionadas, miembros del clado *C. glabrata* (64).

El conocimiento a nivel molecular de las especies que infectan o colonizan el tracto genital femenino con énfasis en las distintas especies de *Candida* en gestantes contribuirá al conocimiento de la epidemiología molecular y de la patogenia como así también concientizará sobre la necesidad de adoptar medidas tendientes a prevenir el riesgo obstétrico.

2- HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Dado que los métodos fenotípicos no resultan concluyentes para la correcta identificación de las distintas especies de *Candida*, el desarrollo de métodos de identificación mediante el empleo de técnicas moleculares, permitirá un conocimiento más certero de la epidemiología en mujeres gestantes en Argentina, particularmente por la importancia de identificar las especies *C. albicans* y no-*C. albicans*.

3- OBJETIVOS:

- Correlacionar la frecuencia de las diferentes especies de levaduras en pacientes asintomáticas y en aquellas con diferentes manifestaciones clínicas de la CVV.
- Identificar mediante técnicas moleculares a *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana* en secreciones vaginales de gestantes inmunocompetentes.
- Identificar por técnicas moleculares a *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* en secreciones vaginales de gestantes inmunocompetentes.
- Identificar por técnicas moleculares a *C. glabrata*, *C. bracarensis* y *C. nivariensis* en secreciones vaginales de gestantes inmunocompetentes.
- Comparar las identificaciones microbiológicas convencionales con los métodos moleculares.
- Identificar las poblaciones polifúngicas más frecuentes en las muestras vaginales.
- Determinar la distribución y prevalencia de las especies de levaduras aisladas en las pacientes gestantes inmunocompetentes.
- Identificar las características macroscópicas de las secreciones vaginales.
- Conocer de la población en estudio la edad, los antecedentes patológicos y el tiempo de gestación.
- Caracterizar la descarga vaginal y la sintomatología de la descarga vaginal, picazón vaginal, sensación de ardor, disuria y dispareunia.

- Relacionar las características de las secreciones vaginales con los hallazgos microbiológicos.
- Relacionar las posibles asociaciones de los hallazgos microbiológicos con la sintomatología de las gestantes y las características de las secreciones vaginales.
- Correlacionar la frecuencia de las diferentes especies de levaduras en pacientes asintomáticas y en aquellas con diferentes manifestaciones clínicas de la CVV.

4. MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1. POBLACIÓN – MUESTRA- PROCESAMIENTO POR METODOS MICROBIOLÓGICOS CONVENCIONALES.

4.1.1. Población en estudio.

Se analizaron prospectivamente los exudados vaginales de 210 pacientes embarazadas atendidas en el Hospital Materno Infantil “Ramón Sarda” de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires con previo consentimiento informado por parte de las mismas y con la aprobación del Comité de Ética de dicha entidad nosocomial (protocolo 14/2012). Las muestras fueron recolectadas entre agosto 2012 y enero 2013.

4.1.1.2 Criterios de inclusión: muestras de mujeres embarazadas inmunocompetentes y con indicación médica para realizarse el estudio de secreción vaginal independientemente de la presencia de síntomas asociados a CVV que concurrieron al Hospital Materno Infantil “Ramón Sarda” y que presentaron su correspondiente consentimiento informado (Anexo I).

4.1.1.3 Criterios de exclusión: aquellas muestras de pacientes que no cumplieron con los criterios de inclusión anteriormente mencionados.

4.1.1.4 Obtención de datos epidemiológicos: se diseñó un cuestionario estandarizado que se completó a partir de los datos proporcionados por la paciente y obtenidos de las historias clínicas (Anexo II). De esta manera, se obtuvieron datos personales tales como edad, tiempo

de gestación, antecedentes patológicos de importancia médica, tratamiento con antibióticos y presencia de síntomas vaginales, tales como descarga de flujo vaginal, picazón, sensación de ardor, disuria y dispareunia (65). La característica de la descarga se caracterizó al tomar la muestra de acuerdo con Odds *et al.* (65).

4.1.1.5. Diseño experimental.

Las pacientes seleccionadas para el estudio siguieron el siguiente procedimiento:

- Firma del consentimiento informado (Anexo I).
- Llenado de la ficha médica general.
- Toma de las muestras microbiológicas.

4.1.2. Unidades experimentales o unidades de análisis.

Las secreciones vaginales constituyeron la población de estudio que cumplieron con los criterios de inclusión anteriormente mencionados.

4.1.2.1. Recolección de las secreciones vaginales y procesamiento en las gestantes.

Se tomaron muestras de fondo del saco vaginal (FSV) y muestras endocervicales con hisopos estériles previa colocación de un espéculo descartable.

4.1.2.2 Investigación de levaduras, VB y trichomoniasis.

Se tomaron tres muestras del FSV. La primera muestra se la colocó en un tubo conteniendo 1ml de solución fisiológica estéril, la segunda en un tubo conteniendo el medio de transporte Stuart y con la tercera se realizaron dos extendidos en portaobjetos para su posterior tinción y visualización por microscopía óptica.

4.1.2.2.1. Procesamiento de las muestras.

Examen directo y cultivos.

1-. Se procedió a la visualización por microscopía óptica de un extendido en fresco - realizado a partir de la muestra contenida en el tubo con solución fisiológica- y de los extendidos obtenidos en el ítem anterior teñidos por técnicas especiales tales como la técnica de Gram- Nicolle y la de May-Grünwald Giemsa para la eventual visualización de células epiteliales, reacción inflamatoria, levaduras, *T. vaginalis* y bacterias -tanto de la biota como de aquellas que pudieran estar asociadas a VB-.

2- La muestra contenida en solución fisiológica estéril, se procedió a cultivarla durante 48 h a 37 °C en el medio CHROMagar *Candida* (CHROMagar *Candida* Company, Francia). Dicho medio cromogénico permite evidenciar la presencia de levaduras, las posibles asociaciones entre ellas e identificar microbiológicamente cierto número de especies de *Candida*, de acuerdo al color y aspecto de las colonias.

De esta manera los aislamientos se identificaron de acuerdo al color de las colonias desarrolladas en el medio cromogénico y al estudio micromorfológico en lámina con agar leche con Tween 80 al 1% (66). A las colonias verdes se les estudió la producción de clamidoconidios sobre medio de Staib para la eventual identificación de *C. dubliniensis* (51,54). A las colonias púrpuras, que no formaron pseudohifas en la lámina en agar leche con Tween 80 al 1 % se les investigó la capacidad de asimilación de trehalosa y sacarosa para la eventual identificación de *C. glabrata* mediante el uso de tabletas de diagnóstico (Rosco Diagnostica A/S, Dk 2630 Taastrup, Dinamarca) (67). A las colonias cremosas y brillantes que no presentaron pseudomicelio en el agar leche Tween 80, se les estudió la capacidad de formación de ascosporas para la eventual identificación de *S. cerevisiae*. Para ello, se procedió a incubar dichas colonias en medio agar acetato de potasio, durante 6-10 días a 28 °C y mediante la coloración con la técnica de Kinyoun se visualizaron las ascosporas como estructuras de color rojizo debido a su naturaleza ácido-resistente.

Por último, se completó la identificación de las levaduras mediante el uso del método semiautomatizado API ID32C (*BioMérieux*, Francia).

Las levaduras obtenidas se conservaron tanto a -20 °C como a 4 °C en agua destilada. Para los estudios moleculares se usó la suspensión conservada a -20 °C con opacidad igual a la escala N° 3 de Mc Farland.

3-Con respecto a la muestra transportada en el medio Stuart, la misma se procedió a cultivarla en agar base Columbia suplementado con 5% de sangre de cordero (*BioMérieux*) durante 48 h a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂.

El diagnóstico de VB se realizó utilizando el criterio de Nugent *et al.* (68) y la detección de las células guía (CG) (69).

4.1.2.3. Estudio de la presencia de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma spp* y *Mycoplasma hominis*.

Para investigar la presencia de dichas bacterias se procedió a tomar 3 muestras de endocervix con hisopos de Dacron y se las procesó de la siguiente manera:

1- Investigación de la presencia de *N. gonorrhoeae*. Para ello, a una de las muestras recolectadas se le realizó un extendido en portaobjetos para luego colorearla con la técnica de Gram-Nicolle y se la transportó en medio Stuart. Posteriormente se la procedió a sembrar en el medio de cultivo Thayer Martin (*BioMérieux*) y se incubó a 37 °C en atmósfera de CO₂ (5%) durante 48h.

2- Investigación de *C. trachomatis*. Para ello en otra de las muestras recolectadas se le procedió a realizar la técnica de inmunofluorescencia (IF) directa con el equipo comercial *Chlamydia direct IF* (*BioMérieux*) siguiendo las especificaciones del fabricante.

3- Investigación de *Ureaplasma spp.* y *M. hominis*. A la muestra remanente se la cultivó con el equipo comercial IST (*BioMérieux*) siguiendo las especificaciones del fabricante.

La identificación de las bacterias aisladas se llevó a cabo mediante la utilización de diferentes pruebas bioquímicas convencionales ya publicadas (35, 36,37).

4.2. POBLACIÓN – MUESTRA- PROCESAMIENTO POR METODOS MICROBIOLÓGICOS CONVENCIONALES: INVESTIGACIÓN DE LA ASOCIACIÓN ENTRE *S. agalactiae* (EGB) Y *Candida* spp.

4.2.1. Población en estudio.

Se analizaron prospectivamente 64 exudados vaginales recolectados de pacientes embarazadas atendidas en el Hospital Materno Infantil “Ramón Sarda” de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires con previo consentimiento informado por parte de las mismas y con la aprobación del protocolo por parte del Comité de Ética de dicha entidad nosocomial (protocolo 14/2012). Las muestras fueron recolectadas durante los meses de enero y febrero de 2013.

4.2.1.2 Criterios de inclusión: muestras de mujeres embarazadas inmunocompetentes, con indicación médica del estudio de EGB entre la semana 35 y 37 de gestación, que concurren al Hospital Materno Infantil “Ramón Sarda” y que presentaron su correspondiente consentimiento informado (Anexo I).

4.2.1.3 Criterios de exclusión: aquellas muestras de pacientes que no cumplieron con los criterios de inclusión anteriormente mencionados.

4.2.1.4 Obtención de datos epidemiológicos: se diseñó un cuestionario estandarizado que se completó a partir de los datos proporcionados por la paciente y obtenidos de las historias clínicas (Anexo II). De esta manera, se obtuvieron datos personales tales como edad, tiempo de gestación, antecedentes patológicos de importancia médica, tratamiento con antibióticos y presencia de síntomas vaginales, tales como descarga, picazón, sensación de ardor, disuria y dispareunia (65).

4.2.1.5 Diseño experimental.

Las pacientes seleccionadas para el estudio siguieron el siguiente procedimiento:

- Firma del consentimiento informado (Anexo I).
- Llenado de la ficha médica general.
- Toma de las muestras microbiológicas.

4.2.2. Unidades experimentales o unidades de análisis.

Las secreciones vaginales constituyeron la población en estudio que cumplieron con los criterios de inclusión.

4.2.2.1. Recolección de las secreciones vaginales y del hisopado ano-rectal.

Procesamiento en las gestantes.

A todas las pacientes se les realizó un hisopado ano-rectal y del introito vaginal (sin colocación de espéculo) utilizando hisopos estériles por duplicado. Posteriormente, las muestras se transportaron en medio Stuart y se realizaron las siguientes determinaciones:

4.2.2.2. Investigación de EGB y de levaduras.

Una de las muestras se utilizó para el estudio de EGB y la otra para el estudio de levaduras del género *Candida*.

1- Para investigar la presencia de EGB, se descargó el hisopo en medio líquido de enriquecimiento selectivo [caldo Todd-Hewitt suplementado con colistina (10 µg/ml) y ácido nalidíxico (15 µg/ml)] y se lo incubó 24 h a 37 °C en aerobiosis. Posteriormente, se realizó un sub-cultivo en medio cromogénico *ChromID Strepto B (BioMérieux)* a 37 °C en aerobiosis durante 24-48 h. Se observaron las características de las colonias y se realizó la posterior confirmación serológica (SLIDEX® *Strepto Plus B BioMeriux*).

2- La muestra remanente se utilizó para investigar la presencia de levaduras del género *Candida*, y se procedió de la forma descrita anteriormente (ver apartado 4.1.2.2).

4. 3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE *CANDIDA*

La identificación molecular de las especies de *Candida* aisladas de las secreciones vaginales se realizó sobre aquellas colonias que presentaron coloración verde, púrpura, blanco o rosado en el medio CHROMagar, *Candida*.

4.3.1 Identificación molecular de las colonias verdes recuperadas del medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*).

Se realizó sobre 79 colonias verdes compatibles con *Candida* spp. obtenidas en el CROMagar *Candida*. El ADN genómico se extrajo durante el proceso de amplificación por PCR (70, 71). La PCR para la amplificación del gen *hwp1* se realizó con los siguientes pares de cebadores CR-f: 5'- GCT ACC ACT TCA GAA TCA TCA TC -3' / CR-r: 5'-GCA CCT TCA GTC GTA GAG ACG-3' empleando la siguiente mezcla de reacción: *buffer* PCR 1X, 0,200 mM de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs); 0,4µM de cada cebador, 10 µl de la suspensión de levaduras conservada a -20 °C , 1,25 U de *Taq* DNA Polimerasa (*Life Technologies Corp.*, USA), en un volumen final de reacción de 50 µl. La amplificación se realizó en un termociclador (*Minicycler DNA thermal cycler, TM MJ Research Inc.* USA) con las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización del ADN a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 53 °C durante 60 s y extensión a 72 °C por 90 s; y una extensión final a 72 °C por 10 min (39). Los productos de PCR se sembraron en un gel de agarosa 1,3 % p/v en buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) junto a un marcador de peso molecular de 100 pb. El fraccionamiento electroforético se realizó a 100V durante 60 min. El tamaño esperado de los amplicones es de 569 pb para *C. dubliniensis*, 941 pb para *C. albicans* y 700 pb para *C. africana*. Luego de la corrida electroforética se visualizaron las bandas en un transiluminador de UV.

Como controles positivos se usaron a *C. albicans* ATCC 90028 y *C. dubliniensis* del Centro de Micología de la Facultad de Medicina UBA inscripta en el GenBank como FJ8116791.1.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 4.1.

	Solución stock	solución de trabajo	µl por tubo
<i>H₂O</i>			31,45
<i>Buffer PCR</i>	10 x	1x	5 µl
<i>MgCl₂</i>	50mM	1,5mM	1,5 µl
<i>dNTP</i>	10mM	0,200 mM	1µl
<i>Primer CR-F</i>	50 mM	0,4µM	0,4µl
<i>Primer CR-R</i>	50 mM	0,4µm	0,4µl
<i>Taq DNA polimerasa</i>	5U/ml	1.25 U	0,25 µl
<i>Suspensión de levadura</i>			10 µl

Tabla 4.1 Mezcla de reacción para amplificar el gen *hwp1* mediante PCR.

4.3.1.2 Identificación molecular de *C. dubliniensis*.

Sobre las 79 colonias verdes aisladas en CHROMagar *Candida* se realizó también una PCR para la amplificación del intrón del gen de *actina* de *C. dubliniensis*. La PCR se realizó con los siguientes pares de cebadores DUBF: (5'-GTA TTT GTC GTT CCC CTT TC- 3') y DUBR: (5'-GTG TTG TGT GCA CTA ACG TC- 3'). La reacción de amplificación se realizó utilizando la siguiente mezcla de reacción: buffer PCR 1x, 0,200 mM de dNTPs; 0,4 µM de cada cebador; 10 µl de la suspensión de levadura conservada a -20 °C; 1,25 U de *Taq DNA Polimerasa* (*Life Technologies Corp.*) en un volumen final de 50 µl. La amplificación se realizó en un termociclador (*Minicycler DNA thermal cycler, TM MJ Research Inc.*) con las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización del ADN a 94 °C por 3 min, 30 ciclos: a 94 °C por 45 s, 55 °C por 45 s y una extensión a 72 °C por 45 s; seguido de una extensión final a 72 °C por

10 min (56). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1,3 % p/v en buffer TBE teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) junto con un marcador de peso molecular de 100 pb. El fraccionamiento electroforético se realizó a 100V durante 60 min. El tamaño esperado del amplicón es de 288 pb para *C. dubliniensis*. Como control positivo se utilizó una cepa de *C. dubliniensis* del Centro de Micología de la Facultad de Medicina, UBA inscripta en el GenBank como FJ8116791.1.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 4.2.

	Solución stock	solución de trabajo	µl por tubo
<i>H₂O</i>			29,95
<i>Buffer PCR</i>	10 x	1x	5 µl
<i>MgCl₂</i>	50mM	3mM	3 µl
<i>dNTP</i>	10mM	0,200 mM	1µl
<i>Primer DUBI</i>	50 µM	0,4 µM	0,4µl
<i>Primer DUBII</i>	50 µM	0,4 µM	0,4µl
<i>Taq DNA polimerasa</i>	5U/ml	1.25 U	0,25 µl
<i>Suspensión de levadura</i>			10 µl

Tabla 4.2 Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de la secuencia parcial del intrón del gen de *actina*.

4.3.2 Identificación molecular de colonias rosadas recuperadas en medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*) del complejo de *C. parapsilosis*: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

Se realizó sobre 3 colonias rosadas aisladas en el medio CHROMagar *Candida*. El ADN genómico se extrajo durante el proceso de amplificación por PCR (59, 60). La PCR se realizó con los siguientes pares de cebadores CPDET (5'-ACA AAC TCC AAA ACT TCT TCC A-3') y

CTS1R (5'-TCT TTT CCT CCG CTT ATT GAT ATG -3') que permitieron la confirmación del aislamiento como complejo *C. parapsilosis* (62). Se usaron además los pares de cebadores específicos CPAF-CPAR (5'-TTT GCT TTG GTA GGC CTT CTA-3'; 5'- GAG GTC GAA TTT GGA AGA AGT -3'), CORF-CORR (5'- TTT GGT GGC CCA CGG CCT -3'; 5'- TGA GGT CGA ATT TGG AAG AAT T-3') y CMEF-CMER (5'- TTT GGT GGG CCC ACG GCT-3'; 5'- GAG GTC GAA TTT GGA AGA ATG T-3') para *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, respectivamente (63). La reacción de amplificación por PCR se optimizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización del ADN a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 63 °C por 1 min y 72 °C por 1 min con una extensión final a 72 °C por 10 min (63). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1,3 % p/v en *buffer* TBE teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) junto con un marcador de peso molecular de 100 pb. El fraccionamiento electroforético se realizó a 100V durante 60 min. El tamaño esperado de los amplicones es de 379 pb para *C. parapsilosis*, 367 pb para *C. orthopsilosis* y 374 pb para *C. metapsilosis*.

Como control positivo se usó a *C. parapsilosis* ATCC 22019. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 4.3.

	Solución stock	solución de trabajo	µl por tubo
<i>H₂O</i>			31,25 µl
<i>Buffer PCR</i>	10 x	1x	5 µl
<i>MgCl₂</i>	50mM	3mM	3 µl
<i>dNTP</i>	10mM	0,1 mM	0,5µl
<i>Cebadores</i>	50 µM	10 µM	0,2µl
<i>Cebadores</i>	50 µM	10 µM	0,2µl
<i>Taq DNA polimerasa</i>	5U/ml	1.25 U	0,25 µl
<i>Suspensión de levadura</i>			10 µl

Tabla 4.3 Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de la región de los ITS para las levaduras del complejo *C. parapsilosis*.

4.3.3 Identificación molecular del complejo de colonias purpuras-blancas (63) recuperadas en medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*) *C. glabrata*, *C. bracarensis* y *C. nivariensis* (complejo *C. glabrata*) y *S. cerevisiae*.

Este estudio se realizó sobre 7 colonias de *Candida* spp. que fueron púrpuras-blancas en el CHROMagar *Candida* (6 correspondían al complejo de *C. glabrata* y una a *S. cerevisiae*). El ADN genómico se extrajo durante el proceso de amplificación por PCR (59, 60). La PCR se realizó con los pares de cebadores (RPL31cgF 5'-GCC GGT TTG AAG GAC GTT GTT ACT- 3' y RPL31cgR 5'- GAA CAA TGG GTT CTT GGC GT-3'). La reacción de amplificación se efectuó en un volumen de reacción de 50 µl conteniendo 1x de buffer de PCR, 0,5 µM de cada cebador, 0,25 mM de cada dNTP; 0,5 U de *Taq* DNA Polimerasa (*Life Technologies Corp.*) y 10 µl de la suspensión de levadura (ADN templado). Las condiciones de amplificación se modificaron a lo indicado por Enache-Angoulvant *et al* (64), en lo que respecta a la temperatura de *annealing*. Para ello, se realizaron las PCR a 62, 58 y 55 °C como temperatura de *annealing*. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 % p/v en buffer TBE teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) junto con un marcador de peso molecular de 100 pb. El fraccionamiento electroforético se realizó a 100V durante 60 min. Los amplicones esperados son de 1061 pb para *C. glabrata* y 691 pb para *S. cerevisiae*. *C. bracarensis* y *C. nivariensis* se evidenciarán con un tamaño de banda de 900 y 670 pb respectivamente. Como controles positivos se usaron: *C. nivariensis* DMIC 134286 proveniente del Instituto Malbrán, *S. cerevisiae*, *C. dubliniensis*, *C. haemulonii* y *C. tropicalis* provenientes del cepario del Centro de Micología de la Facultad de Medicina de la UBA, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. orthosilopsis* NRRL Y-48468 y *C. metapsilosis* NRRL Y-48469.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 4.4.

	<i>Solución stock</i>	<i>Solución de trabajo</i>	<i>µl por tubo</i>
<i>H₂O</i>			29,5
<i>Buffer PCR</i>	10 x	1x	5 µl
<i>MgCl₂</i>	50mM	3mM	3 µl
<i>dNTP</i>	10mM	0,25 mM	1,25µl
<i>Cebador RPL31cgF</i>	50 µM	0,5 µM	0,5µl
<i>Cebador RPL31cgF</i>	50 µM	0,5µM	0,5µl
<i>Taq DNa polimerasa</i>	5U/ml	1.25 U	0,25 µl
<i>Suspensión de levadura</i>			10 µl

Tabla 4.4. Mezcla de reacción para la amplificación del gen *rlp31* que codifica para la proteína ribosomal 60S.

4.4. PROCESAMIENTO Y ANALISIS ESTADISTICOS DE LOS DATOS.

Para el análisis de los resultados obtenidos se utilizó el programa GraphPad Prism (versión 6.0 para Windows; GraphPad Software, La Jolla, California, USA). En todos los casos se calcularon los porcentajes o los promedios con sus correspondientes valores de desvío estándar (SD). La comparación de las variables clínicas se realizó mediante el *test* de ANOVA. Las diferencias respecto a los controles fueron consideradas estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

4.5. ANEXOS

Anexo I: Formulario de consentimiento

Hospital Materno Infantil "R. Sardá"

Para participar como paciente en el trabajo de investigación "**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LA CANDIDIASIS VULVOVAGINAL (CVV) EN GESTANTES EN ARGENTINA. RELACIÓN CON LAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS (PORTACIÓN vs. CVV)**"

A-Propósito y antecedentes.

En el Hospital Materno Infantil "Ramón Sardá" se estudiará la presencia de microorganismos de sus secreciones vaginales. El estudio se llevará a cabo en mujeres que se encuentren embarazadas, inmunocompetentes en el momento del estudio y tengan indicado (**por orden del médico tratante**) el estudio de la secreción vaginal e independientemente de la presencia o ausencia de síntomas de CVV.

Ud. colaborará con este estudio permitiendo que con el instrumental habitual para el mismo se extraiga el material para diagnosticar la presencia de microorganismos.

En el caso que se encuentre con microorganismos, se logrará un aporte de conocimientos útiles para mejores diagnósticos y tratamientos.

B- Procedimientos que se aplicarán

Para participar de este estudio usted no debe haber tomado antibióticos, corticoides, antifúngicos locales ni sistémicos en las últimas tres semanas. Ud. deberá completar un cuestionario sobre su historia médica que no le demandará más de 10 minutos.

Para su atención y toma de muestra se aplicarán normas de bioseguridad vigentes como el uso de guantes e instrumental debidamente esterilizado y controlado.

Previo a la toma de muestra de secreción vaginal se colocará un espéculo y con un hisopo estéril se procederá a tomar la muestra de flujo vaginal. Esto le permitirá conocer la presencia de microorganismos que puedan causarle los síntomas que presenta al momento de la consulta o que pueden residir sin causarle ninguna molestia. .

C- Confidencialidad

Su nombre no se publicará en ningún documento, informe o publicación resultante de este estudio.

Los archivos con sus datos se guardarán bajo estricta confidencialidad y se usaran códigos de identificación para preservar el anonimato del estudio.

D- Beneficios

Se espera que los resultados de este estudio permitan una mejor comprensión de la infección por microorganismos en la región vulvovaginal en gestantes.

E- Consideraciones financieras

Ud no pagará por ninguno de los procedimientos del estudio, de la toma de muestra o pruebas de laboratorio asociados a esta investigación. Tampoco recibirá pago o beneficio financiero.

G- Preguntas.

Si tiene algún tipo de preguntas no dude en realizarlas al profesional a cargo del estudio Bioquímica M. Josefina Mucci Cel N°: 1561384199 y/o en el Servicio de Microbiología Tel N°:49433567 interno 7203.

La participación en esta investigación es **Voluntaria**. Usted tiene derecho a declinar su participación y su retiro no influirá como paciente de la Maternidad Sardá.
Si Ud. ha comprendido esta explicación y está de acuerdo en participar en este estudio puede firmar a continuación

Nombre y apellido

fecha

Firma del paciente

Firma del testigo y Aclaración

Nombre y apellido del investigador

fecha

Firma del Investigador

5. Resultados.

5.1 Características poblacionales y clínicas de las gestantes estudiadas.

5.1.1 Características de la población de gestantes estudiadas.

Se estudiaron 210 pacientes con edades comprendidas entre los 10 y 42 años (el promedio de las edades fue de 27,9 años \pm 6,5). El 48,1 % de las gestantes estudiadas tenían entre 21 y 30 años, mientras que el 12,9% eran menores de 20 años y el 39% eran mayores de 30 años. La distribución de edades se puede observar en la figura 5.1.

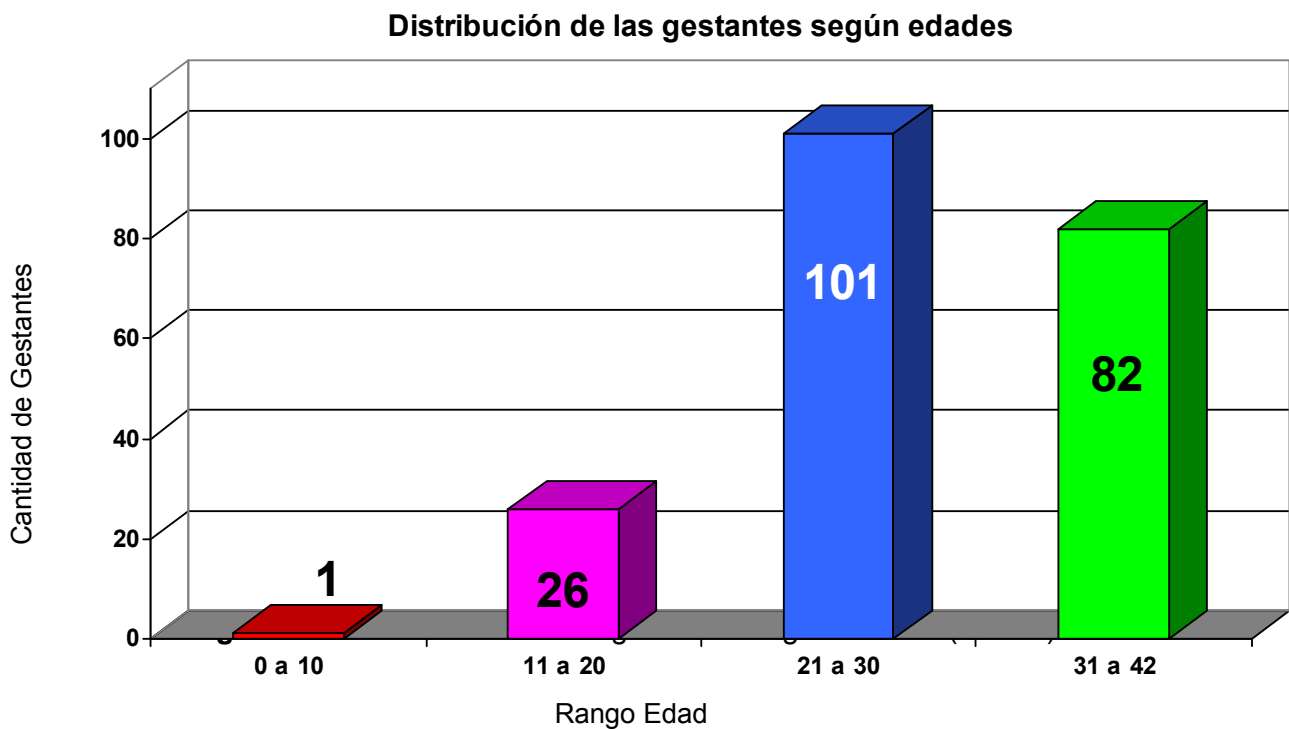


Figura 5.1: Distribución de las gestantes según edades (N=210).

De acuerdo al país de origen de las gestantes estudiadas, 153 fueron procedentes de Argentina (72,9%), 38 de Bolivia (18,1%), 14 de Paraguay (6,7%), 4 de Perú (1,9%) y 1 de EE.UU (0,5%). La distribución según la nacionalidad se observa en la figura 5. 2.

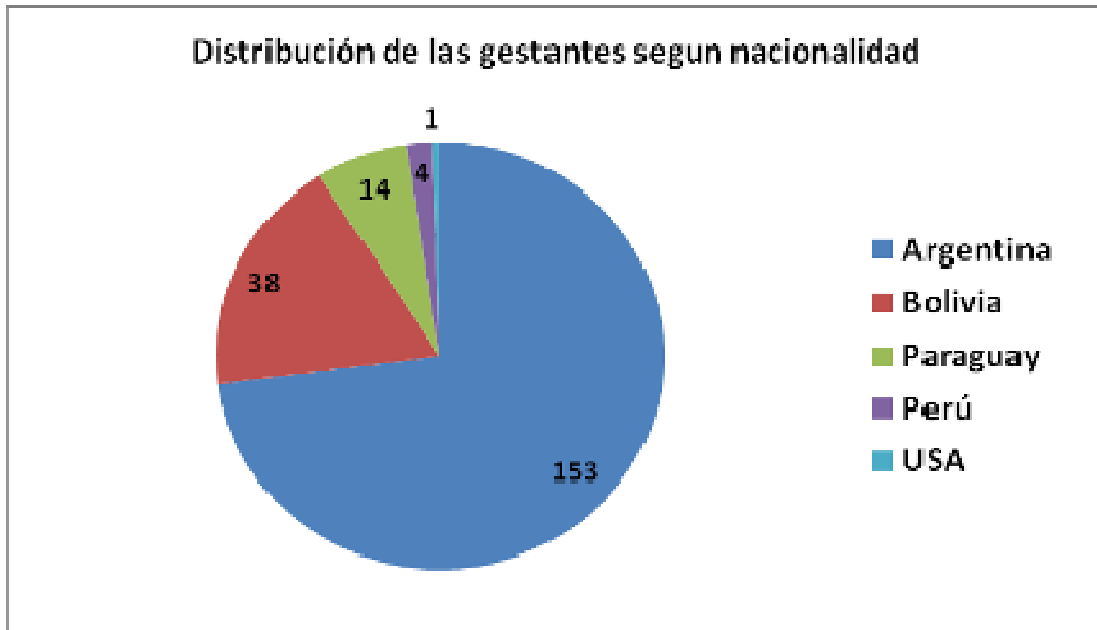


Figura 5.2: Distribución de las gestantes según la nacionalidad (N=210).

El tiempo de gestación promedio de las pacientes fue de aproximadamente $24,8 \pm 6,8$ semanas. El 7,6 % de las mismas (16/210) se encontraba cursando el primer trimestre de embarazo (semanas 1 a 12), mientras que el 60% (126/210) se encontraba cursando el segundo trimestre (semanas 13 a 28) y el 32,4% restante (68/210) el tercer trimestre (semanas 29 a la 40).

5.1.2 Antecedentes clínicos de las pacientes estudiadas obtenidos a partir de sus correspondientes historias clínicas.

Las enfermedades de base referidas fueron:

- Diabetes: 1 paciente (0,5%)
- Enfermedad de Chagas: 1 paciente (0,5%)
- Salpingitis: 1 paciente (0,5%).
- Síndrome antifosfolipídico: 1 paciente (0,5%).
- Asma: 1 paciente (0,5%).
- HIE (hipertensión inducida por el embarazo): 1 paciente (0,5%).

En las últimas dos semanas previas a la extracción de la secreción vaginal 9 pacientes (4,2%) recibieron tratamiento antibiótico, 2 tratamiento antiinflamatorio (1%) y las restantes (94,8 %) pacientes refirieron no estar tomando medicamento alguno.

5.1.3 Complicaciones del embarazo.

Las complicaciones se presentaron en el 38,6% de las pacientes estudiadas (81/210). La más frecuente fue la amenaza de parto prematuro (APP) en 47 casos (58,0%), flujo a repetición en 15 casos (18,5%), ruptura prematura de membranas (RPM) en 10 casos (12,3%), abortos en 5 casos (6,2%), metrorragia en 2 casos (2,5%), feto muerto en 1 caso (1,2%) y corioamnionitis en 1 caso (1,2%).

Al considerar las complicaciones obstétricas en las pacientes sintomáticas *versus* las asintomáticas (tabla 5.1) observamos que la mayor complicación que presentaron las pacientes sintomáticas fue el flujo abundante a repetición (86,7% vs 13,3%) en tanto que la APP se presentó con mayor prevalencia en el grupo asintomático (29,8% vs 70,2%).

Complicaciones del embarazo	Sintomáticas	Asintomáticas
	N (%)	N (%)
APP	14 (29,8%)	33 (70,2%)
Flujo a repetición	13 (86,7%)	2 (13,3 %)
RPM	5 (50%)	5 (50%)

Tabla 5.1: Complicaciones obstétricas en las gestantes sintomáticas vs no sintomáticas.

5.1.4 Manifestaciones clínicas de las gestantes.

De las 210 embarazadas estudiadas, solamente 80 presentaron sintomatología siendo esta más prevalente en el segundo y tercer trimestre (48,7% y 38,7%; $p = 0,05$). Por otro lado, debemos señalar que en el grupo estudiado la consulta ginecológica fue mayor en el segundo y tercer trimestre (tabla 5.2) lo cual es coincidente con una mayor prevalencia de la candidiasis vaginal.

	Sintomáticas	Asintomáticas
	N (%)	N (%)
Edad gestacional	24,8 (8-37)	24,8 (8-36)
1er trimestre	10 (12,5%)	6 (4,6%)
2do trimestre	39 (48,7%)	87 (67%)
3er trimestre	31 (38,7%)	37 (27,7%)

Tabla 5.2: Tiempo gestacional de las pacientes sintomáticas (N=80) vs no sintomáticas (N=130).

El 38,1 % (80/210) de las embarazadas fueron sintomáticas y entre las manifestaciones clínicas se documentó flujo vaginal abundante en el 100% (80/80), prurito en el 46,2% (37/80), ardor en el 22,5% (18/80) y disuria en el 6,2% (5/80). Ninguna de las gestantes refirió dispareunia.

En cuanto a las características de la secreción vaginal de las pacientes sintomáticas: en el 70% de los casos (56/80) fue blanco, en el 20% (16/80) fue transparente, en el 8,7% (7/80) fue gris, en el 1,2% (1/80) fue verde claro y en el 1,2% (1/80) fue amarillo. Cabe destacar que el flujo transparente fue característico de todas las gestantes asintomáticas ($p < 0,0001$) en tanto que el flujo blanco lo fue en las pacientes sintomáticas ($p < 0,0001$; tabla 5.3).

	Sintomáticas	Asintomáticas	p
	N (%)	N (%)	
Edad	27,52 (15-40)	28,17 (10-42)	
Flujo blanco	56 (70%)	7 (5,4%)	<0,0001
Flujo transparente	16 (20%)	114 (87,7%)	<0,0001
Flujo gris	7 (8,7%)	8 (6,2%)	0,504
Flujo amarillo	1 (1,2%)	0	0,206
Flujo verde claro	1 (1,2%)	0	0,206

Tabla 5.3: Características de las secreciones vaginales según la población estudiada sintomática (N=80) vs asintomática (N=130).

5.2. A. Estudios Microbiológicos.

5.2. A.1. Reacción inflamatoria en las gestantes:

En el 85,2% de las gestantes sintomáticas se evidenció una reacción inflamatoria con leucocitos abundantes o regulares.

5.2. A.2 Examen micológico. Investigación de las distintas especies de *Candida*.

Como se indica en la tabla 5.4, el examen directo en fresco o con azul de lactofenol fue positivo en 69 muestras de las 210 estudiadas (32,9%), mientras que el cultivo en CHROMagar *Candida* fue positivo en 70 de las 210 muestras analizadas (33,3%). El examen directo en fresco se consideró positivo cuando se observó la presencia de levaduras o levaduras con

pseudomicelios (figuras 5.3 A y B). Se observaron levaduras en 43 muestras (62,3%) y levaduras con pseudomicelios en 26 (37,7%).

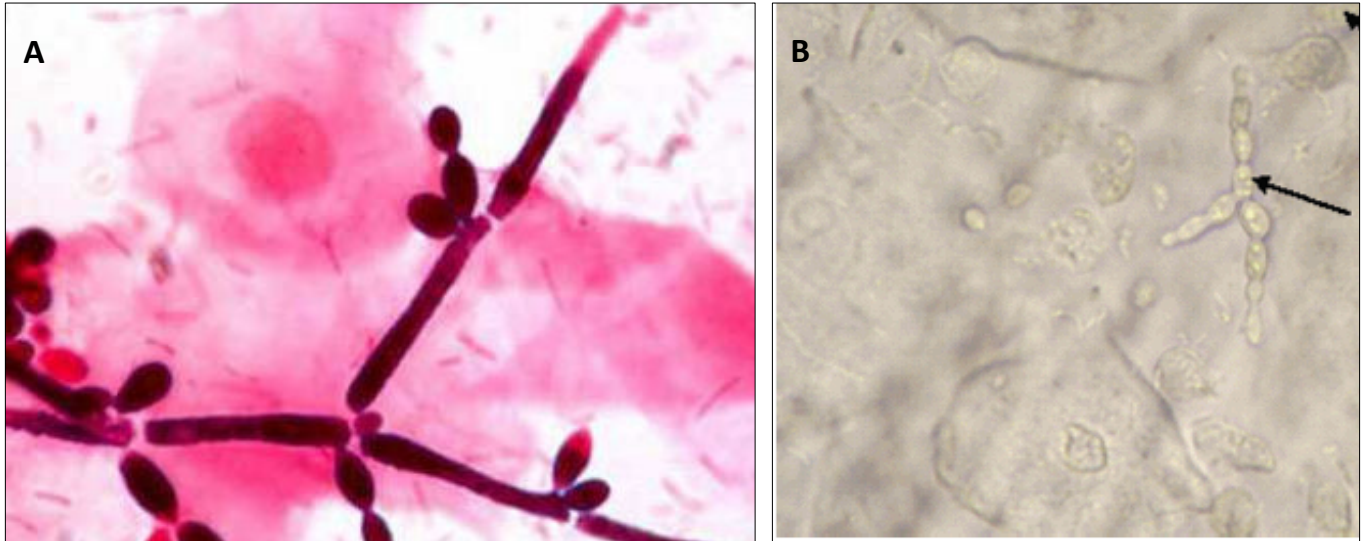


Figura 5.3: Observación de levaduras y pseudomicelios en un extendido de la secreción vaginal **A:** coloración de Gram-Nicolle; **B:** en fresco (40x).

Al relacionar los hallazgos microbiológicos en los dos grupos de pacientes sintomáticos y asintomáticos (tabla 5.4) observamos que tanto el examen directo micológico como el cultivo fueron positivos en las pacientes sintomáticas ($p < 0,0001$).

	Sintomáticas	Asintomáticas	<i>p</i>
	N (%)	N (%)	
Directo micológico positivo	55 (79,7%)	14 (20,2%)	<0,0001
Cultivo positivo	52 (74,3%)	18 (25,7%)	<0,0001

Tabla 5.4: Resultado de los exámenes micológicos directos positivos y cultivos en gestantes sintomáticas y asintomáticas.

5.2. A.2 Cultivo en medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*).

De las 210 gestantes estudiadas, se aislaron levaduras en 70 (33,3%), de las cuales 67 presentaron una única especie (95,7%) y 3 solamente dos especies (4,3%; tabla 5.5). En 2 de las muestras se observaron las asociaciones entre *C. albicans* y *C. glabrata* y en la restante entre *C. albicans* y *C. tropicalis*. En las figuras 5.4 y 5.5 se observan las levaduras aisladas de los exudados vaginales de las pacientes analizadas. El aislamiento de levaduras fue mayor en el segundo y tercer trimestre comparado con el primer trimestre ($p= 0,01$) en concordancia con la mayor sintomatología de las pacientes a medida que avanza el embarazo (tabla 5.5 y figura 5.6).



Figura 5.4: Aislamiento de *Candida* spp. a partir de secreciones vaginales de las gestantes en CHROMagar, *Candida*. Colonias verdes corresponde a *C. albicans*, las colonias azules corresponden a *C. tropicalis* y las rosadas a *Candida* spp.

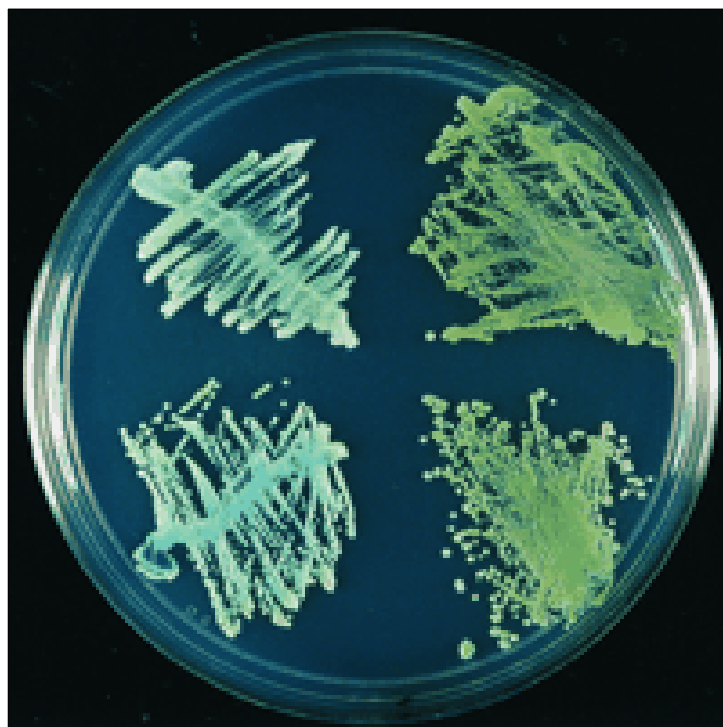


Figura 5.5: Aislamiento de *Candida* spp a partir de secreciones vaginales de las gestantes en CHROMagar, *Candida*. Colonias verdes corresponde a *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Edad gestacional (N de pacientes)	Levaduras N (%)
1 ^{er} trimestre (N=16)	10 (14,29)
2do trimestre (N=126)	35 (50)
3er trimestre (N= 68)	25 (35,71)
total	70 (100)

Tabla 5.5: Aislamientos de levaduras en los diferentes trimestres del embarazo.

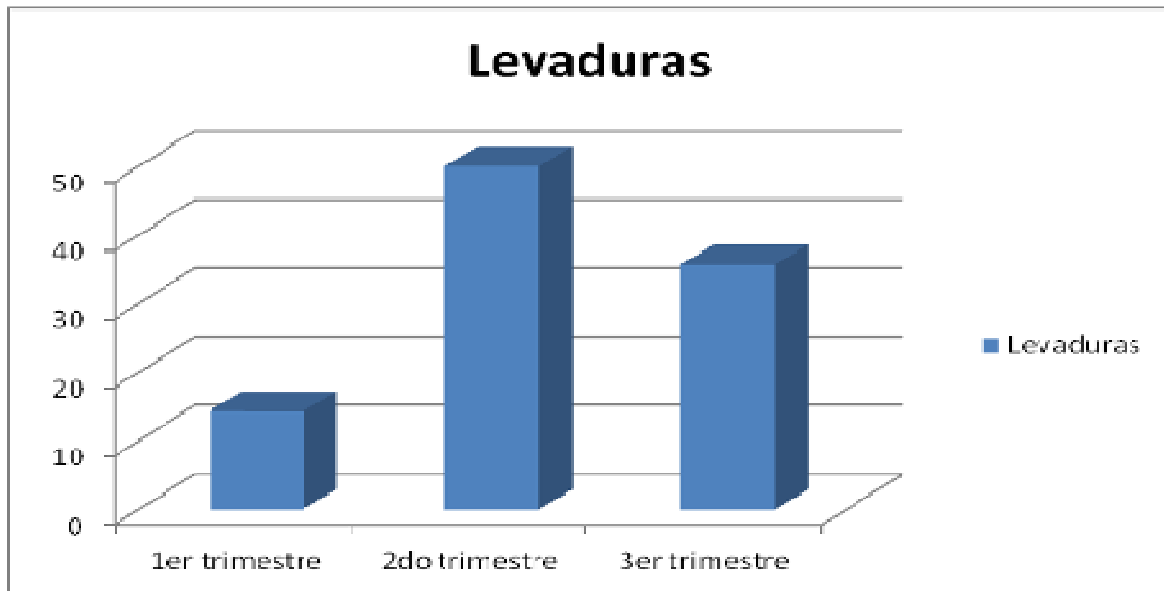


Figura 5.6: Aislamientos de levaduras en los diferentes trimestres del embarazo.

5.2. A.3 Identificación de las especies de *Candida*.

Los criterios morfológicos basados en la coloración de las colonias en medio cromogénico, la observación micromorfológicas con agar leche y Tween 80 al 1 % (figura 5.7), la observación de clamidoconidios en medio de Staib (figuras 5.8 A y B), las pruebas bioquímicas como la utilización de sacarosa y de trehalosa y la formación de ascos en medio para ascosporas y tinción posterior con Kinyoun permitieron la identificación de las diferentes especies de levaduras en las secreciones vaginales (tabla 5.6 y figuras 5.9 A y B, 5.10, 5.11 A y B, 5.12 A y B, 5.13, 5.14 A, B y C).



Figura 5.7: Observación de clamidoconidios de *C. albicans* con agar leche y Tween 80 al 1% (40x).

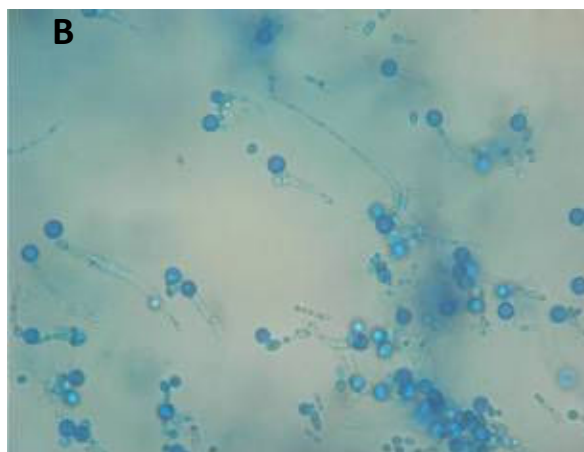
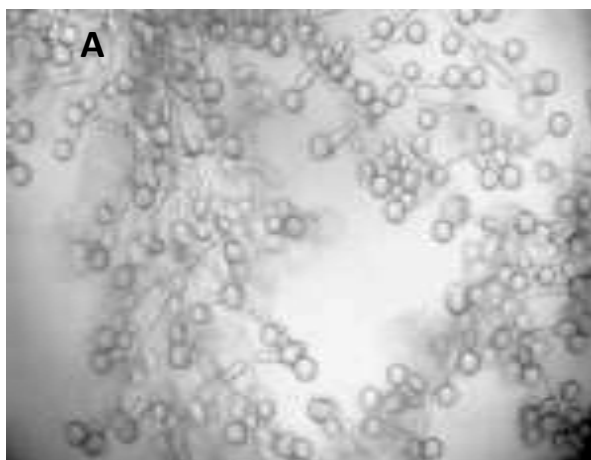


Figura 5.8: Observación de clamidoconidios de *C. dubliniensis*. **A:** agar leche y Tween 80 al 1% y **B:** en medio de Staib (20x).

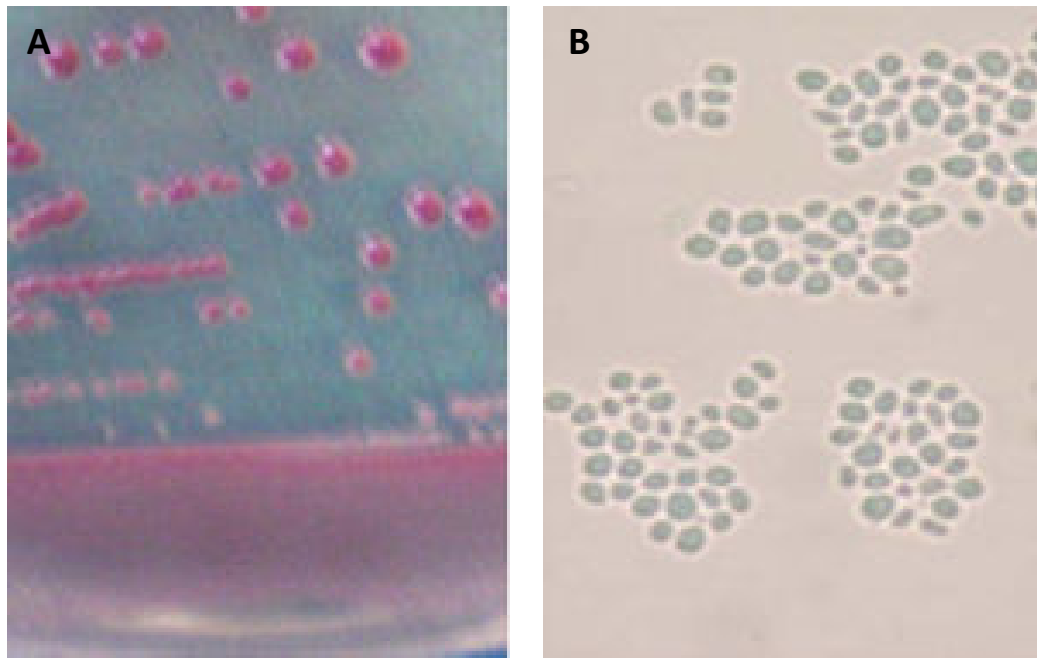


Figura 5.9: Observación A) Macromorfológica en ChromAgar *Candida* y B) Micromorfología en agar leche Tween 80 al 1 % de *Candida glabrata*.

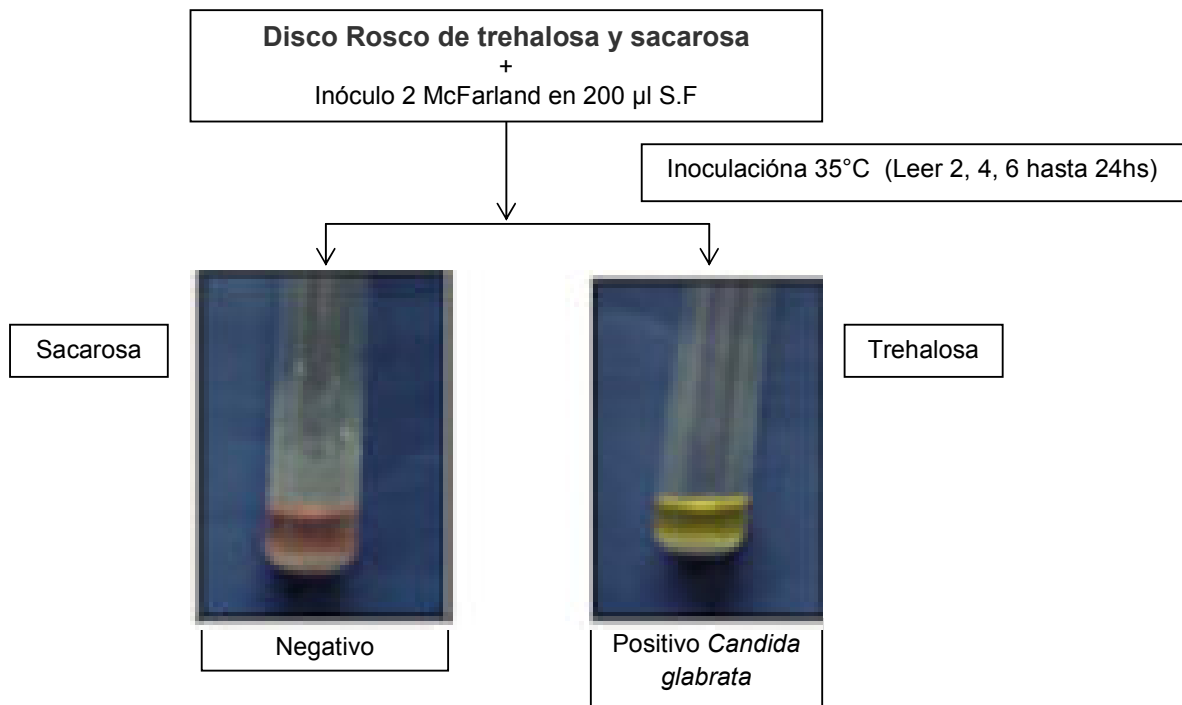


Figura 5.10: Pruebas de identificación de *C. glabrata*.

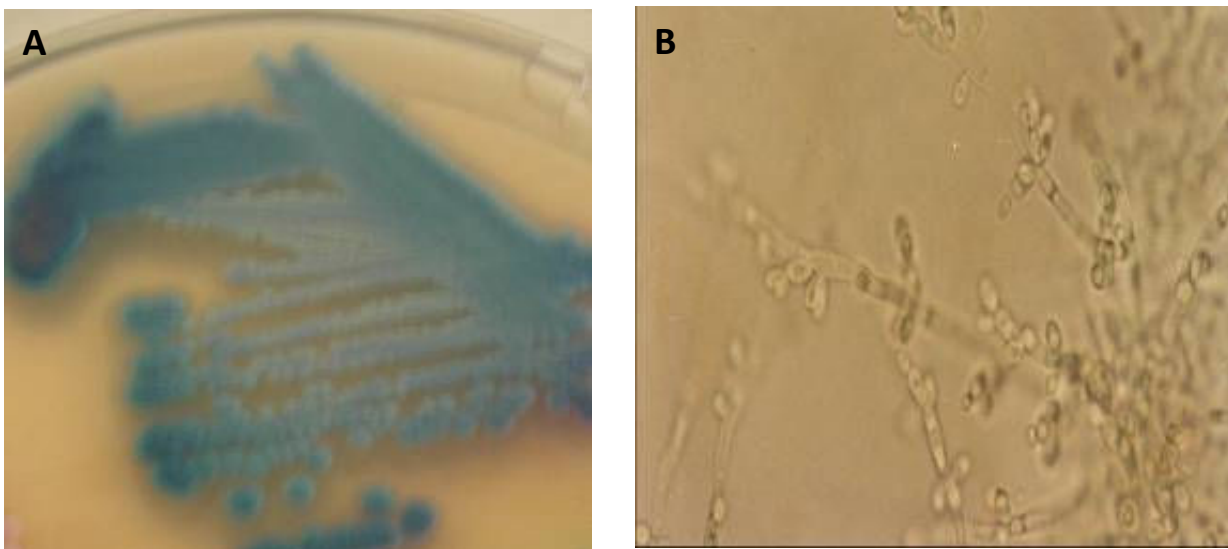


Figura 5.11: Observación **A)** macromorfológica en Chromagar *Candida* y **B)** micromorfológica en agar leche Tween 80 al 1% de *C. tropicalis*.

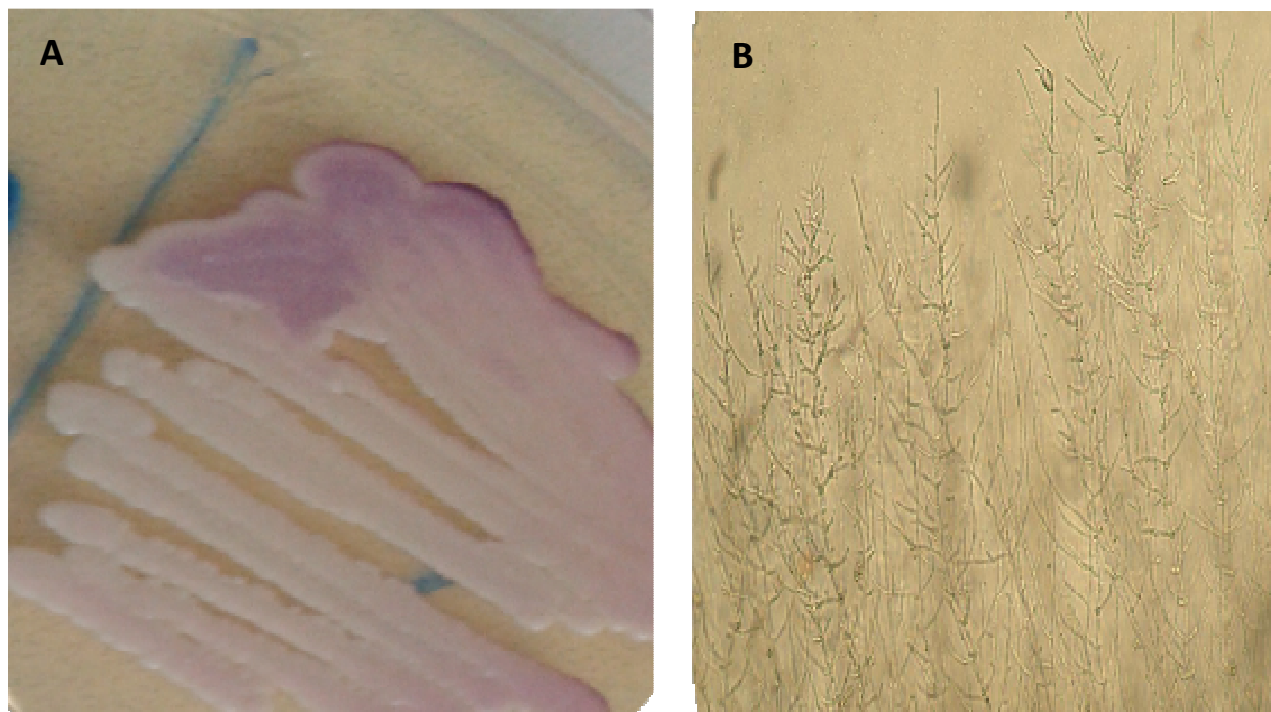


Figura 5.12: Observación **A)** macromorfológica en CHROMagar *Candida* y **B)** micromorfológica en agar leche Tween 80 al 1%.



Figura 5.13: Perfil de asimilación en API ID32 C (BioMérieux) de *C. parasilopsis*.

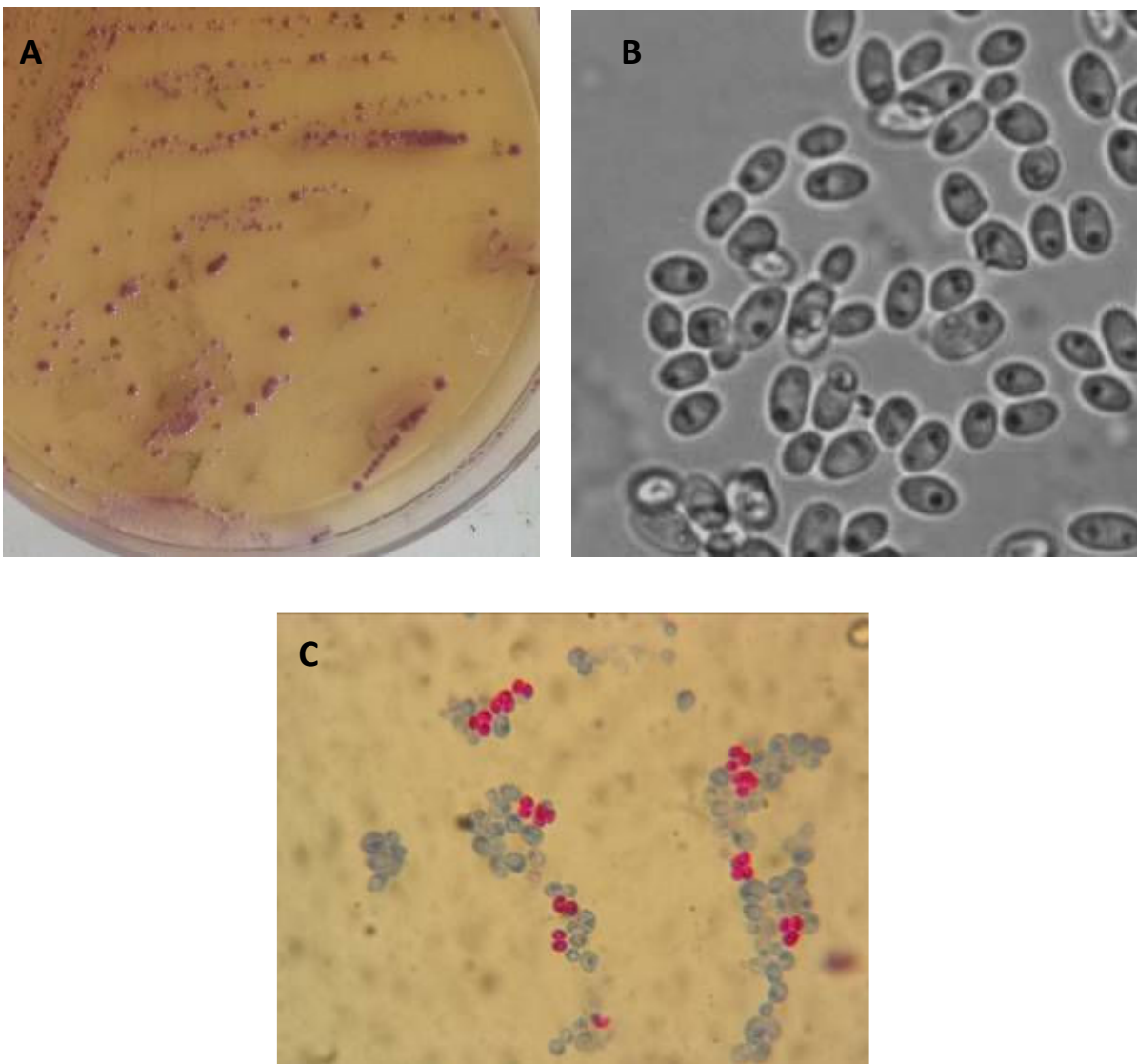


Figura 5.14: Observación **A)** macromorfológica en CHROMagar *Candida* y **B)** micromorfología en agar leche Tween 80 al 1% y **C)** observación de ascos con ascosporas de *S. cerevisiae* (tinción de Kinyoun 100x).

5.2. A.3.1 Distribución de las especies de *Candida* en las secreciones vaginales de las gestantes.

Las levaduras aisladas de las secreciones vaginales de las pacientes gestantes fueron *C. albicans* (N=51; 72,8%), *C. dubliniensis* (N=3; 4,2%), *C. glabrata* (N=3; 4,2%), *C. parapsilosis* (N=1; 1,4%), *S. cerevisiae* (N=1; 1,4%), *C. inconspicua*. (N=1; 1,4%), *Rhodotorula* spp (N=7; 10%), la asociación de *C. albicans* con *C. glabrata* (N=2; 2,8%) y la asociación *C. albicans* con *C. tropicalis* (N=1; 1,4%). La distribución de las especies de *Candida* en pacientes sintomáticas y asintomáticas se describe en la tabla 5.6. La especie *C. albicans* fue prevalente en las pacientes sintomáticas siendo significativa la diferencia estadística ($p = 0,005$) en tanto que *Candida* no-*albicans* resultó ser prevalente en las pacientes asintomáticas ($p = 0,0038$). *C. inconspicua*, *S. cerevisiae* y *Rhodotorula* spp. se observaron en las pacientes asintomáticas con $p=0,553$, $0,553$ y $0,004$, respectivamente. Es de destacar la observación significativa de *Rhodotorula* spp. en el grupo de las pacientes asintomáticas.

Especies de levaduras	VVC	Portación	TOTAL
	Sintomáticas	Asintomáticas	
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>C. albicans</i>	42 (80,7)	9 (50)	51 (72,8)
<i>C. dubliniensis</i>	2 (3,8)	1 (5,5)	3 (4,3)
<i>C. glabrata</i>	2 (3,8)	1 (5,5)	3 (4,3)
<i>C. inconspicua</i>	0	1 (5,5)	1 (1,4)
<i>Rhodotorula</i> spp	2 (3,8)	5 (27,8)	7 (10)
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	2 (3,8)	0	2 (2,8)
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>	1 (1,9)	0	1 (1,4)
<i>C. parapsilosis</i>	1(1,9)	0	1 (1,4)
<i>S. cerevisiae</i>	0	1 (5,5)	1 (1,4)
TOTAL	52 (100)	18 (100)	70 (100)

Tabla 5.6: Distribución de las especies de levaduras aisladas de las secreciones vaginales en pacientes sintomáticas (N=52) y asintomáticas (N=18).

5.3. Estudios Microbiológicos. Investigación de *Vaginosis bacteriana (VB)*

La VB se detectó en 38 pacientes de las 210 (18,09%) analizadas, con una edad promedio de $28,05 \pm 6,8$ (16-39 años), y una edad gestacional promedio de $26,05 \pm 5,6$ (14-36 años; tabla 5.7 y figura 5.15). El 71,1% de las pacientes con VB se encontraba cursando el 2^{do} trimestre de embarazo (27/38) y las restantes (11/38) en el 3^{er} trimestre de gestación. Las gestantes con VB no eran diabéticas y solo una se encontraba con antecedente de antibióticoterapia. El 39,5% de las pacientes con VB fueron sintomáticas (15/38), en tanto que el prurito (N=4), ardor (N=1) y flujo abundante (N=15) fueron las sintomatologías más frecuentes (tabla 5.7 y figura 5.15). Con respecto al aspecto de las secreciones vaginales, 14 resultaron grises, 10 blancas y 10 transparentes. Se observó reacción inflamatoria en el 34,2% (13/38) de los casos de VB. La VB se asoció a cultivo positivo para *Candida* en 8 pacientes (3,8%; tabla 5.8), de las cuales, en 7 se observó asociación con *C. albicans* y en 1 con *C. glabrata*.

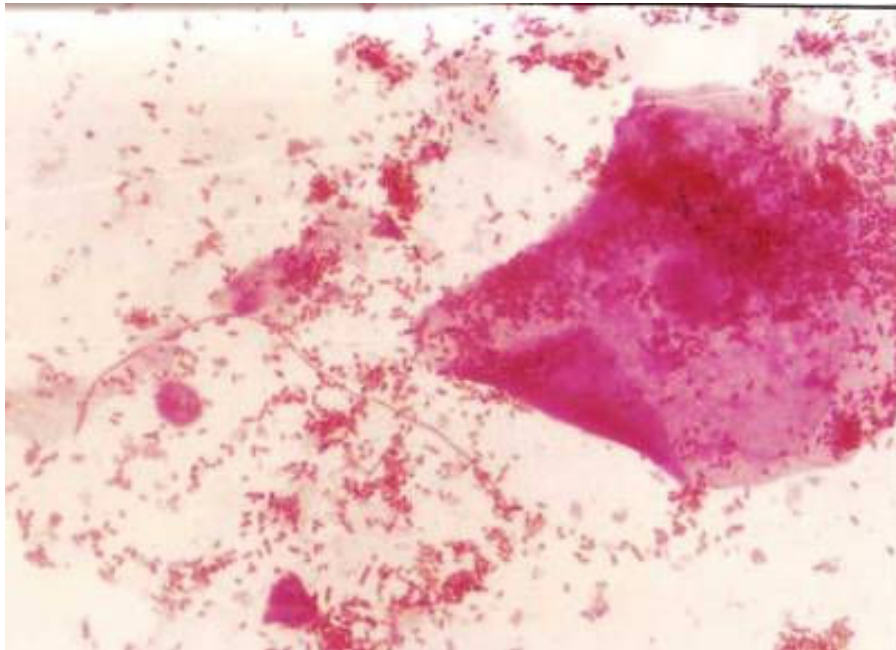


Figura 5.15: Observación con coloración de GRAM del flujo vaginal de una paciente con VB (100X).

5.4. Estudios Microbiológicos. Investigación de *Mycoplasma hominis*.

Se diagnosticaron un total de 6 muestras con *M. hominis* en las gestantes que presentaron una edad promedio de 29,0 años \pm 7,0 con un rango de 18-39 años, encontrándose 5 en el 2^{do} trimestre de embarazo (83,3%), y la restante en el 3^{er} trimestre (16,7%; tabla 5.7). Las gestantes no eran diabéticas ni recibieron antibióticos previos a la recolección de la muestra. Desde el punto de vista clínico, todas las pacientes fueron asintomáticas, excepto una que presentó secreción vaginal abundante y en la cual se encontró la asociación de *C. albicans* y con *Ureaplasma* spp (tabla 5.7 y 5.8). Las características del flujo fueron transparentes en 4, grisáceo en 1 y blanco en la restante.

5.5. Estudios Microbiológicos. Investigación de *Ureaplasma* spp.

Se diagnosticaron 37 pacientes de las 210 estudiadas (17,6%) con *Ureaplasma* spp. Las mismas presentaban una edad promedio de 27 años \pm 6,3 (16-39 años). El 8,1% (3/37) se encontraban cursando el 1er trimestre de embarazo, el 62,2% (23/37) el 2^{do} trimestre y el 29,7% restante (11/37) estaba cursando el último trimestre de embarazo. En ninguna de las gestantes se encontró diabetes asociada pero el 5,4% (2/37) presentó como antecedente haber recibido antibióticos. El 40,5% (15/37) de las pacientes presentaron síntomas de los cuales, la secreción vaginal estuvo presente en 15 gestantes, el prurito en 11, el ardor en 4 y la disuria en 2 casos (tabla 5.7). En cuanto a las características de las secreciones vaginales el 2,7% resulto ser verde claro, el 8,1% gris, el 54,1% transparente y el 35,1% blanco 13. Se observó respuesta inflamatoria en el 73% (27/37) de las gestantes. Se halló coinfección con *Candida* spp. en 11 pacientes (5,2%; tabla 5.8) de los cuales 7 presentaron coinfección con *C. albicans*, 2 con *C. dubliniensis* y 2 con *C. glabrata*. Cabe destacar que en un caso se encontró la asociación de *C. albicans*, *Ureaplasma* spp. y VB y en otro se encontró asociación *C. albicans*, *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* (tabla 5.8).

5.6. Estudios Microbiológicos. Investigación de *Chlamydia trachomatis*.

En tres gestantes (1,43%) se halló a *C. trachomatis*, cuya edad promedio fue de 28 años \pm 9,8 (17-34 años; tabla 5.7 y 5.8). Dos de las pacientes, cursaban el segundo trimestre y la restante el 3^{er}. La sintomatología se encontró en una sola paciente que refirió como molesta la secreción vaginal (tabla 5.7 y figura 5.16). El 100 % tuvo flujo transparente. El tratamiento con antibióticos se asoció en un solo de los casos. Se evidenció la presencia de respuesta inflamatoria en la secreción vaginal en 2 de las gestantes. No se encontró la asociación con *Candida* spp.

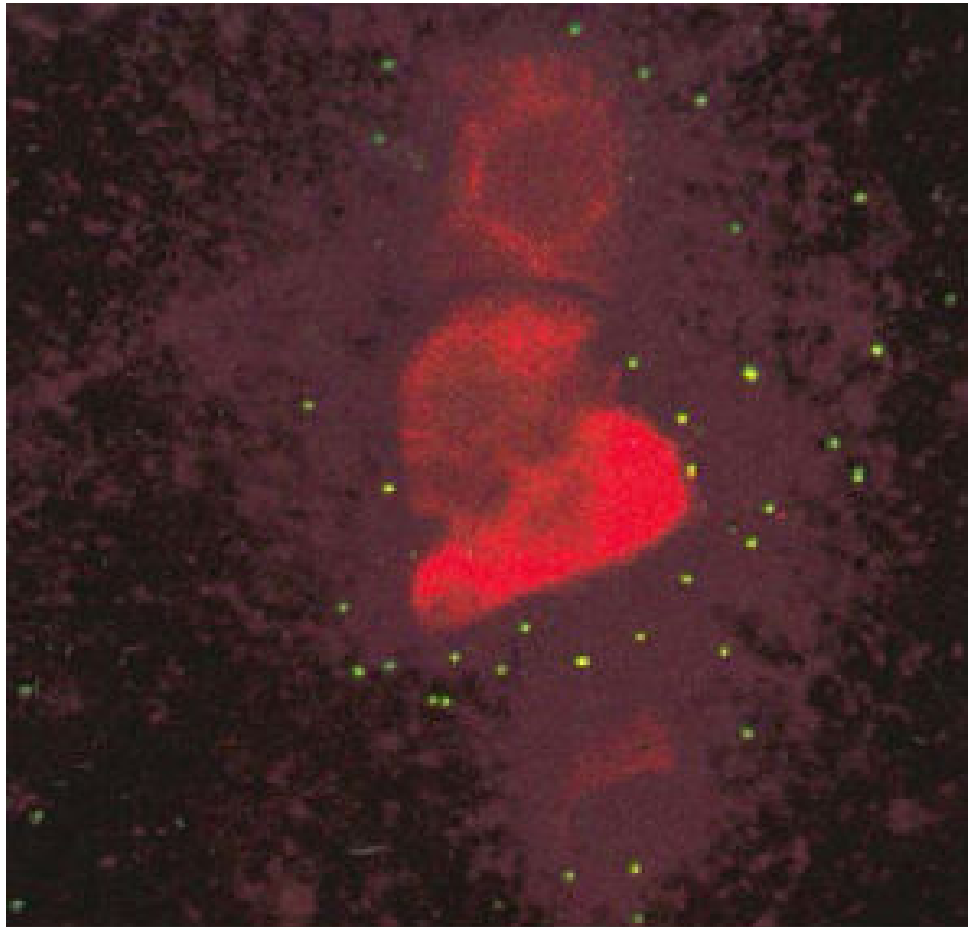


Figura 5.16: Observación de *C. trachomatis* en flujo vaginal por IF directa (100x).

5.7. Estudios Microbiológicos. Investigación de *Trichomonas vaginalis*.

Del total de las 210 pacientes estudiadas, en 3 (1,4%) se detectó *T. vaginalis* (figura 5.17) con edad promedio de 27,0 años \pm 4,6 (22-31 años) y con un tiempo promedio de gestación de 28,3 semanas \pm 1,2 (27-29 semanas). El tiempo de gestación correspondió en una paciente al segundo trimestre y en 2 al tercero (tablas 5.7 y 5.8).

El 100% de las pacientes presentaron síntomas. Entre ellos, la secreción abundante se presentó en las 3 pacientes (100%), el prurito en 2 (66,6%), el ardor en 3 (100%) y la disuria en 2 (66,6%; tabla 5.7). En cuanto a las características de la secreción vaginal, 1 fue blanca, otra amarillenta y la otra verde claro. Ninguna de las pacientes era diabética pero una tenía como antecedente haber recibido tratamiento antibiótico previo. Todas presentaron inflamación en el examen directo del flujo y en ninguno de los casos se asoció con cultivo positivo para *Candida* spp.

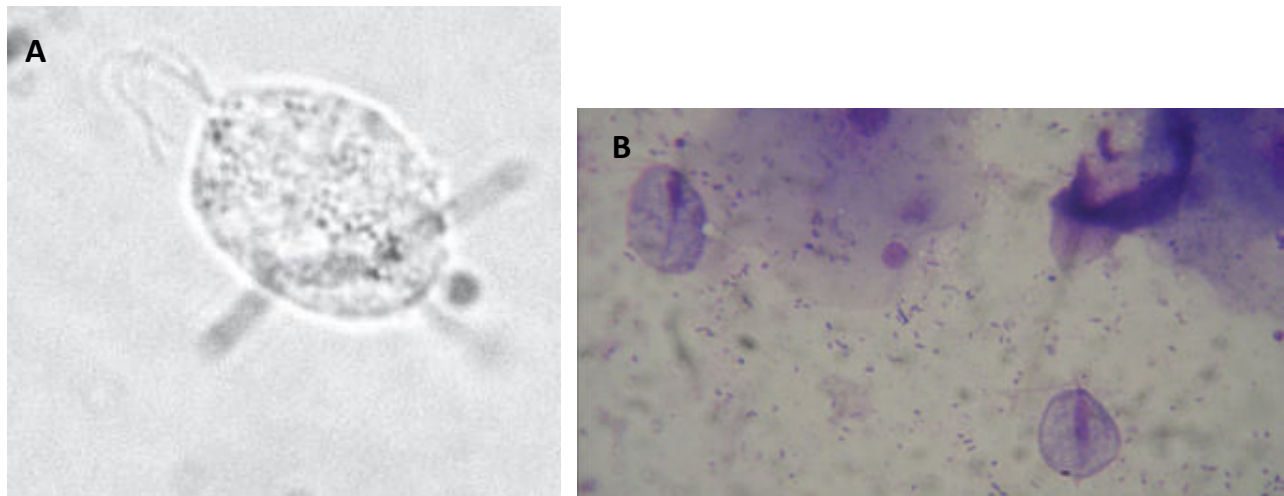


Figura 5.17: Observación de *T. vaginalis* en flujo vaginal A) fresco B) coloración de Giemsa.

Diagnósticos Microbiológicos	Sintomáticas N (%)	Asintomáticas N (%)	Total N (%)
VB	15 (18,7)	23 (17,6)	38 (18,1)
Candidiasis	52 (65,0)	18 (13,8)	70 (33,3)
Trichomoniasis	3 (3,7)	0 (0)	3 (1,4)
Gonococia	0 (0)	1 (0,8)	1 (0,5)
Patología por <i>C. trachomatis</i>	1(1,2)	2 (1,5)	3(1,4)
Patología por <i>M. hominis</i>	1 (1,2)	5 (3,8)	6 (2,8)
Patología por <i>Ureaplasma spp.</i>	15(18,7)	22 (16,9)	37 (17,6)
Negativos	13 (16,2)	70 (53,8)	83 (39,5)

Tabla 5.7: Resultados de los estudios microbiológicos en las muestras de flujo vaginal pacientes sintomáticas (N=80) y asintomáticas (N=130). (N total =210).

Patógenos observados y/o recuperados por cultivo solos o asociados	Sintomáticas		Asintomáticas		Muestras	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
<i>Candida</i>	36	45,0%	15	11,5%	51	24,3%
<i>Candida+Ureaplasma spp + Mycoplasma</i>	1	1,2%	0	0,0%	1	0,5%
<i>Candida + Ureaplasma spp.</i>	8	10%	1	0,8%	9	4,3%
<i>Candida + VB</i>	6	7,5%	2	1,5%	8	3,8%
<i>Candida + VB+ Ureaplasma spp.</i>	1	1,2%	0	0,0%	1	0,5%
VB	7	8,8%	16	12,4%	23	11,0%
VB + <i>Mycoplasma</i>	0	0,0%	2	1,5%	2	0,9%
VB + <i>Ureaplasma spp.</i>	1	1,2%	3	2,3%	4	1,9%
<i>Trichomonas vaginalis</i>	2	2,5%	0	0,0%	2	0,9%
<i>T. vaginalis + Ureaplasma spp.</i>	1	1,2%	0	0,0%	1	0,5%
<i>Ureaplasma spp.</i>	3	3,9%	16	12,4%	19	9,0%
<i>Ureaplasma spp + Mycoplasma</i>	0	0,0%	2	1,5%	2	0,9%
<i>Mycoplasma + N. gonorrhoeae</i>	0	0,0%	1	0,8%	1	0,5%
<i>Chlamydia</i>	1	1,2%	2	1,5%	3	1,5%
Negativos	13	16,3%	70	53,8%	83	39,5%
Total	80	100	130	100	210	100

Tabla 5.8.: Presencia de patógenos en las secreciones vaginales de pacientes sintomáticas (N=80) y asintomáticas (N=130).

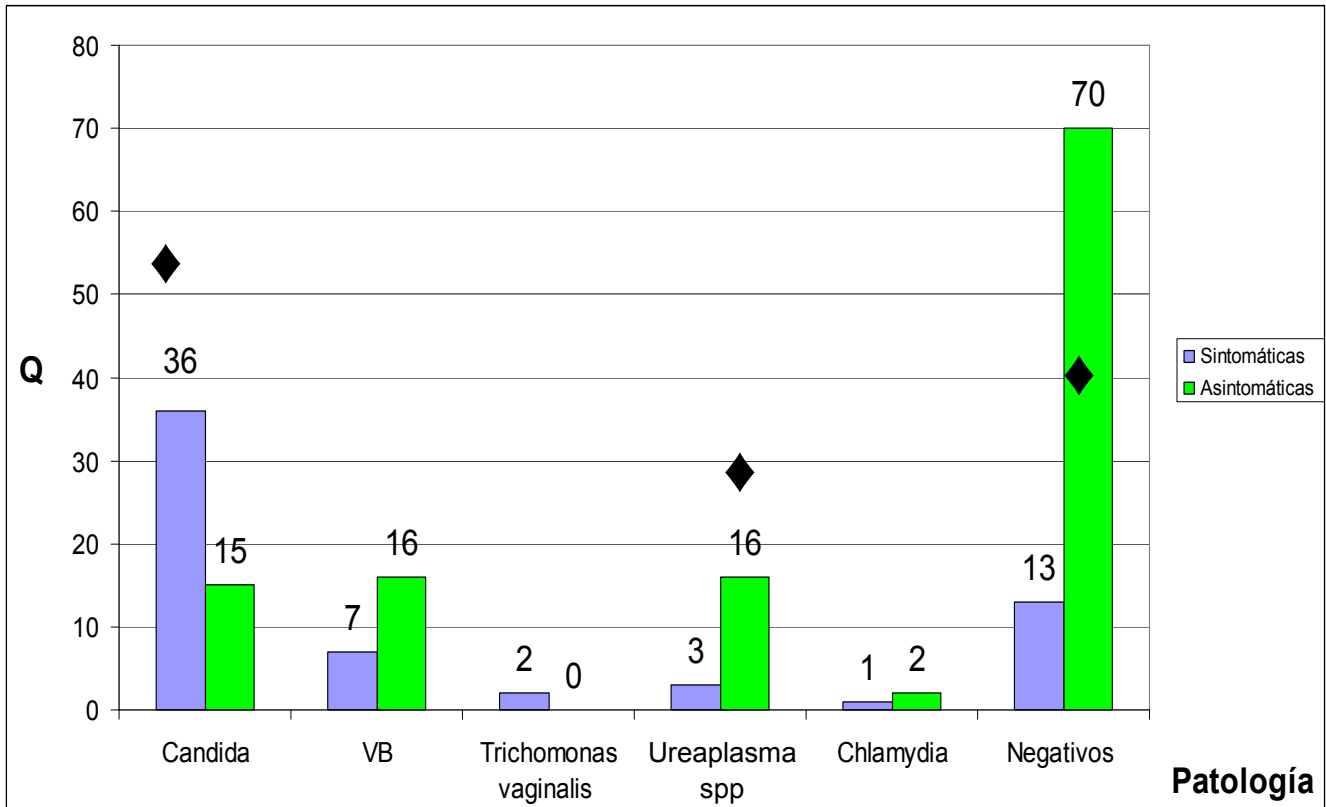


Figura 5.18: Resultados de los estudios microbiológicos teniendo en cuenta patología única en las muestras de flujo vaginal. ♦ Indica diferencias significativas entre la patología y los dos grupos estudiados con manifestaciones clínicas (sintomáticos) y sin manifestaciones clínicas (asintomáticos).

5.8. Asociación de *Candida* spp con *Streptococcus agalactiae* (EGB).

5.8.1 Características de la población de las gestantes estudiadas.

Se estudiaron 64 pacientes con edades comprendidas entre 17 y 39 años (edad promedio 28,0 años \pm 5,7). La distribución de edades se observa en la figura 5.19. El 56,2 % tenían edades comprendidas entre 21 y 30 años, el 17,2% eran menores de 20 años y el 26,6% eran mayores de 30 años.

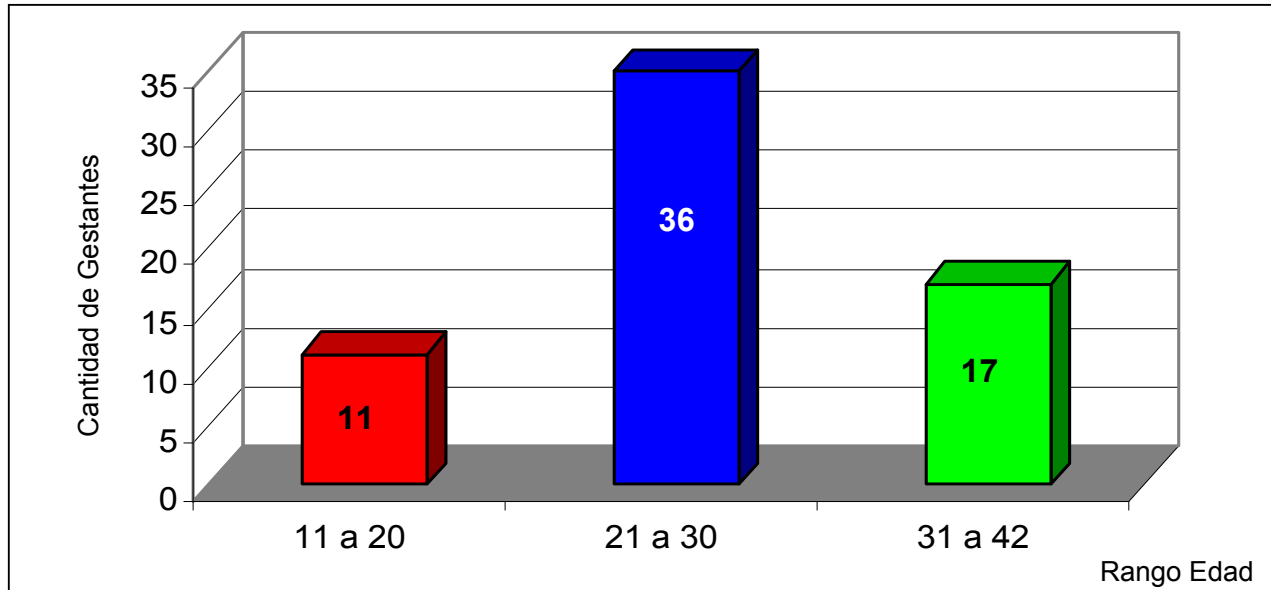


Figura 5.19: Distribución de las gestantes según edades (N=64) en la investigación de EGB.

La distribución por nacionalidad se presenta en la figura 5.20 y se observó que el 59,4 % de las gestantes eran argentinas, el 37,5% provenían de países de América del Sur y el 3,1% de Francia y EE.UU.

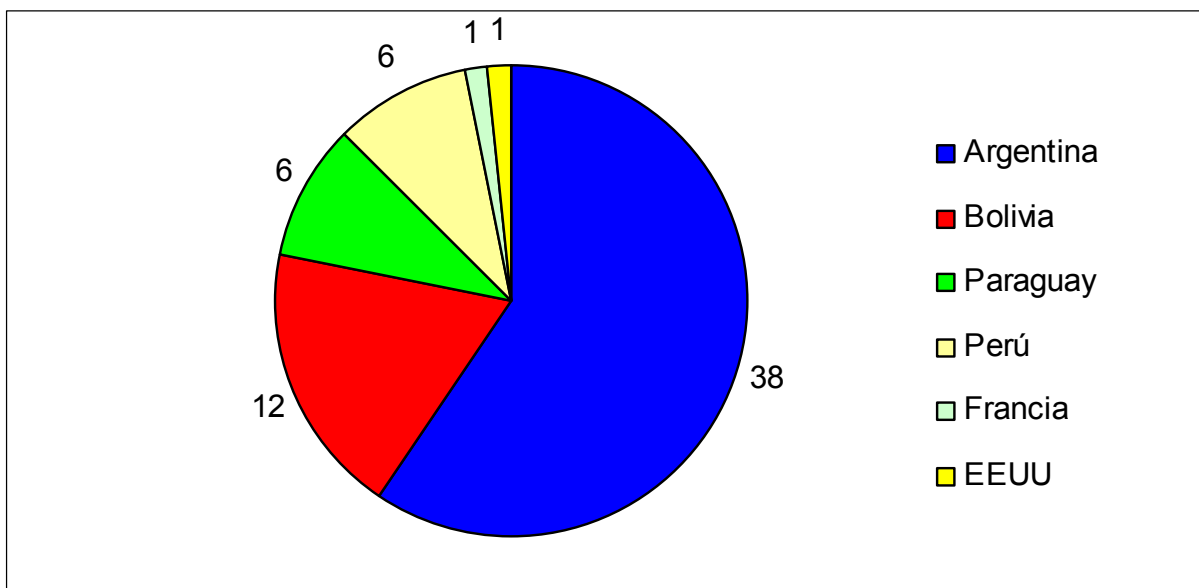


Figura 5.20: Distribución de de las gestantes según nacionalidad en la investigación de EGB.

5.8.2 Antecedentes clínicos obtenidos de las respectivas historias clínicas.

Las pacientes estudiadas para la investigación de *S. agalactiae* se encontraban cursando el tercer trimestre de embarazo, específicamente entre la semana 35 y 37 de gestación. Las enfermedades de base referidas fueron: (i) diabetes gestacional: 2 pacientes (3%), (ii) pielonefritis: 1 paciente (1,5%), (iii) enfermedad de Chagas: 1 paciente (1,5%), (iv) asma: 1 paciente (1,5%) y (v) síndrome antifosfolípídico: 1 paciente (1,5%). Del total de las pacientes estudiadas 3 (5%) recibieron tratamiento previo con antimicóticos y 3 (5%) con antibióticos en las últimas 2 semanas previas a la toma de muestras.

5.8.3 Manifestaciones clínicas de las gestantes.

Las manifestaciones clínicas (flujo, prurito, disuria y ardor) se presentaron en el 11% (N=7) de las embarazadas con estudio de EGB. La secreción vaginal abundante se halló o fue referida en el 100% (N=7), prurito en el 3% (N=2) y ardor en el 1,5% (N=1) de las pacientes estudiadas.

5.8. 4. Estudios Microbiológicos. Investigación de las diferentes especies de *Candida*.

5.8.4.1 Examen microscópico directo. Observación de levaduras y pseudomicelios.

El examen directo en fresco o con azul de lactofenol fue positivo en 30 muestras de las 64 (46,8%), y el cultivo fue positivo en 27 muestras (42,1%). Las muestras con directo positivo tuvieron cultivo negativo en 3 casos (4,6%). El examen directo en fresco, se consideró positivo al observar la presencia de levaduras o de levaduras con pseudomicelio.

5.8.4.1.3 Cultivo en medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*).

De las 64 gestantes estudiadas se aislaron levaduras en 27 pacientes (42%). En 26 de las mismas (96%) se aisló una única especie y en 1 paciente (4%) se aislaron dos especies de levaduras en la misma muestra. Se observó la siguiente asociación: *C. albicans* y *C. tropicalis*. La distribución de las especies aisladas fue: *C. albicans* en 20 pacientes (74%), *C. parapsilosis*

en 2 (7,4%), *Rhodotorula* spp. en 3 (11%) *C. glabrata* en 1 (3,7%) y *C. albicans* asociada a *C. tropicalis* en 1 muestra (3,7%).

5.8.5 Estudios Microbiológicos. Investigación de *Streptococcus agalactiae* (EGB).

Las muestras tomadas del introito vaginal y de la zona perianal, se sembraron en medio Todd-Hewitt y luego de incubarlas 18-24 h a 37 °C se realizó un subcultivo en agar sangre o medio cromogénico (*StrepB BioMérieux*) y a las colonias sospechosas se les realizó una confirmación serológica (figura 5.21).

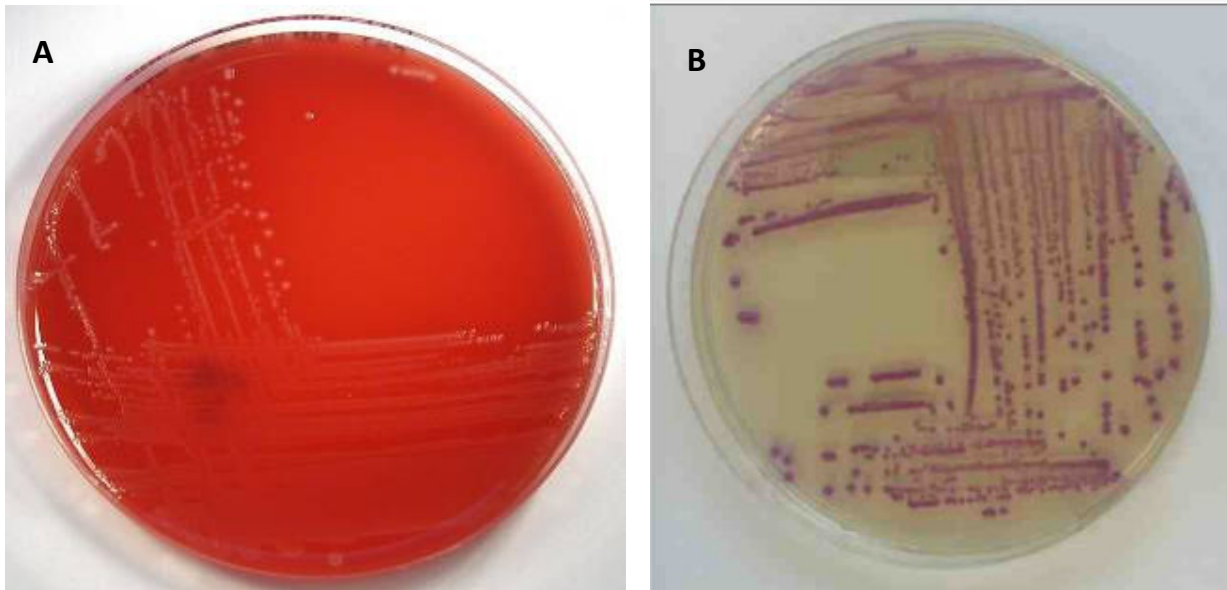


Fig 5.21: Aislamiento en agar cromogénico de *Streptococcus* grupo B a partir de muestras de introito vaginal y zona perianal A) agar sangre B) medio cromogénico (*Strep B BioMérieux*).

Se detectó EGB en 8 pacientes (12.5%) de las cuales en 3 (4,7%) se encontró asociación de EGB con *Candida*. La asociación encontrada en todos los casos fue de EGB con *C. albicans* y todas las gestantes fueron asintomáticas.

5.2. B. Estudios moleculares para la identificación de especies de *Candida*.

5.2. B.1 Identificación molecular de las colonias verdes recuperadas del medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*).

5.2. B.1.1 Identificación molecular de *C. dubliniensis*.

Un total de 79 aislamientos de *Candida* que presentaron color verde en el medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*) se amplificaron por PCR para el intrón del gen de *actina*. Esto permitió identificar molecularmente a tres aislamientos como *C. dubliniensis* por la presencia de una banda de aproximadamente 290 pb (figura 5.22). Esto coincidió con la identificación realizada según los criterios microbiológicos convencionales.

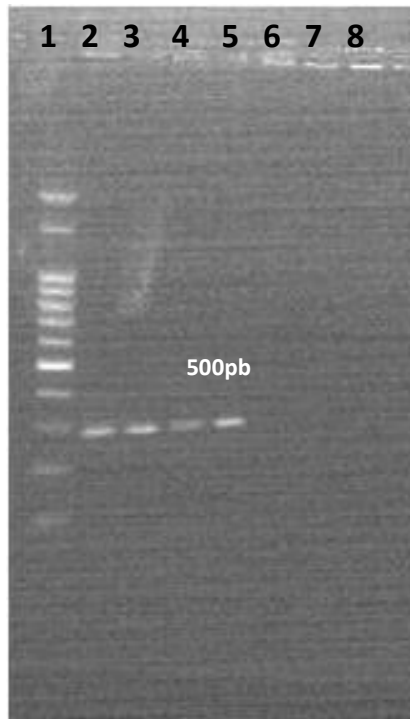


Figura 5.22: Observación de los productos de amplificación del intrón del gen de *actina* de colonias verdes en CHROMAgar *Candida*. Calle 1: marcador de PM de 100 pb (la banda intensa corresponde a 500 pb). Calles 2, 3, 4: colonias de *C. dubliniensis* y calle 5: corresponde a la cepa control de *C. dubliniensis* del Centro de Micología de la Facultad de Medicina, UBA inscripta en el GenBank como FJ8116791.1 (la banda corresponde a 290 pb). Calles 6 y 7: colonias de *C. albicans*. Calle 8: control negativo.

5.2. B.1.2 Identificación molecular de *C. albicans* y *C. africana*.

De los 79 aislamientos de *Candida* spp. que presentaron un color verde en el medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*) se identificaron molecularmente a 76 como *C. albicans* por la presencia de la banda de alrededor de 1.000 pb por la amplificación del gen *hwp1*. Cabe destacar que algunos aislamientos presentaron una banda para este gen (46/76) y el resto dos bandas (figura 5.23). Se destaca además la ausencia en los aislamientos verdes estudiados molecularmente la banda de 700 pb que corresponde a *C. africana*.

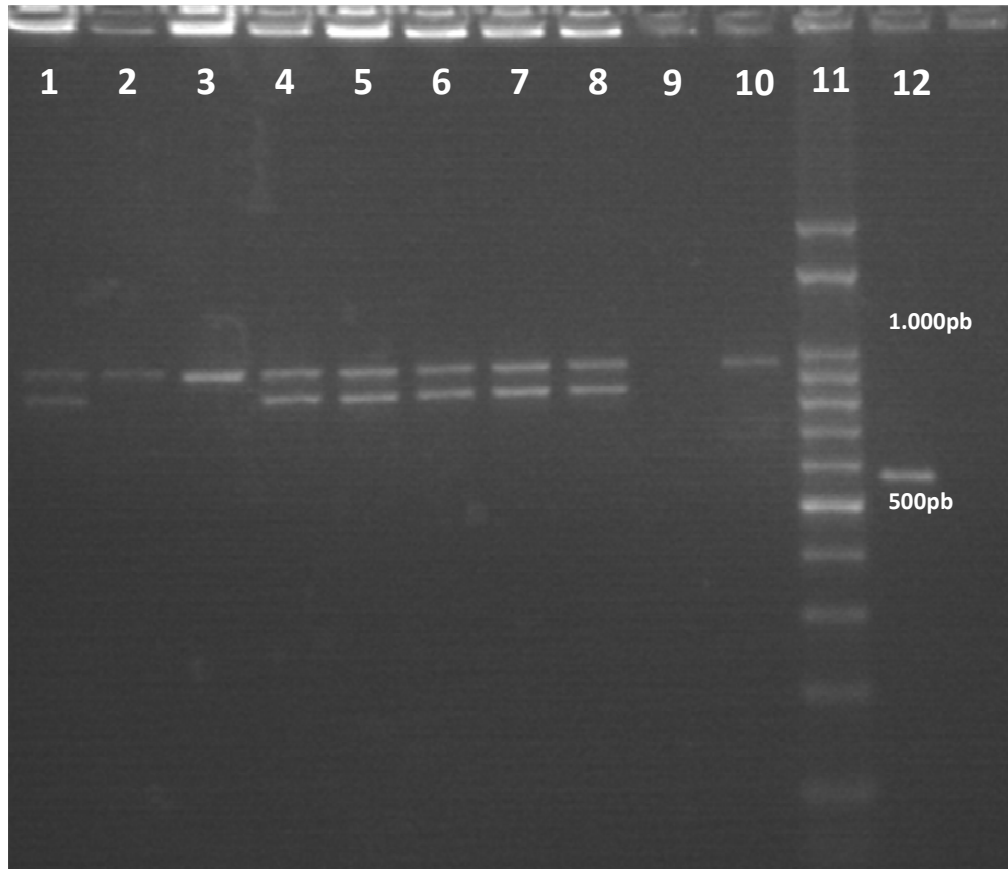


Figura 5.23: Observación de los productos de amplificación del gen *hwp1* de colonias verdes en CHROMAgar *Candida*. Calle 1: colonias de *C. albicans* con doble banda para el gen *hwp1*. Calles 2, 3: colonias de *C. albicans* con una banda para el gen *hwp1*. Calles 5, 6, 7, 8: colonias *C. albicans* con doble banda para el gen *hwp1*. Calle 9: Control negativo. Calle 10: Control *C. albicans* ATCC 90028. Calle 11: marcador de PM 100 pb. Calle 12: Control *C. dubliniensis* Centro de Micología, Facultad de Medicina, UBA inscripta en el GenBank como FJ8116791.1.

Del total de *C. albicans* estudiadas en las dos etapas del trabajo la distribución entre doble (heterocigota) y simple banda (homocigota) para el gen *hwp1* es similar en pacientes sintomáticas y asintomáticas, tal como se observa en la tabla 5.9.

Observación de <i>C. albicans</i> en el gel de agarosa	Sintomáticas N (%)	Asintomáticas N (%)	p
una banda	29 (59)	17 (63)	0,897
doble banda	20 (41)	10 (37)	0,897

Tabla 5.9: Bandas obtenidas en el gel de agarosa como producto de amplificación del gen *hwp1* de *C. albicans* en pacientes sintomáticas y asintomáticas.

5.2. B.1.3 Identificación molecular del complejo *C. parapsilosis*.

Se identificaron molecularmente 3 aislamientos de *Candida* spp. que presentaron un color rosado en el medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*) y las 3 se identificaron como *C. parapsilosis sensu stricto* por la presencia de la banda de alrededor de 380 pb producto de la amplificación con los pares de cebadores específicos para *C. parapsilosis* CPAF-CPAR (figura 5.24). No se encontraron aislamientos correspondientes a *C. orthosilopsis* ni *C. metapsilosis*, las restantes especies del complejo *C. parapsilosis*. Cabe destacar, que los métodos microbiológicos convencionales no permiten discriminar a las diferentes especies de *C. parapsilosis sensu stricto*.

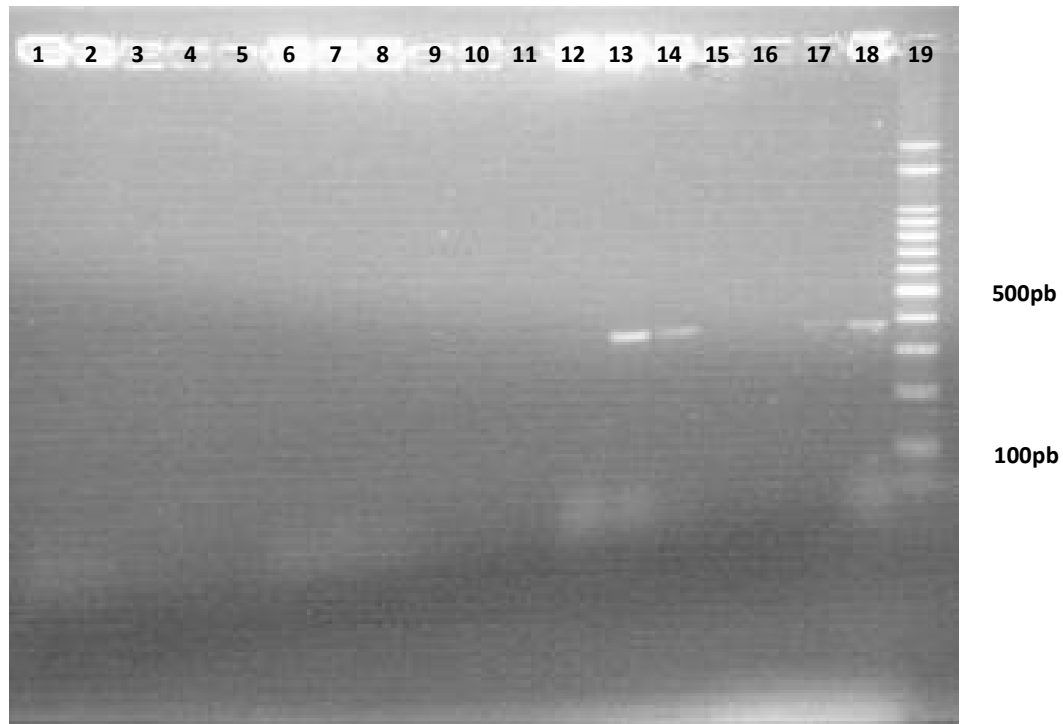


Figura 5.24: Observación de los productos obtenidos luego de la amplificación individual con los cebadores CORF-CORR (Calles 1,2,3,4,5,6), CMEF-CMER (calles 7,8,9,10,11,12), CPAF-CPAR (calles 13,14,15,16,17,18) y calle 19: marcador de PM de 100 pb. Como puede observarse se obtiene amplificación únicamente en las calles 13,14 y 17 con los cebadores CPAF-CPAR correspondiente a muestras clínicas identificadas molecularmente como *C. parapsilosis*. Calles 6,12 y 18 corresponden a *C. parapsilosis* (ATCC 22019).

5.2. B.1.4 Identificación molecular del complejo *C. glabrata*.

Se identificaron molecularmente 7 aislamientos de *Candida* spp. que presentaron color púrpuras-blancos en el medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*) y 6 resultaron ser *C. glabrata* debido a la presencia de la banda de alrededor de 1.000 pb con la amplificación con los pares de cebadores RPL31cgF-RPL31cgR. El aislamiento restante resultó ser *S. cerevisiae* por la presencia de una banda de aproximadamente 690 pb utilizando los mismos pares de cebadores (figura 5.25), con la temperatura de *annealing* de 62 °C. Sin embargo, cuando la temperatura de *annealing* disminuyó a 55 °C (figura 5.26) y a 58 °C aparecieron en el gel de agarosa una doble banda tanto en *S. cerevisiae* usado como control perteneciente al cepario del

Centro de Micología como a la cepa aislada de las gestantes (genoma diploide). Los aislamientos de *C. glabrata* provenientes de las secreciones vaginales y el control de *C. nivariensis* DMIC 134286 presentaron solamente una banda (haploides en el genoma). No se encontraron aislamientos correspondientes a *C. bracarensis* ni *C. nivariensis* en las secreciones vaginales de las gestantes estudiadas.



Figura 5.25: Observación de los productos de amplificación del complejo *C. glabrata* y *S. cerevisiae* con temperatura de *annealing* de 62 °C. Calle 1: Marcador de PM 1.000 pb. Calle 2 - 7: aislamientos vaginales de *C. glabrata*. Calle 8: aislamiento de *S. cerevisiae*. Calle 9: *C. albicans* ATCC 90028. Calle 10: *C. dubliniensis* (Centro de Micología, Facultad de Medicina, UBA inscrita en el GenBank como FJ8116791.1). Calle 11: *C. metapsilosis* (NRRL Y-48469). Calle 12: *C. nivariensis* (DMIC 134286 Instituto Malbrán). Calle 13: *S. cerevisiae* (Centro de Micología, Facultad de Medicina, UBA). Calle 14: *C. parapsilosis* (ATCC 22019). Calle 15: *C. orthosilopsis* (NRRL Y-48468). Calle 16: *C. tropicalis* (Centro de Micología, Facultad de Medicina, UBA). Calle 17: *C. haemulonii* (Centro de Micología, Facultad de Medicina, UBA); calle 18: Control negativo; calle 19: marcador de PM 100 pb.

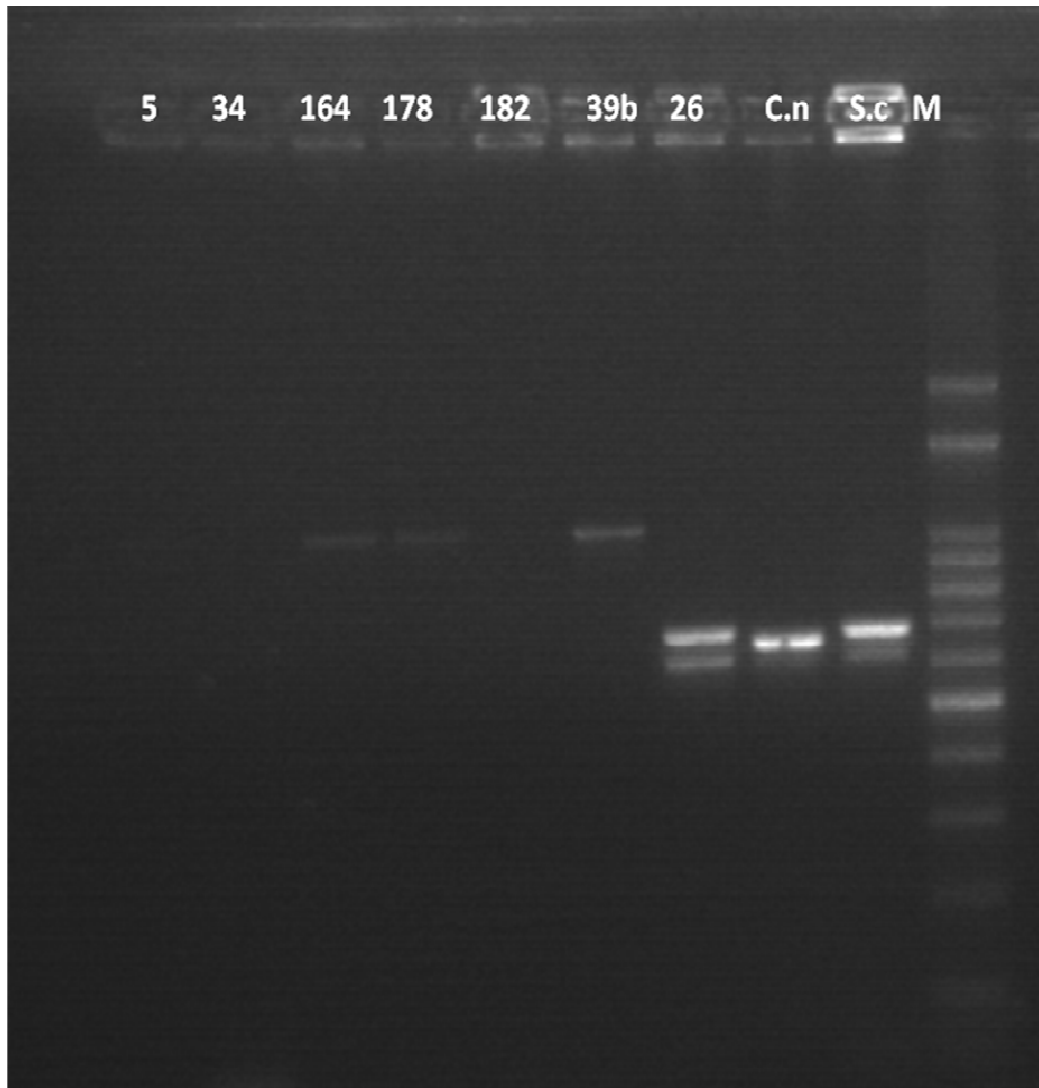


Figura 5.26: Observación de los productos de amplificación del complejo *C. glabrata* y *S. cerevisiae* con temperatura de *annealing* de 55°C. Los números 5, 34, 164, 178, 182, 39b corresponden a los aislamientos vaginales de *C. glabrata*. *C. nivariensis* (Cn; DMIC 134286 Instituto Malbrán), 26: *S. cerevisiae* aislado de las gestantes. Sc: *S. cerevisiae* (Centro de Micología, Facultad de Medicina, UBA). M: marcador de PM 100 pb.

Es importante destacar que los métodos microbiológicos convencionales no permiten la diferenciación de las especies del complejo de *C. glabrata* y molecularmente se identificó a *C. glabrata* en 6 aislamientos y a *S. cerevisiae* en 1.

6. DISCUSION.

La biota normal vaginal fue una de las primeras en ser reconocidas en 1892 por Döderlein quien describió el patrón que se observa en la mujer en edad sexual activa. La microbiota incluye a *Lactobacillus* spp., especies de *Staphylococcus*, *Ureaplasma*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Gardnerella*, *Mycoplasma*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Veillonella*, *Bifidobacterium* y *Candida* (1).

Las alteraciones en la biota pueden llevar al desarrollo de la enfermedad. La VVC resulta de la interrelación entre la virulencia del microorganismo, su mayor número en el ecosistema y de la respuesta inmune innata y adaptativa del huésped (4,74).

En el presente estudio se encontró una alta prevalencia de VVC y VB en mujeres embarazadas. Es conocido que una mayor prevalencia de la VVC se observa durante el embarazo (7,13) y en esta investigación esta patología se presentó en el 25% (52/210 pacientes) de las gestantes estudiadas. En dichas pacientes se observaron en los exámenes directos levaduras con o sin pseudomicelio, se aislaron las levaduras por cultivo y las gestantes presentaban además sintomatología. Así, Garcia-Heredia *et al.* en un estudio realizado en nuestro país señalaron una prevalencia de VVC del 28% en gestantes (75); porcentajes superiores hallaron Okonkwo *et al.* (30%) y Guzel *et al.* (37,4%) (76,77).

La portación asintomática de *Candida* spp. fue del 13,8%. Al considerar las especies de *Candida* que puede formar parte de la biota, en las pacientes asintomáticas se observó una portación que en un 50 % de los casos se debe a especies de *Candida* no-*albicans* u otras levaduras, mientras que en las sintomáticas los porcentajes fueron inferiores al 20%. Estos hallazgos son coincidentes con los descritos por Lopes Consolaro *et al.*, quienes sugieren que la colonización de levaduras en la vagina se asocia con levaduras o *Candida* no-*albicans* y

que el desarrollo de la VVC depende entre otros factores del reemplazo de estas especies por *C. albicans* (79).

La candidiasis es especialmente común en las gestantes con el riesgo que conlleva albergar *Candida* spp. en la vagina e infectar al recién nacido durante el periodo perinatal (28,80). En el embarazo, el alto nivel de estrógenos y de glucógeno en las secreciones vaginales constituye una excelente fuente de carbono para el crecimiento fúngico, incrementando así, el riesgo de la VVC (19,20). Los estrógenos además aumentan la adherencia de *Candida* spp. al epitelio vaginal (14). Las manifestaciones clínicas de la VVC son: prurito, hiperemia, *discomfort* y leucorrea (81). En el 100 % de las pacientes sintomáticas se observó una secreción vaginal abundante. Al relacionar el aumento de las secreciones vaginales con el tiempo de gestación, se observó, que existe mayor sintomatología a medida que aumentan las semanas de gestación, siendo mayor en el segundo y tercer trimestre del embarazo como consecuencia probablemente del incremento de la colonización por *Candida* spp (16, 77).

En este estudio, *C. albicans* fue la especie más frecuentemente identificada en las VVC representando el 80,7% de los aislamientos, en tanto que las *Candida* no-*albicans* y las levaduras como *S. cerevisiae* y *Rhodothorula* spp. representaron el 19,3%. Es conocido que *C. albicans* constituye la especie más frecuente en las secreciones vaginales (14,75,78). Las VVC resultan clínicamente indistinguibles si son causadas por las especies de *Candida* no-*albicans* o por *C. albicans*, pero debemos considerar que las VVC debidas a *Candida* no-*albicans* se encuentran en paulatino ascenso (17) y ofrecen una mayor resistencia a los antifúngicos (14). Estudios recientes sobre la prevalencia de *C. albicans* en las secreciones vaginales de pacientes con VVC indican un porcentaje entre el 46,9 % y 90% (14,78, 82, 83, 84). Estas diferencias porcentuales probablemente reflejan variaciones en el riesgo individual para el desarrollo de esta patología. Además, podemos remarcar que *C. albicans* se encontró con

mayor prevalencia en las pacientes sintomáticas y es conocido que esta especie constituye la mayoría de los episodios de las candidiasis sintomáticas. En tanto que *Rhodotorula* spp. se observó en forma significativa en las pacientes asintomáticas. Esta levadura es un microorganismo del ambiente (aire, suelos, lagos agua de mar, leche y jugos de frutas), que raramente causa enfermedad en humanos (85). Aunque en bajo porcentaje, *S. cerevisiae* es hallada en las secreciones vaginales y causa VVC (78).

Es señalado que en la VVC en el 10-20% restante se aíslan otras levaduras no-*Candida albicans* como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *S. cerevisiae* (14) y las especies dominantes en el presente trabajo fueron *C. glabrata* y *C. dubliniensis*.

C. dubliniensis es una levadura que fue originalmente descrita en 1995 (86) y que posee características fenotípicas similares a *C. albicans*. Debido a ello es que puede conducir a una incorrecta identificación de la misma y a sobreestimar los casos reales de *C. albicans* en las candidiasis vaginales; situación que presumiblemente sucedió en el pasado (87) dado que requiere de una metodología apropiada para su investigación (51,52, 54). La reacción de PCR utilizada en este estudio, pudo diferenciar exitosamente los aislamientos clínicos de *C. albicans* de los de *C. dubliniensis* (56). Además, en nuestro caso corroboró los estudios microbiológicos convencionales realizados (51, 52,54).

Diferentes trabajos documentan que la incidencia de *C. dubliniensis* en las secreciones vaginales es baja, entre el 0-3% (78, 88,89, 90).

La especie *C. albicans* es la más comúnmente recuperada de las infecciones humanas y está relacionada fenotípicamente no solo a *C. dubliniensis* sino a otra levadura recientemente descrita como *C. africana* y aislada especialmente en secreciones vaginales (45, 46, 47,48). La amplificación por PCR del gen que codifica para *hwp1* permitió identificar molecularmente a *C. albicans* (49). Esta levadura presenta un genoma diploide y puede resultar homocigoto o heterocigoto para el gen *hwp1* (89). Es conocido que los genes de adherencia participan en el

establecimiento de un microorganismo. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre la presencia de un gen homocigoto o heterocigoto para *hwp1* en los aislamientos de *C. albicans* y la presencia o no de síntomas. Posteriores estudios de adherencia serán necesarios para observar diferencias en esta etapa tan importante de la patogénesis y relacionarlas con las características de este microorganismo.

En este estudio, se destaca la ausencia de *C. africana* en las secreciones vaginales de las gestantes en Argentina. Los aislamientos clínicos de *C. africana* representan en general un muy pequeño porcentaje de *C. albicans* y actualmente muy pocos estudios registran su prevalencia (89,91).

Es conocido que *C. africana* se halla en secreciones vaginales de pacientes provenientes de África y Europa (45,92), pero se recuperó de una muestra de hemocultivo en un paciente chileno ampliando la distribución geográfica y anatómica del aislamiento en esta especie (53). Recientemente, se informó el aislamiento de esta especie en nuestro país (90).

La especie *C. glabrata* es reconocida como la segunda especie hallada en orden de frecuencia en la VVC. En este estudio se registraron valores inferiores a otros autores (14, 58, 75,78) que destacan valores entre el 6% y 16,5%. Sin embargo, si consideramos las asociaciones encontradas de esta especie con *C. albicans*, se observa que *C. glabrata* resulta la segunda especie en orden de prevalencia. *C. glabrata* fue encontrada en pacientes sintomáticas con VVC en un porcentaje mayor que las asintomáticas (biota colonizante) pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Las especies muy relacionadas como *C. glabrata*, *C. bracarensis* y *C. nivariensis* no pueden diferenciarse por los métodos microbiológicos convencionales (62,63) y requieren de una identificación molecular. Esta se realiza con una PCR para el gen *rIp31* que codifica para una proteína ribosomal de 60S (64). Esta técnica nos permitió identificar a todos los aislamientos pertenecientes a este complejo, como *C. glabrata*. No detectamos en este estudio

la presencia de *C. bracarensis* ni *C. nivariensis*. Se describe en diferentes estudios que ciertos aislamientos clínicos provenientes de colecciones de cultivo identificados fenotípicamente como *C. glabrata* cuando fueron analizados molecularmente representaron a las especies de *C. bracarensis* y *C. nivariensis* en menos del 2,2 % y del 0,1 % respectivamente (63,93). En otro estudio realizado sobre las regiones 5.8 S e ITS1 del *rDNA* se identificó a las VVC causadas por *C. bracarensis* y *C. nivariensis*. Así, de un total de 301 aislamientos identificados fenotípicamente como *C. glabrata*, coincidieron molecularmente con esta especie el 97,34% de los mismos mientras que 2,33 % se identificaron como *C. nivariensis* y el 0,33% como *C. bracarensis* (94). *C. glabrata* es un comensal del intestino humano y el nicho ecológico de las otras especies del complejo es aún desconocido.

El gen *rlp31* amplificó además en el aislamiento de *S. cerevisiae* con el tamaño del producto de PCR esperado que -a su vez- es inferior al observado en las especies de *C. glabrata* (64) concordando con su identificación microbiológica. La amplificación por PCR de este gen a distintas temperaturas de *annealing* permitió evidenciar la característica heterocigota del mismo. La levadura *S. cerevisiae* presenta un genoma diploide, a diferencia de *C. glabrata* y las otras especies del complejo que presentan un genoma haploide.

Las especies del complejo de *C. parapsilosis* (61) no pueden diferenciarse por los métodos microbiológicos convencionales. La amplificación por PCR con cebadores específicos para cada una de las especies del complejo permitió la identificación de *C. parapsilosis sensu stricto* (14).

En concordancia con lo señalado por otros autores se detectó un bajo número de aislamientos de *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* en las VVC (75,78). Es conocido que la mayoría de las especies de *Candida* pueden causar VVC, estas son infrecuentemente originadas por *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*.

Las asociaciones de especies de *Candida* fue posible por el empleo de un medio cromogénico, útil para la detección de infecciones mixtas. Estas se observaron en un 4,22% y fueron de *C. albicans* con *C. glabrata* o con *C. tropicalis* (78). Cabe destacar que las asociaciones se presentaron en las pacientes sintomáticas con VVC y el real significado en la patogénesis de ambas especies en la VVC necesita ser elucidado.

Coincidente con lo descrito por otros autores, se encontró asociación de especies de *Candida* spp. con VB, *S. agalactiae*, *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* (75,78).

La tricomoniasis es una enfermedad de transmisión sexual que se observa en general con una disminución en su incidencia (78) y puede presentarse en forma asintomática entre el 10 al 50% (6) de los casos. En este estudio la tricomoniasis tuvo una baja prevalencia (1,4%) como consecuencia probablemente de la introducción del tratamiento con metronidazol y de las mejoras en la higiene personal. Destacamos que la totalidad de las pacientes, aunque en bajo número, presentaron manifestaciones clínicas como secreción vaginal abundante, prurito, ardor y disuria. Como complicaciones obstétricas de la tricomoniasis se señalan la ruptura prematura de membrana, partos de prematuros y neonatos de bajo peso.

En el presente estudio, la VB afectó al 18,09 % de las gestantes analizadas, de las cuales eran sintomáticas el 39,5%. Las manifestaciones clínicas se observaron fundamentalmente durante el segundo y tercer trimestre del embarazo. Se trata de una patología que afecta a las mujeres en edad reproductiva y con una recurrencia relativamente común. La prevalencia informada en embarazadas oscila entre el 6,4 % y el 38 % y se observa habitualmente en las pacientes asintomáticas (7, 95, 96,97). Como complicaciones obstétricas se señalan los nacimientos a pre-término, endometritis puerperal y un incremento en el riesgo de la adquisición de otras enfermedades transmitidas sexualmente, incluyendo la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (*Human immunodeficiency virus*, HIV).

La incidencia de infecciones de transmisión sexual causadas por *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* fue baja en la población estudiada. La prevalencia de *C. trachomatis* fue 1,4%,

valores similares a los encontrados en otros estudios realizados en gestantes (98,99). Consistentemente con la bibliografía (5,6) observamos que en la mayoría de los casos la infección no estuvo asociada a la presencia de manifestaciones clínicas y por otra parte no encontramos asociación en ningún caso de *C. trachomatis* con *Candida* spp. lo cual es coincidente con lo observado por otros autores (98).

La prevalencia de *N. gonorrhoeae* fue del 0,48% en el presente estudio y es similar a los valores hallados en nuestro medio (98). Dentro de las complicaciones causadas por *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* en la mujer embarazada se encuentran el parto prematuro y la infección puerperal. Los recién nacidos de madres portadoras de *C. trachomatis* post-parto vaginal tienen un riesgo estimado de conjuntivitis del 18-50% y de neumonía del 11- 18%. La conjuntivitis se manifiesta entre la segunda y cuarta semana de vida en tanto que *N. gonorrhoeae* causa conjuntivitis neonatal que se caracteriza por manifestarse en la primera semana de vida.

Por otro lado, *Ureaplasma* spp. y *M. hominis* presentaron una prevalencia de 17,6% y 2,8% respectivamente, en la población estudiada. Si bien estos valores resultaron más bajos a los descritos en otros estudios (98,100), es coincidente el hallazgo de estos patógenos como colonizantes del microambiente vaginal de las mujeres embarazadas. *M. hominis* y *Ureaplasma* spp. forman parte de la biota habitual del tracto genital y un aumento de la densidad de estos microorganismos durante el embarazo se ha asociado a complicaciones gineco-obstétricas y perinatales como parto prematuro y bajo peso al nacer. Encontramos asociación entre *Candida* spp. y *Ureaplasma* spp. en 11 casos, en uno de ellos también se detectó *M. hominis*.

En el estudio de asociación de *Candida* spp. con *S. agalactiae* realizado en 64 pacientes entre la semana 35 y 37 de embarazo se detectó *S. agalactiae* en 12,5 % de las pacientes, y en un 4,7% se asoció *S. agalactiae* con *Candida* spp. Todas las pacientes fueron asintomáticas y la única asociación que se observó fue con *C. albicans*. En los últimos años *S. agalactiae* ha sido muy estudiado en la mujer embarazada. La prevalencia según la literatura internacional se

encuentra entre 10-40% y puede dar origen a infecciones urinarias, corioamnionitis, endocarditis y es la causa más frecuente de sepsis bacteriana y meningitis neonatal (31, 32, 33, 34).

Más estudios deberían ser realizados en estos casos de asociación entre ambos gérmenes para establecer el riesgo de transferencia e inducción de patología en la relación madre-feto/neonato.

La epidemiología molecular de las VVC en las gestantes enfatiza la necesidad de los controles periódicos y el seguimiento de la embarazada por los riesgos obstétricos en la transmisión de patógenos. Además, aporta un conocimiento de las especies de los complejos *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* en las secreciones vaginales, para conocer la real importancia de los respectivos complejos en la VVC y en la portación asintomática de estos patógenos. Por otra parte, el estudio de los procesos de adherencia con cepas de *C. albicans* homocigotas o heterocigotas para el gen *hwp1* podrá contribuir a elucidar problemas de patogenia en la VVC.

7-CONCLUSIONES.

Las alteraciones en la biota en el ecosistema vaginal pueden llevar al desarrollo de la enfermedad. La VVC resulta de la interrelación entre la virulencia del microorganismo, su mayor número en el ecosistema y de la respuesta inmune del huésped. En las distintas etapas de la vida una mujer está sometida a diferentes niveles hormonales, a la actividad sexual, a las prácticas de higiene entre otros factores que influenciarán a la comunidad de microorganismos presentes en la vagina. En el embarazo el alto nivel de estrógenos y de glucógeno en las secreciones vaginales provee de una excelente fuente de carbono e incrementan el riesgo de la VVC. Así:

- La VVC resulta una patología presente en la mujer embarazada y en nuestro medio alcanzó el 25%.
- La portación asintomática de *Candida* spp. en gestantes fue del 13,8%.
- *C. albicans* fue la especie más prevalente en las secreciones de las VVC vaginales (81,7 %) y las *Candida* no-*albicans*; y las levaduras como *S. cerevisiae* y *Rhodotorula* spp. se hallaron en el 19,3%.
- Las especies de *Candida* no-*albicans* y las levaduras *S. cerevisiae* y *Rhodotorula* spp. se recuperaron en mayor porcentaje en pacientes portadoras de levaduras, lo que sugiere que la colonización de levaduras en la vagina se asocia con levaduras o *Candida* no-*albicans*, y que el desarrollo de la VVC dependería entre otros factores del reemplazo de estas especies por *C. albicans*.
- Se observó una mayor sintomatología (secreción abundante, picazón, ardor) a medida que aumentaron las semanas de gestación siendo mayor en nuestro caso en el segundo y tercer trimestre del embarazo como consecuencia probablemente del incremento de *Candida* spp.

- En el presente trabajo, se incorporó la identificación molecular de las especies de *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana*, resultando satisfactoria en un número importante de aislamientos en menor tiempo que los métodos convencionales. Es importante destacar que la amplificación por PCR se realizó directamente de una suspensión de colonias y no requirió de procedimientos de extracción del ADN lo que acorta los tiempos de identificación y disminuye los costos.
- *C. dubliniensis* se aisló en las gestantes en un 4,2%, y puede ser biota comensal y además causa en el 3,8% VVC. Esta levadura tiene similitud fenotípica con *C. albicans*, por lo que probablemente en el pasado se haya subestimado su prevalencia en este nicho ecológico.
- La reacción de PCR para el intrón del gen de *actina* diferenció exitosamente los aislamientos clínicos de *C. albicans* de los de *C. dubliniensis* y en nuestro caso concordó con los estudios microbiológicos convencionales realizados en la identificación de *C. dubliniensis* (colonias de levaduras de color verde oscuro en el CHROMAgar *Candida*® y que produjeron clamidoconidios en agar leche-Tween 80 y en el medio de Staib).
- La amplificación por PCR del gen *hwp1* para las especies de *C. albicans* y *C. africana* confirmó a los aislamientos como *C. albicans*. No se registró la presencia de *C. africana* en las gestantes, lo cual concuerda con la identificación microbiológica de las colonias que presentaron color verde en el CHROMAgar *Candida*®, produjeron clamidoconidios en agar leche-Tween 80 y no formaron clamidoconidios en medio de Staib.
- Los aislamientos de *C. albicans* homocigotos o heterocigotos para el gen *hwp1* no mostraron diferencias significativas entre las gestantes como biota colonizante y en la VVC. Estudios de adherencia con aislamientos de *C. albicans* homocigotos y heterocigotos para el gen *hwp1* podrían contribuir a elucidar un papel importante de la patogenia.

- *C. glabrata* se halló en las gestantes como biota colonizante y en las VVC y fue la segunda especie hallada en orden de frecuencia en la VVC, al considerarla como agente de VVC como única especie y asociada con *C. albicans*.
- La identificación molecular de las especies del complejo de *C. glabrata* a través de la reacción de PCR para el gen *rlp31* que codifica para una proteína ribosomal de 60S determinó la ausencia de *C. bracarensis* y *C. nivariensis*, especies del complejo de *C. glabrata*. Además corroboró la identificación microbiológica convencional de *S. cerevisiae*.
- Otras especies como *C. parapsilosis*, *C. inconspicua* y *C. tropicalis* se detectaron en las secreciones vaginales.
- La identificación molecular de las especies del complejo de *C. parapsilosis* con cebadores específicos para cada una de las especies de este complejo derivados de secuencias dentro de la región de ITS1 y ITS2 del rDNA permitió la identificación *C. parapsilosis sensu stricto*, en las secreciones de las gestantes. No se detectó la presencia de *C. orthosilopsis* y *C. metapsilosis*.
- Algunas especies de *Candida* se asociaron con VB, *S. agalactiae*, *Ureaplasma* spp. y *M. hominis*.
- La epidemiología molecular de las VVC en las gestantes enfatiza la necesidad de los controles periódicos y el seguimiento de la embarazada por los riesgos obstétricos en la transmisión de patógenos. Aporta un conocimiento de las especies de los complejos *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* en las secreciones vaginales, para conocer la real importancia de estos patógenos en la VVC y en la portación asintomática. No obstante, una limitación de la implementación de métodos moleculares en los laboratorios clínicos es la necesidad de personal entrenado e infraestructura adecuada.

Bibliografía

- 1- Farage MA, Miller KW, Sobel JD, *Dynamics of the Vaginal Ecosystem Hormonal Influences*. Infectious Diseases: Research and Treatment 2010. **3**: p. 1-15.
- 2- Farage MA, Maibach H. Lifetime changes in the vulva and vagina. Arch Gynecol Obstet. 2006. **273**: p.195-202.
- 3- Garcia JF, Schneider J , Pantón. *Vulvovaginitis candidiasica*. Med Clin (barc), 1994. **103**: p. 505-508.
- 4- Sobel J, Sebastian F., Reed B. *Vulvovaginal Candidiasis Epidemiology*. Clin Med Norteam, 2001. **82**: p. 135-139.
- 5- Perea EJ, P. *Infecciones del Aparato genital femenino: vaginitis, vaginosis y cervicitis*. Medicine 2010. **10**(57): p. 3910-3914.
- 6- Cannoni B, Borquez .R. *Vulvovaginitis e infecciones de transmisión sexual en la adolescencia* Med. Clin Condes, 2011. **22**(1): p. 49-57.
- 7- Sherard J, Donders G., White D, *European guideline on the Management of Vaginal Discharge*. 2011.
- 8- Centers of Disease and Prevention. *Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines* MMWR, 2006. **55**(NRR-11).
- 9- Sutton M, Senternberg M., Koumans E, Mc Quillan G, Berman S. *The prevalence of Trichomonas Vaginalis infection among reproductive age women in the United States*. 2001-2004.
- 10- Sobel JD. *Vaginitis*. New England Journal of Medicine, 1997. **337**(26): p. 1896-1903.
- 11- Foxman B. *The epidemiology of vulvovaginal candidiasis: Risk factors* Amer J. Pub Health, 1990. **80**: p. 329-331.
- 12- Pimentel SB, Reynolds E., *Candidiasis vaginal* Rev. Pac. Med Fam 2007.**4**(6): p. 121-127.
- 13- Margariti PA, Astorri AL, Mastromarino C, Morace G. Mycotic vulvovaginitis. Recenti Prog Med, 1997.**88**: 479-484.
- 14- Sobel JD. *Vulvovaginal Candidiasis*. Lancet 2007. **369**: p. 1961-1971.
- 15- Cassone A, DeBernardis .F., Santoni G., *Immunity and Vaginitis: novel opportunities for immune intervention* Infection and Immunity, 2007: p. 467-4686.
- 16- Ikit M, Güzel AB. *The epidemiology, pathogenesis and diagnosis of vulvovaginal candidiasis: a mycological perspective* Crit. Rev. Microbiol., 2011. **37**: p. 250-261.

- 17-Pichova I, P.L., Postal J, Dolejsi E, Hruskava-Heidingsfelova O, Weber J, Ruml T, Soucek M. , *Secreted Aspartic Proteases of Candida albicans, Candida tropicalis, Candida parapsilosis and Candida lusitanae* Eur J Biochem, 2001. **268**: p. 2669-77.
- 18-Richter SS, G.R., Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA, *Antifungal susceptibility of Candida species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases*. J. clin Microbiol, 2005. **45**(5): p. 2155-2162.
- 19-Robinson SC, Nicholas WC., Lee DT, Wanklin JM, Zwicher B. *The relationship of pregnancy, vaginal candidiasis and glucosa metabolism* Can. Med. Assoc J, 1967. **96**: p. 583-585.
- 20-Soong D, Einarson .A.. *Vaginal yeast infections during pregnancy* Can. Fam Phys 2009.**55**: p. 255-256.
- 21-Copolillo E, Perazzi B, Vay C, Cora Eliseth M, Tauscher P, Barata A y cols. Metodología diagnóstica para las infecciones del tracto genital inferior durante el embarazo. Ginecol Reprod 2000. **7**:p 76-81.
- 22-Torres K, Soto A, Sandra D, Villalobos M, Rodriguez A. Candidiasis vaginal en primigestas. Rev obstet Ginecol Venez (serial online) 2005. **65** (2).
- 23-Meis PJ, Goldenberg RL, Mercer B, Moawad A, Das A, McNellis D *et al*. The preterm prediction study: significance of vaginal infections. An J obstet Gynecol 1995.**173**: 1231-1235.
- 24- Blackwel AL, Thomas PD, Wareham K, Emery SJ. Health gains from screening for termination of pregnancy. Lancet 1993. **342**: 206-210.
- 25- Reyes JV, Arenas R., *Candidiasis mucocutanea: una revisión* Rev. Mexicana de Micología 2007. **25**: p. 91-104.
- 26-Darmstadt GL, Dinulos JG., Miller Z, *Congenital Cutaneous candidiasis: clinical presentation, pathogenesis and Management guidelines, pediatrics* 2000: p. 438-444.
- 27-Brawn H, Vera C, Belmar C, Carabajal JA. Csecuencias perinatales de la infección intrauterina por *Candida*. Rev chil obstret Gineco 2003. **64** (4).
- 28-Lane AT . *Cutaneous Candidiasis* .Pediatr Dermatol, 1995. **12**: p. 369.
- 29- Dillon M, Gray E., Pass M, Gray B, *Anorectal and vaginal carriage of group b streptococci during pregnancy*. J. Infect. Dis 1982. **145**: p. 794-799.
- 30-Manning SD, Neighbors K., Tallman PA, Gillespre B, Marscf Bochart SM, Baker CJ, Pearlman MD, Foxman B, *Prevalence of group B streptococcus colonization and potential for transmission by casual contact in healthy young men and woman*. Clin. infect. Dis, 2004. **39**: p. 380-388.
- 31-Juncoast Bosh J, Dopico E., Guardia C, Lite J, Sierra M. *Infección neonatal por streptococcus agalactiae. Estudio Multicéntrico en el area de Barcelona* . Enf. Inf. Microbiol. Clin, 1998. **16**: p. 312-315.

- 32- Schrag SJ, Zywickis, Farley MM, *et al.* Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Eng J Med* 2000. **342**: p15-20.
- 33-Centers of Disease and Prevention. *Prevention of perinatal group B streptococcal disease..Revised guidelines from C.D.C* MMWR recom Rep, 2002. **51**(RR-6): p. 28-9.
- 34- Centers of Disease and Prevention. *Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC* MMWR Recomm Rep, 2010. **(59)**(RR-10): p. 1-32.
- 35-Knapp JS, K.oumans E., *Neisseria and Branhamella*, in Murray P, Baron EJ, Pfaller M, Tenover FC, Tenover RN (Eds) *Manual of Clinical Microbiology (7 Ed)* Savier, Editor 1999, ASM press: Washington DC. p. 586-603.
- 36-Ryan KJ, Sherris *Medical Microbiology and Introduction to Infectious diseases (3 Ed)*1994, Nowark: Appleton & Lange.
- 37- Wesley Catlin B. *Gardnerella vaginalis characteristics, clinical considerations and controversies* Clin Microbiol Rev, 1992.**5**: p. 213-237.
- 38- Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. Clin Microbiol Rev 1997.**10**: p160-184.
- 39- Praznick J. Technics for culturing Mycoplasma species from clinical specimens. Amer J clin Pathol 1969. **52**:p 784-789.
- 40- Shepard MC, Lucenford CD. Ureasa color test medium U9 for detection of “T” Mycoplasma in clinical material. Appl Microbiol 1970. **20**: p539-543.
- 41- Iwen, P. C., Hinrichs, S. H. & Rupp, M. E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Med Mycol 2002.**40**: p 87-109.
- 42- Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. Enferm infecc Microbiol Clin 2012.**30**: p33-39.
- 43- Schoch CL, Seifertb KA, Huhndorf S, Robertd V, Spougea JL, Levesqueb CA, Chenb W, *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc Natl Acad Sci USA 2012. **109**: p6241–6.
- 44- Kiss L. Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for Fungi. Proc Natl Acad Sci USA 2012. **109**: p1811.
- 45-Tietz HJ, Hopp M, Schmalreck A, Sterry W, Czaica V *Candida africana sp nov., a new human pathogen or a variant of Candida albicans?* . Mycoses, 2001. **44**: p. 437-45.
- 46- Romeo O, Criseo G., *Candida africana and its closest relatives*. Mycoses 2010. doi: **10.1111/j.** p. 1439-0507.01939.x.

- 47- Forche A, Schonian G., Graser Y, Vilgalys R, Mitchell TG. *Genetic structure of typical and atypical populations of Candida albicans from Africa.* . Fungal Genet Biol., 1999. **28**: p. 107-25.
- 48-Alonso-Vargas R, Elorduy L., Eraso E, et al, *Isolation of Candida africana, probable atypical strains of Candida albicans, from a patient with vaginitis.*. Med Mycol 2008. **46**: p. 167-70.
- 49- Romeo O, Criseo G., *First molecular method between Candida africana, Candida albicans, and Candida dubliniensis by using hwp1 gene.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2008. **62**: p. 230-3.
- 50- Romeo O, Criseo G., *Molecular epidemiology of Candida albicans and its closely related yeast Candida dubliniensis and Candida africana.* J Clin Microbiol, 2009. **47**: p. 212-4.
- 51- Jewtuchowicz VM, Mujica MT., Brusca MI, Sordelli N, Malzone MC, Pola SJ, Iovannitti CA, Rosa AC. , *Phenotypic and genotypic identification of Candida dubliniensis from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina.* Oral Microbiol Immunol 2008: p. 505-509.
- 52- Fernandez A, Jewtuchowicz V., Malzone MC, Lopez-Daneri G, Iovannitti CA, Mujica MT. *Phenotypic and genotypic characterization of Candida dubliniensis isolate in a patient with disseminated candidiasis.* Mycoses, 2010. doi:10.1111/j.1439-0507.2010.01917.x.
- 53- Odds FC, Bognoux M, Shaw DJ, et al. *Molecular phylogenetics of Candida albicans.* Euk Cell., 2007. **6**: p. 1041-52.
- 54- Staib P, Morschauser J., *Chlamyospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of Candida dubliniensis.* Mycoses 1999. **42**: p. 521-524.
- 55-Sullivan DJ , Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A., Stokes C., Vaughan C, Coleman D.C. *Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of Candida dubliniensis and Candida albicans.* FEMS Yeast Research, 2004. **4**: p. 369-376.
- 56-Donnelly SA., Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC. *Phylogenetic analysis and rapid identification of Candida dubliniensis based on analysis of ACT 1 intron and exon sequences.* Microbiology, 1999. **145**: p. 1871-1882.
- 57- Pfaller MA, R N. Jones, G. V. Doern, H. S. Sader, S. A. Messer A, Houston S, Coffman, and R J Hollis. *Bloodstream infections due to Candida species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America 1997-1998.* Antimicrob. Agents Chemother, 2000. **44**: p. 747-751.
- 58- Mujica MT, Finquelievich JL, Jewtuchowicz V, Iovannitti CA. *Prevalencia de Candida albicans y Candida no albicans en diferentes muestras clínicas. , Prevalencia de Candida albicans y Candida no albicans en diferentes muestras clínicas. Periodo 1999-2001.* Rev Arg. Microbiol, 2004. **36**: p. 107-112.
- 59- Krcmery V, Barnes AJ. *Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance.* J Hosp Infect, 2002. **50**: p. 243– 260.
- 60- Garcia-Effron G., Katiyar S K, Park S, Edlind, TD and Perlin, DS. *A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in Candida parapsilosis, Candida*

- orthopsilosis, and Candida metapsilosis accounts for reduced echinocandin susceptibility.* Antimicrob Agents Chemother 2008. **52**: p. 2305–2312.
- 61- Mirhendi H, Bruun B., Schønheyder HC, Christensen JJ, Fursted K, Gahrn-Hansen B, Johansen HK, Nielsen L, Knudsen JD, Arendrup MC., *Molecular screening for Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis among Danish Candida parapsilosis group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation.* J Med Microbiol 2010. **59**: p. 414-420.
- 62- Alcoba-Florez J, Mendez-Alvarez S, Cano J, Guarro J, Perez-Roth E, Arevalo M. *Phenotypic and molecular characterization of Candida nivariensis sp. nov., a possible new opportunistic fungus.* J Clin Microbiol, 2005. **43**: p. 4107-11.
- 63- Bishop JA, Chase N, Lee R, Kurtzman CP, Merz WG. *Production of white colonies on CHROMagar Candida medium by members of the Candida glabrata clade and other species with overlapping phenotypic traits.* J Clin Microbiol, 2008. **46**: p. 3498-500.
- 64- Enache-Angoulvant A, Guitard J, Grenouillet F, Martin T, Durrens P, Fairhead C, Hennequin C. *Rapid discrimination between Candida glabrata, Candida nivariensis and Candida bracarensis using a simple-plex PCR.* J Clin Microbiol 2011. doi:10.1128/JCM.00688-11.
- 65- Odds FC, Webste C, Mayuranathan P, Simmons PD. *Candida concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis.* J Med Vet Mycol 1988. **26** p. 277-283.
- 66- Jitaurong S, Klamsiri S, Pattararagron N. *Milk medium for germ tube and chlamidoconidia production by Candida.* Mycopathologia, 1993. **123**: p. 95-98.
- 67- Lopez J, Dalle F, Mantelin P, Moiroux P, Nierlich ACH, Pacot A, et al. , *Rapid identification of Candida glabrata based on trehalose and sucrose assimilation using Rosco diagnostic tablets.* J Clin Microbiol, 2001. **39**: p. 1172-4.
- 68- Nugent IR, Krohn M, Hillier M. *Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by standarized method of gram stain interpretation.* J.clin Microbiol 1991. **297-301**: p. 29.
- 69- Lanzafame P, Cauci S. *A modified Nugent score has a very high sensivity for Bacterial Vaginosis.* BV 2000. Third Meeting on Bacterial Vaginosis 2000 P, 9, Ystad, Sweden.
- 70- Elías N, Cuestas M.L, Sandoval M, Poblete G, Lopez-Daneri G, Jewtuchowicz V, Iovannitti C, Mujica MT. , *Rapid identification of Histoplasma capsulatum directly from cultures by multiplex PCR.* Mycopathologia, 2012. DOI: 10.1007/s11046-012-9567-2.
- 71- Siachoque N, Jewtuchowicz V., Iovannitti C, Mujica, MT. *Amplificación del gen CAP 59 en Cryptococcus neoformans y Cryptococcus gattii directamente a partir de una suspensión de levaduras.* Rev Arg Microbiol, 2010. **42**: p. 91-94.
- 72- Ahmad S, K.han Z, Mustafa AS, Khan ZU. *Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification.* J Clin Microbiol 2002. **40**: p. 2483–2489.

- 73- Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan ZU. *Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among Candida parapsilosis and Candida orthopsilosis strains isolated from clinical specimens in Kuwait*. 2009. **58**: p. 745-752.
- 74- Lamont, RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Romero R. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2011; **118**: 533-549.
- 75- Garcia Heredia M, Garcia SD, Copolillo EF, Cora Eliseth M, Barata AD, Vay CA, de Torres RA, Tiraboschi N, Famiglietti MR. Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos. *Rev Arg Microbiol* 2006; **38**:9-12.
- 76- Okonkwo NJ, Umeanaeto PU: Prevalence of vaginal candidiasis among pregnant women in Nnewi Town of Anambra State, Nigeria. *Afr Res Rev* 4(4), 539–548 (2010).
- 77- Guzel AB, Ilkit M, Burgut R, Urunsak IF, Ozgunen FT: An evaluation of risk factors in pregnant women with Candida vaginitis and the diagnostic value of simultaneous vaginal and rectal sampling. *Mycopathologia* 172 (1), 25–36 (2011).
- 78- Buscemi L, Arechavala A, Negroni R. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis, en pacientes del hospital de infecciosas Francisco J. Muñiz. *Rev Iberoam Micol* 2004; **21**: 177-181.
- 79- Lopes Consolaro ME, Albertoni TA, Yoshida CS, Mazucheli J, Peralta RM, Estivalet Svidzinski TI. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. *Rev Iberoam Micol* 2004; **21**: 202-205.
- 80- Tiraboschi ICN, Mandarano AM; Messer SW, Bogdanowicz E; Kurlat I, Lasala MB. Congenital candidiasis: confirmation of mother-neonate transmission using molecular analysis techniques. *Medical Mycology* 2010, **48**, 177–181.
- 81- Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynecol Obstet, Suppl* 2000; **71**:21 – 7.
- 82- Ahmad Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009; **144**: 68—71- Amouri Mycoses 2011;**54**:e499—505.
- 83- Asticcioli *New Microbiol* 2009;**32**:199—204.
- 84- Mahmoudi Rad Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2011;**155**:199—203.
- 85- Wirth F, Goldani LZ. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2012, Article ID 465717. doi:10.1155/2012/465717.
- 86- Sullivan, DJ, Westerneng TJ, Haynes K, Bennett AD E, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV infected individuals. *Microbiology* 1995; **141**:1507–1521.

- 87- Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE Moran GP, Barry, HJ, Shanley DB. Candidiasis: the emergence of a novel specie, *Candida dubliniensis*. AIDS 1997; 11: 557-567.
- 88- Us E, Cengiz SA. Prevalence and phenotypic evaluation of *Candida dubliniensis* in pregnant women with vulvovaginal candidosis in a university hospital in Ankara. Mycoses. 2007; 50(1):13-20.
- 89- Shan Y, Fan S, Liu X, Li J. Prevalence of *Candida albicans*-closely related yeasts, *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis. Med Mycol, 2014, 52, 636–640.
- 90- Theill L, Dudiuk C, Moreno S, Gamarra S, Nardin ME, Mendez E, Garcia-Effron G. Patrones de sensibilidad de aislamientos vaginales de las especies del complejo *Candida albicans* y primer aislamiento de *Candida africana* en Argentina. XXIII Jornadas Argentinas de Micología, y 1° reunión de la Asociación Micológica Carlos Spegazzini. Bs As 24 al 27 de agosto 2014.
- 91- Romeo O, Criseo G. *Candida africana* and its closet relatives. Mycoses 2011; 54:475-586.
- 92- Tietz HJ, Kussner A, Thanos M, Pinto De Andrade M, Presber W, Schonian G. Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of *Candida albicans* from Africa. J Clin Microbiol 1995; 33:2462-2465.
- 93- Borman AM, Petch R, Linton Cj, Palmer MD, Bridge PD, Johnson EM. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. J Clin Microbiol 2008; 46: 933-938.
- 94- Li J, Shan Y, Fan S, Liu X. Prevalence of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in vulvovaginal candidiasis. Mycopathol 2014; 178: 279-83.
- 95- Kirakoya-Samadoulougou F, Nagot N, Defer MC, Yaro S, Meda N, Robert A. Bacterial vaginosis among pregnant women in Burkina Faso. Sex Transm Dis 2008, 35:985-989.
- 96- Romoren M, Velauthapillai M, Rahman M, Sundby J, Klouman E, Hjortdahl P: Trichomoniasis and bacterial vaginosis in pregnancy: inadequately managed with the syndromic approach. Bull World Health Organ 2007, 85:297-304.
- 97- Centers of Disease and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines MMWR, 2006. 55 (NRR-11).
- 98- Di bartolomeo S, Rodriguez Marcelo, Sauka D, de Torres RA. Perfil microbiológico en secreciones genitales de embarazadas sintomáticas en el Gran Buenos Aires, Argentina.
- 99- Simoes JA, Giraldo PC, Faundes A. Prevalence of cervicovaginal infection during gestation and accuracy of clinical diagnosis. Inf. Dis.obstet Gynecolo 1998, 6(3): 129-133.
- 100- Sanches-Rojas KM, Molina B, Depablos J. *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma spp* en un grupo de mujeres embarazadas en el ultimo trimestre de gestación. Rev Fac Farm.2009; 51(2):36-40.