



**Fundación H. A. Barceló. Facultad de Medicina. Instituto Universitario de Ciencias de la Salud. Doctorado en Ciencias de la Salud**

Doctoranda  
***Bqca. Miriam Estela Chade***

**Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de extractos acuosos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Yerba mate) frente a *Candida* spp., aisladas de pacientes con candidiasis vulvovaginal**

**Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de “Doctor en Ciencias de la Salud”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Directora  
***Dra. Susana Córdoba***  
Co-Director  
***Dr. Miguel Schmalko***

**Buenos Aires, 2021**



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



# Tesis Doctoral

**Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro*, de extractos acuosos de *Ilex paraguariensis* St.Hil. (Yerba mate) frente a *Candida* spp., aisladas de pacientes con candidiasis vulvovaginal.**

**Doctorando: Bqca. Miriam Estela Chade**



Director: Dra. Susana Córdoba  
Co director: Dr. Miguel Schmalko

Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales.  
Universidad Nacional de Misiones (UNaM).  
Departamento Micología. INEIA ANLIS "Dr. C. G. Malbrán".



**Instituto Universitario de Ciencias de la Salud  
Fundación H. A. Barceló  
Doctorado en Ciencias de la Salud**

**Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias de la Salud de la  
Bqca. Miriam Estela Chade**

**Directora. Dra. Susana Córdoba  
Co- Director: Dr. Miguel Schmalko**

**Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de  
Misiones**

**Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud. Instituto  
Nacional de Enfermedades Infecciosas Agudas “Dr. Carlos G. Malbrán”.  
Departamento de Micología. CABA.**



*Dedicado a la memoria de a Dra. Martha Medvedeff*



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y a la Virgen por acompañarme y guiarme siempre en el camino de mi vida.

A mi querida directora de tesis, Dra. Susana Cordoba, sin su acompañamiento no lo hubiese logrado, hermosa persona, desinteresada y dispuesta en todo momento a guiarme, compartir sus conocimientos y su tiempo sin importar la hora ni el día.

A Walter Vivot del ANLIS, por su predispuesta y desinteresada ayuda para llegar al final de este camino.

A mi co director de tesis Dr. Miguel Schmalko por sus aportes y apoyo durante mi investigación.

A mis compañeros del laboratorio de Micología: Ernesto, Vanesa y Celina. Especialmente a mi compañera y amiga Neca Mereles. Gracias por compartir mi sueño.

A mis compañeras de laboratorio de Microbiología: Gladys, Marta, Lorena, Adriana quienes siempre me apoyaron y confiaron en mí.

A mis colegas del Instituto San Basilio Magno, por su apoyo, paciencia y confianza.

A las muy lindas personas, que fueron muchas, que de una u otra manera me acompañaron en este largo proceso de cursada de carrera y desarrollo de tesis. Gracias por estar.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNaM y al Instituto Dr Carlos Malbran por haberme permitido desarrollar mi investigación en sus instalaciones.

A mis padres por enseñarme valores que guían mi vida y por apoyo incondicional durante todos los años de mi carrera. En especial a mi madre Nélida por su amor, su dedicación, sus oraciones y confiar plenamente en mí.

A ellos, mi amado esposo Ruben y mis amados hijos Agustín, Verónica y Mariana por creer en mí, por su paciencia, por inyectarme fuerzas cuando no las tenía y hacerme ver la vida de forma sencilla, simple y con paz. Muchas gracias amores!!!!



## LISTA DE ABREVIATURAS

- ATF:** antifúngico
- AATF:** actividad antifúngica
- AA:** agar agua
- ASD:** agar Sabouraud dextrosa
- AMHM:** agar Müeller Hinton modificado
- ANLIS:** Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud
- ATM:** agar tabaco modificado
- ATZ:** agar tomate-zanahoria
- ATCC:** *American Type Culture Collection*
- AYM:** agar *yeast morphology*
- CFM:** concentración fungicida mínima
- CIM:** concentración inhibitoria mínima
- CLSI:** *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CLZ:** clotrimazol
- CVV:** Candidiasis vulvovaginal
- CVVR:** Candidiasis vulvovaginal recurrente
- DM:** discos Malbrán
- DO:** discos Oxoid
- EAHYM:** extracto acuoso de hojas de yerba mate
- EUCAST:** *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- FDA:** *Food and Drug Administration*
- FLZ:** fluconazol
- ITZ:** itraconazol
- INEIA:** Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Agudas. “Dr. Carlos G. Malbrán”
- INTA:** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- INPB:** Instituto de Producción de Biológicos del INEIA. ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”
- INYM:** Instituto Nacional de la Yerba Mate
- MALDI-TOF MS:** *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*
- MC:** medio Castellani
- MML:** método de microdilución en medio líquido



**MDA:** método de difusión en agar

**mg / mL:** miligramo por mililitro

**NCCLS:** *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

**NIS:** nistatina

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**R:** resistencia

**S:** sensibilidad

**SDD:** sensibilidad dependiente de dosis

**SF:** solución fisiológica

**TNS™:** tabletas Neo-Sensitabs™

**UFC/mL:** Unidades formadoras de colonias por mililitro



## LISTA de FIGURAS

- Figura 1.** Proteínas de superficie de *Candida albicans* tipo CR3 reconocen secuencias de aminoácidos (Arginina- Glicina- Aspartato) RGD en células epiteliales.
- Figura 2.** Diagrama de la regulación transcripcional de la expresión de ALS3. A1 y A2 son regiones de activación en el promotor de ALS3, y R1 y R2 son regiones represoras.
- Figura 3.** Relación hifa – célula huésped.
- Figura 4.** Respuesta inmune innata local en el tracto genital femenino.
- Figura 5.** Estructura química del fluconazol.
- Figura 6.** Sitios diana de los antifúngicos.
- Figura 7.** Zona geográfica de la zona productora de yerba mate en la República Argentina.
- Figura 8.** Fruto de *Lagenaria vulgaris* utilizado como mate.
- Figura 9.** Cultivares de yerba mate en Misiones.
- Figura 10.** Hojas, flores y frutos de *I. paraguariensis*.
- Figura 11.** Estructura química de la cafeína.
- Figura 12.** Estructura química del ácido clorogénico.
- Figura 13.** a- Aspecto de saponina. b- Estructura química de saponinas triterpénicas.
- Figura 14.** Algoritmo de identificación presuntiva de levaduras.
- Figura 15.** a- Cultivo de las levaduras. b- Inoculación de la placa. c- Lectura en el equipo MALDI-TOF.
- Figura 16.** Esquema de obtención y liofilizado del EAHYM.
- Figura 17.** Rango de concentraciones en  $\mu\text{g/mL}$  para el itraconazol y el clotrimazol.
- Figura 18.** Preparación de las diluciones del EAHYM.
- Figura 19.** Esquema que muestra el procedimiento para realizar la determinación de la CFM.
- Figura 20.** Cepa 26, resultado del análisis de identidad y similitud realizado con la herramienta BLASTn del NCBI.
- Figura 21.** Cepa 26. Resultado obtenido del análisis realizado mediante la base de datos *Fungal barcoding*.
- Figura 22.** Cepa 11B. Resultado del análisis de identidad y similitud realizado con la herramienta BLASTn del NCBI.





**Figura 23.** Cepa 11B. Resultado obtenido del análisis realizado mediante la base de datos *Fungal barcoding*.



## LISTA de FOTOS

**Foto 1.** **a**-Hojas de yerba mate; **b**-Extracto liofilizado.

**Foto 2.** **a**-Diluciones de EAHYM; **b** y **c**-Carga de las microplacas con medio de cultivo y EAHYM; **e**-Vista de microplaca cargada con EAHYM; **f**-Vista lateral de microplaca cargada con EAHYM.

**Foto 3.** Medida de la densidad óptica de los inóculos y colocación de los discos de antifúngicos.

**Foto 4.** **a**-Carga de discos con distintas concentraciones de EAHYM; **b**-Control de esterilidad.

**Foto 5.** Difusión en agar de extractos de yerba mate en hoyos.

**Foto 6.** Multiinoculador, cajas de Petri con las distintas diluciones del EAHYM, plantilla de siembra, siembra.

**Foto 7.** **a**-Colonias cremosas, cultivo en agar YM a 28 °C; **b**-Macromorfología en agar Pal, colonias lisas; **c**-Formación del tubo germinal en suero bovino; **d**-Formación de clamidoconidios en agar tomate zanahoria; **e**- Cultivo en agar cromogénico; **f**- Presencia de turbidez en caldo hipertónico; **g**-Detección de actividad lipasa; **h**-Prueba de trehalosa.

**Foto 8.** EAHYM liofilizado. Fuente propia.

**Foto 9.** **1**-No se obtuvo desarrollo de la levadura en la fila C; **2**-Se observa claramente la inhibición en las filas C y F en el pocillo correspondiente a 6,25 mg/mL.

**Foto 10.** Determinación de CFM. No se observa actividad fungicida luego de 24-48 h de incubación.

**Foto 11.** Halos de inhibición generados en agar MHM por la actividad de los antifúngicos frente a las levaduras en estudio (vista del anverso y reverso de la placa).

**Foto 12.** **a** y **b** Difusión en agar con distintas concentraciones de EAHYM versus *C. krusei*. **c**- Difusión en agar con distintas concentraciones de EAHYM versus *Candida* sp. No se observa actividad inhibitoria.



## LISTA de GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Total de aislados levaduriformes identificados en forma presuntiva.
- Gráfico 2.** Identificación definitiva del total de levaduras aisladas. Distribución de las especies.
- Gráfico 3.** Curva de absorbancia del ácido gálico.
- Gráfico 4.** CIM de EAHYM frente a *C. albicans*.
- Gráfico 5.** CIM de EAHYM frente a *C. glabrata* ss y *C. nivariensis*.
- Gráfico 6.** CIM de EAHYM frente a *C. parapsilosis* ss y *C. metapsilosis*.
- Gráfico 7.** CIM de EAHYM frente a *C. tropicalis*.
- Gráfico 8.** CIM de EAHYM frente a *S. cerevisiae*.
- Gráfico 9.** Rangos definidos por Rosco para categorizar a las cepas de *Candida* de acuerdo al valor del halo de inhibición. ITZ-T: itraconazol; T: tableta.
- Gráfico 10.** Rangos definidos por el CLSI para categorizar a las cepas de *Candida* de acuerdo al valor del halo de inhibición. FLZ-T: fluconazol; T: tableta.
- Gráfico 11.** Rangos definidos por el CLSI para categorizar a las cepas de *Candida* de acuerdo al valor del halo de inhibición. FLZ-DO: fluconazol; DO: disco Oxoid.
- Gráfico 12.** Rangos definidos para categorizar a las cepas de *Candida* de acuerdo al valor del halo de inhibición. FLZ-DM: fluconazol; DM: disco Malbrán.
- Gráfico 13.** Diámetro en mm de los halos de inhibición de las cepas de *S. cerevisiae*.
- Gráfico 14.** Gráficos de dispersión utilizados para relacionar el Log<sub>2</sub> CIM y el halo de inhibición de las 111 *C. albicans* frente al itraconazol, el clotrimazol, el fluconazol y la nistatina contenidos en distintos reservorios (tableta/discos).
- Gráfico 15.** Gráficos de dispersión utilizados para relacionar el Log<sub>2</sub> CIM y el halo de inhibición de las 23 especies no- *C. albicans* frente al itraconazol, el clotrimazol, el fluconazol y la nistatina contenidos en distintos reservorios (tableta/discos).
- Gráfico 16.** Antifúngicos vs EAHYM en *Candida*. CIM: concentración inhibitoria mínima. FLZ: fluconazol, ITZ: itraconazol; NIS: nistatina; CLZ: clotrimazol.
- Gráfico 15.** Antifúngicos vs EAHYM en *Saccharomyces*. CIM: concentración inhibitoria mínima. FLZ: fluconazol, ITZ: itraconazol; NIS: nistatina; CLZ: clotrimazol.



## LISTA de TABLAS

- Tabla 1.** Características morfo-fisiológicas de las especies del complejo *C. albicans*.
- Tabla 2.** Principales características fisiológicas de las especies del complejo *C. glabrata*.
- Tabla 3.** Características generales de las especies no-*C. albicans*.
- Tabla 4.** Características nutricionales de la yerba mate.
- Tabla 5.** Esquema para preparar las series de diluciones de los antifúngicos.
- Tabla 6.** Valores de concentración de antifúngicos y de yerba mate utilizada para la determinación de la CIM.
- Tabla 7.** Puntos de corte de clínicos para *Candida* spp. frente a fluconazol e itraconazol.
- Tabla 8.** Puntos de corte definidos para las tabletas Neo-Sensitabs™. Rosco Diagnóstica.
- Tabla 9.** Identificación presuntiva de levaduras aisladas de flujo vaginal, características morfológicas y fisiológicas.
- Tabla 10.** Pruebas diferenciales para identificación fenotípica *C. albicans* - *C. dubliniensis*.
- Tabla 11.** Identificación de levaduras por métodos fenotípicos y por espectrometría de masas (MALDI-TOF).
- Tabla 12.** Valores de CIM de las cepas de referencia frente a los antifúngicos y EAHYM.
- Tabla 13.** Distribución de valores de CIM y porcentaje acumulado de inhibición de itraconazol y fluconazol para las levaduras aisladas de flujo vaginal.
- Tabla 14.** Interpretación categórica para las combinaciones antifúngico / microorganismo que cuentan con puntos de corte definido.
- Tabla 15.** Distribución de valores de CIM y porcentaje acumulado de inhibición de clotrimazol y nistatina para las levaduras aisladas de flujo vaginal.
- Tabla 16.** Distribución de valores de CIM y porcentaje acumulado de inhibición de EAHYM para las levaduras aisladas de flujo vaginal
- Tabla 17.** Valores de CIM de los antifúngicos y del EAHYM para las levaduras aisladas de flujo vaginal.
- Tabla 18.** Rango del halo de inhibición en mm de las cepas de referencia frente a cuatro antifúngicos.
- Tabla 19.** Valores de moda, media geométrica y rango de los antifúngicos frente a las levaduras.



**Tabla 20.** Interpretación categórica para las combinaciones antifúngico / microorganismo que cuentan con puntos de corte definido.

**Tabla 21.** Porcentaje de concordancia categórica para las combinaciones antifúngico/*Candida* evaluados por método de microdilución y difusión en agar.



## RESUMEN

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una patología del tracto genital femenino causada por levaduras, principalmente pertenecientes al género *Candida*. La especie aislada con mayor frecuencia es *Candida albicans*, seguida de *Candida glabrata*, aunque en los últimos años se observa un aumento en la frecuencia de aparición de otras especies no - *C. albicans*.

Esta micosis permanece sin resolución, aun en los tiempos que corren, y se vuelve recurrente debido a fallas en los tratamientos.

Aunque la CVV no está asociada a mortalidad, su elevada morbilidad la convierte en una de las principales causas de alteración en la vida sexual, afectiva y psicológica de las mujeres. La CVV no resuelta puede complicarse en enfermedad inflamatoria pélvica, infertilidad, embarazo ectópico, absceso pélvico, aborto espontáneo y trastornos menstruales, lo que implica también costos económicos directos e indirectos.

A pesar de contar con distintas drogas antifúngicas para el tratamiento de esta micosis, no siempre son efectivas, se suele desarrollar resistencia postratamiento. En general, los antifúngicos presentan efectos colaterales e indeseables, lo que conlleva a restricciones de uso en determinadas pacientes.

La búsqueda de nuevas moléculas es un área de investigación en expansión. En este sentido, el uso de productos naturales obtenidos de plantas se presenta como una alternativa potencial, ya que en distintos estudios se evidencia menor toxicidad y en algunos casos, actividad antifúngica de amplio espectro. La perspectiva de obtener un antifúngico etnofarmacológico natural y económico, con escasos o nulos efectos secundarios es un desafío a futuro.

La planta de *Ilex paraguariensis* St Hilarie, llamada popularmente “yerba mate” se produce y cultiva en Misiones y nordeste de Corrientes, Paraguay, sur de Brasil y Uruguay. La planta fue utilizada por los aborígenes que conocían sus numerosas virtudes, ya que formaba parte de sus hábitos y su dieta, la consumían como estimulante natural y por sus propiedades medicinales.

En las hojas de la planta se encuentra un alto contenido de componentes bioactivos: saponinas, polifenoles y xantinas. Se le atribuyen propiedades antioxidantes, anticarcinogénicas, hipoglucemiante, antiobesidad, hipocolesterolémicas,



antihipertensivos, cardioprotectores, antiinflamatorios, antibacterianos, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios, entre los más estudiados.

Teniendo en cuenta las propiedades de la yerba mate como antimicrobiano, en este trabajo nos planteamos como objetivo: *determinar y comparar la actividad antifúngica in vitro de extractos acuosos obtenidos de hojas de I. paraguariensis y de antifúngicos convencionales frente a especies de Candida aisladas de pacientes con CVV.*

Se trabajó con una muestra de 139 cepas de hongos levaduriformes aislados de CVV de mujeres en edad reproductiva, residentes en la Ciudad de Posadas, Misiones. Las levaduras fueron identificadas fenotípica y molecularmente.

Se evaluó la sensibilidad *in vitro* mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y por difusión en agar, de acuerdo a los documentos de referencia EDef. 7.3.2 del EUCAST y M44 3er ed. del CLSI, respectivamente. Se evaluaron los antifúngicos fluconazol, itraconazol, clotrimazol y nistatina, y extractos acuosos de yerba mate (EAHYM). Para los ensayos por difusión en agar se utilizaron discos y tabletas comerciales cargados con antifúngicos y cargados con EAHYM en el laboratorio.

Se calcularon los porcentajes de concordancia entre el método de referencia por dilución y el método por difusión en agar para las combinaciones antifúngico/levadura que contaban con puntos de corte clínicos.

Se obtuvo la siguiente distribución de especies en orden de frecuencia: *C. albicans* sensu stricto, *C. grabrata* sensu stricto, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. nivariensis*, *C. metapsilosis*, *C. krusei* y *Saccharomyces cerevisiae*. Con las técnicas fenotípicas no fue posible identificar a las especies crípticas.

Para *C. albicans* y *C. tropicalis*, el antifúngico más activo fue el fluconazol con un 94,6 % y 83,3 % de cepas sensibles, respectivamente. Mientras que para *C. parapsilosis* el 100 % resultó sensible al itraconazol y el 66,7 % fue sensible al fluconazol.

Para el clotrimazol y la nistatina no fue posible categorizar a los aislados debido a que aún no se definieron puntos de corte clínico. El clotrimazol inhibió el desarrollo del 92,8 % de las cepas en estudio con un valor de CIM  $\leq 0,06$   $\mu\text{g/mL}$ , mientras que la nistatina inhibió al 100 % de las cepas con un valor de CIM  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ .



Para *S. cerevisiae*, se obtuvieron valores bajos de CIM para el itraconazol y el clotrimazol,  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$  y  $\leq 0,06$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Mientras que para el fluconazol y la nistatina los valores de CIM fueron  $\leq 4$   $\mu\text{g/mL}$  y  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Al evaluar el fluconazol, los porcentajes de concordancia con *C. albicans* y *C. tropicalis*, tanto con los discos, como con las tabletas, fueron en promedio un 86,1 % para los tres reactivos. El menor porcentaje de concordancia fue para las especies del complejo *C. glabrata* con un 67 %, 33,3 % y 75 % para las tabletas, disco Malbrán y disco Oxoid, respectivamente.

Con las especies del complejo *C. parapsilosis* el porcentaje de concordancia fue relativamente bajo, 75 %, 50 % y 50 %, para las tabletas, disco Malbrán y disco Oxoid, respectivamente.

El mayor porcentaje de *discrepancias muy mayores* con fluconazol se obtuvo con los discos Malbrán para las especies no-*C. albicans* (22,2 %), seguido por los discos Oxoid (13,8 %).

Para el itraconazol, el porcentaje de concordancia fue del 75 % a excepción de *C. tropicalis* que mostró un 100 % de discrepancias menores.

Con respecto al EAHYM, se observó un rango amplio de valores de CIM para las especies de *Candida* (0,78 mg/mL a 400 mg/mL). Mientras que para *S. cerevisiae* la inhibición se alcanzó con valores de CIM  $\leq 6,25$  mg/mL.

No obtuvimos resultados satisfactorios cuando evaluamos a los EAHYM por difusión en agar.

A la fecha, comunicamos el primer aislamiento de las especies crípticas *C. nivariensis* y *C. metapsilosis* de como agentes de vulvovaginitis en Argentina.

Pudimos comprobar que existe actividad inhibitoria *in vitro* del EAHYM frente a especies de *Candida* y *S. cerevisiae*.

Este trabajo constituye un primer aporte al conocimiento de la actividad inhibitoria de EAHYM sobre especies de *Candida* y *S. cerevisiae* aisladas de pacientes con vulvovaginitis y evaluada por un método de referencia. Comprobamos la potencial utilidad de este producto vegetal de importancia regional y nos alienta a continuar trabajando en esta línea de investigación.

Palabras clave: *Actividad antifúngica, extractos acuosos. Ilex paraguariensis, candidiasis vulvovaginal.*





## ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (CVV) is a pathology of the female genital tract caused by yeasts, mainly belonging to the genus *Candida*. The most frequently isolated species is *Candida albicans*, followed by *Candida glabrata*, although in recent years there has been an increase in the frequency of appearance of other non-*C. albicans* species. This mycosis remains without resolution, even in current times, and becomes recurrent due to treatment failures.

Although CVV is not associated with mortality, its high morbidity makes it one of the main causes of alteration in sexual, affective and psychological life in women. Unresolved CVV can be complicated by pelvic inflammatory disease, infertility, ectopic pregnancy, pelvic abscess, spontaneous abortion, and menstrual disorders, which also entail direct and indirect economic costs.

Despite having different antifungal drugs for the treatment of this mycosis, they are not always effective, post-treatment resistance usually develops. In general, antifungals present undesirable side effects, which leads to restrictions on their use in certain patients.

The search for new molecules is an expanding research area. In this sense, the use of natural products obtained from plants is presented as a potential alternative, since different studies show less toxicity and in some cases, broad spectrum antifungal activity. The prospect of obtaining a natural and inexpensive ethnopharmacological antifungal with few or no side effects is a future challenge.

The *Ilex paraguariensis* St.Hilarie plant, popularly called “yerba mate”, is produced and cultivated in Misiones and northeast of Corrientes, Paraguay, southern Brazil and Uruguay. The plant was used by the aborigines who knew its many virtues, since it was part of their habits and their diet; they consumed it as a natural stimulant and for its medicinal properties.

There is a high content of bioactive components in the leaves of the plant: saponins, polyphenols and xanthines. Antioxidant, anticarcinogenic, hypoglycemic, antiobesity, hypocholesterolemic, antihypertensive, cardioprotective, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antiviral and antiparasitic properties are attributed to it, among the most studied.



Taking into account the properties of yerba mate as an antimicrobial, in this study we set ourselves the objective: to determine and compare the in vitro antifungal activity of aqueous extracts obtained from leaves of *I. paraguariensis* and conventional antifungals against *Candida* species isolated from patients with CVV.

We worked with a sample of 139 strains of yeast fungi isolated from CVV from women of reproductive age, residing in the city of Posadas, Misiones. Yeasts were phenotypically and molecularly identified.

In vitro, sensitivity was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and by diffusion in agar, according to the reference documents EDef. 7.3.2 of the EUCAST and M44 3rd ed. of the CLSI, respectively. The antifungals fluconazole, itraconazole, clotrimazole and nystatin, and aqueous extracts of yerba mate (EAHYM) were evaluated. Commercial disks and tablets loaded with antifungal and loaded with EAHYM were used in the laboratory for agar diffusion tests.

The percentages of agreement between the dilution reference method and the agar diffusion method were calculated for antifungal / yeast combinations that had clinical cut-off points.

The following distribution of species was obtained in order of frequency: *C. albicans* sensu stricto, *C. grabrata* sensu stricto, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. nivariensis*, *C. metapsilosis*, *C. krusei* and *Saccharomyces cerevisiae*. Using phenotypic techniques, it was not possible to identify cryptic species.

For *C. albicans* and *C. tropicalis*, the most active antifungal was fluconazole with 94.6% and 83.3% of susceptible strains, respectively. While for *C. parapsilosis* el 100% was sensitive to itraconazole and 66.7% was sensitive to fluconazole.

For clotrimazole and nystatin it was not possible to categorize the isolates because clinical cut-off points have not yet been defined. Clotrimazole inhibited the development of 92.8% of the study strains with a MIC value  $\leq 0.06 \mu\text{g} / \text{mL}$ , while nystatin inhibited 100% of the strains with a MIC value  $\leq 2 \mu\text{g} / \text{mL}$ .

For *S. cerevisiae*, low MIC values were obtained for itraconazole and clotrimazole,  $\leq 0.25 \mu\text{g} / \text{mL}$  and  $\leq 0.06 \mu\text{g} / \text{mL}$ , respectively. While for fluconazole and nystatin the MIC values were  $\leq 4 \mu\text{g} / \text{mL}$  and  $\leq 2 \mu\text{g} / \text{mL}$ , respectively.

When evaluating fluconazole, the percentages of agreement with *C. albicans* and *C. tropicalis*, both with the discs and with the tablets, averaged 86.1% for the three reagents. The lowest percentage of agreement was for the species of the complex



*C. glabrata* with 67 %, 33.3 % and 75 % for the tablets, Malbrán disk and Oxoid disk, respectively.

With the species of the complex *C. parapsilosis* the percentage of concordance was relatively low, 75 %, 50 % and 50 %, for the tablets, Malbrán disk and Oxoid disk, respectively.

The highest percentage of much larger discrepancies with fluconazole was obtained with Malbrán discs for non-*C. albicans* species. (22.2 %), followed by Oxoid discs (13.8%).

For itraconazole, the percentage of agreement was 75 % with the exception of *C. tropicalis* which showed 100 % minor discrepancies. With respect to EAHYM, a wide range of MIC values was observed for *Candida* species (0.78 mg / mL a 400 mg / mL). While for *S. cerevisiae*, inhibition was achieved with MIC values  $\leq$  6.25 mg / mL.

We did not obtain satisfactory results when we evaluated EAHYM by agar diffusion.

To the date, we report the first isolation of the cryptic species *C. nivariensis* and *C. metapsilosis* from as agents of vulvovaginitis in Argentina. We were able to verify that there is in vitro inhibitory activity of EAHYM against *Candida* species and *S. cerevisiae*.

This work constitutes a first contribution to the knowledge of the inhibitory activity of EAHYM on *Candida* species and *S. cerevisiae* isolated from patients with vulvovaginitis and evaluated by a reference method. We verify the potential utility of this plant product of regional importance and it encourages us to continue working in this line of research.

**Keywords:** *antifungal activity, aqueous extracts. Ilex paraguariensis, vulvovaginal candidiasis.*



*INTRODUCCION*

# INTRODUCCION

CAPITULO 1

1



### 1- CANDIDIASIS VULVOVAGINAL

La infección vaginal por especies del género *Candida*, conocida como candidiasis vulvovaginal (CVV), constituye una enfermedad inflamatoria aguda y una razón frecuente de consulta ginecológica. El género *Candida* incluye cerca de trescientas especies; entre las cuales, sólo una minoría está asociada a candidiasis humana (Lachance, 2011).

El principal agente etiológico de la CVV es el hongo levaduriforme *Candida albicans*, seguido por *Candida glabrata*. Esta enfermedad es la segunda causa más común de infecciones vaginales, precedida por las vaginosis bacterianas (Alsina, 2016; Miro, 2017; Sánchez-Martin, 2019).

La CVV es generalmente secundaria a condiciones fisiológicas alteradas que determinan disminución de la inmunidad local (Pradenas, 2014; Otero, 2018; Sanchez-Martin, 2019).

Esta micosis afecta al 75 % de las mujeres en edad reproductiva al menos una vez en su vida, y entre 40 y 45 % podrá presentar dos o más episodios en su vida. Se estima, además, que un 10-20 % de las mujeres no gestantes son portadoras asintomáticas, principalmente las que reciben alimentación rica en hidratos de carbono (Miro, 2017; Ardizzoli, 2018; Sherrard, 2018).

La forma recurrente de esta micosis, conocida como CVV recurrente (CVVR) se define por la presencia de al menos cuatro episodios sintomáticos en un periodo de doce meses (Sobel, 2016).

En una revisión bibliográfica reciente se estimó que la CVVR afecta aproximadamente a 138 millones de mujeres en el mundo (Denning, 2018).

La CVV no es una enfermedad de reporte obligatorio, por lo tanto, no solo se desconoce su incidencia, sino también, muchas veces los diagnósticos son erróneos ya que solo se basan en los signos clínicos de las pacientes sin confirmación de laboratorio.

La infección se presenta principalmente en mujeres en edad reproductiva (20 a 40 años), es estrógeno-dependiente, aunque en los últimos años se observa un aumento de casos en adolescentes y en menores de edad (Giusiano, 2009; Perurena Lancha, 2016; Pineda Murillo, 2017).



## INTRODUCCION

Aunque la CVV no está asociada a mortalidad, la morbilidad asociada la convierte en una de las principales causas de alteración en la vida sexual, afectiva y psicológica de las mujeres, y en muchos casos, con impacto negativo en el rendimiento laboral. La CVV es también asociada con los costos económicos directos e indirectos.

Particularmente, cuando la CVV no es tratada puede complicarse en enfermedad inflamatoria pélvica, infertilidad, embarazo ectópico, absceso pélvico, aborto espontáneo y trastornos menstruales (Pineda Murillo, 2017).

3

### 1.1- Agentes etiológicos

*Candida* es un hongo levaduriforme dimorfo que puede encontrarse en dos diferentes estados. Las blastosporas son las estructuras de reproducción asexual que aseguran la diseminación y transmisión de la levadura; estarían asociadas con las colonizaciones asintomáticas. Por otro lado, los micelios son las formas germinativas con capacidad invasora tisular (Barrenetxea Ziarrusta, 2002).

En el tracto genital femenino, la microbiota local, principalmente compuesta por bacilos grampositivos del género *Lactobacillus* es la encargada de regular el crecimiento de los distintos microorganismos que cohabitan en delicado equilibrio.

La regulación de *Lactobacillus* sobre el desarrollo de la microbiota la realiza gracias a la producción de compuestos antimicrobianos (peróxido de hidrógeno, ácido láctico y sustancias tipo bacteriocinas), y por la competencia por los sitios de adhesión al epitelio vaginal. Parolin *et al.*, observó que diferentes especies de *Lactobacillus* presentaban actividad fungicida y fungistática contra *C. albicans* (Parolin, 2015).

### 1.2- Factores predisponentes

La biota microbiana vaginal comensal juega un rol importante en la protección contra posibles infecciones. Se puede presentar vulvovaginitis cuando se compromete la inmunidad o los mecanismos locales de defensa, entre los que destacan diabetes mellitus, los altos contenidos en glucosa favorecen la



## INTRODUCCION

colonización del tracto genital; embarazo, los altos niveles de hormonas reproductivas incrementan el contenido de glucógeno en las células epiteliales vaginales, lo que proporciona una abundante fuente de carbono para *Candida*.

La CVV es estrógeno-dependiente, se ha demostrado que el estrógeno aumenta la adherencia del hongo a la superficie de las células que conforman este tracto mucoso. Es por ello que el uso de anticonceptivos orales con alto contenido de estrógenos favorece al sobrecrecimiento del patógeno.

Otro hecho que muestra la importancia de las hormonas de la reproducción en la presentación de la enfermedad es que la aparición de la CVV rara vez ocurre antes de la menarquia o posteriormente a la menopausia.

Otros factores predisponentes son la obesidad, el uso de antibióticos o corticoides durante largos períodos, así como cualquier tratamiento inmunosupresor, como también uso de ropa interior de fibras sintéticas, hábitos de higiene, entre otros (López Martínez, 1995; López Álvarez, 2005; Negroni, 2008; Pradenas, 2014).

En la mujer no embarazada, la presencia de vulvovaginitis se asocia a un mayor riesgo de infección del tracto genital superior e infecciones de transmisión sexual, así como la infección por VIH. La mayor parte de las recaídas se producen como consecuencia de la disminución de la inmunidad local de la vagina (Enache-Angoulvant, 2007; Alemán Mondeja, 2010; Pradenas, 2014; Miro, 2017).

### 1.3- Patogenia- Signos clínicos

Algunas especies del género *Candida* son comensales de la mucosa vaginal, en determinadas circunstancias esta biota comensal puede evolucionar a agente causal de vulvovaginitis, pasando del estado de colonización y adhesión de *Candida* a la piel o mucosa, al de penetración transmucosa y barrera epitelial con la consiguiente manifestación de infección local. Los signos clínicos y síntomas no suelen ser específicos y pueden confundirse con otras patologías del tracto vaginal (Miro, 2017).

Las características principales son prurito y ardor vaginal, los que se pueden exacerbar luego de la actividad sexual o durante la micción. Un signo



## INTRODUCCION

presente en la mayoría de los casos es la presencia de flujo vaginal blanco, sin olor, espeso, similar a leche cortada o cuajada, que se desprende en forma fácil de las paredes vaginales.

Por sus características, esta enfermedad es preocupante por la recurrencia de los síntomas y por la naturaleza refractaria a los tratamientos convencionales (Puig, 2003, Pradenas, 2014; Sobel, 2015; Miro, 2017; Sánchez-Martin, 2019).

5

### 1.4- Distribución de especies

EL agente causal de la CVV, corresponde al complejo *C. albicans* en un 85 y un 95 % de los casos, en segundo lugar, le sigue el complejo *C. glabrata* y con menor frecuencia el complejo *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* (García Heredia, 2006; Negroni, 2008; Kenedy, 2010; Marchaim, 2012; Gómez Moyano, 2013; Díaz, 2016; Nava Memije, 2016; Miro, 2017; Gil Febres, 2017).

La CVV producida por estas especies es clínicamente indistinguible de la causada por *C. albicans*, no obstante, es importante identificarlas correctamente ya que en los últimos años se observa un aumento en la prevalencia acompañado de resistencia a los antifúngicos utilizados en el tratamiento habitual (García Heredia, 2006; Negroni, 2008; Kenedy, 2010; Marchaim, 2012; Gómez Moyano, 2013; Carrillo Muñoz, 2015; Díaz, 2016; Miro 2017).

#### 1.4.1- Complejo *Candida albicans*

El complejo *C. albicans* está formado por *C. albicans* sensu stricto (*C. albicans* s. s), *Candida dubliniensis* y *Candida africana*. Estas especies de levaduras son indistinguibles por métodos de identificación fenotípica ya que comparten las mismas características morfo-fisiológicas, por lo tanto, la identificación definitiva se realiza mediante estudios de ADN o por espectrometría de masas (MALDI-TOF). (Taverna, 2019).

*C. albicans* s. s es el principal agente etiológico de la CVV, mientras que *C. dubliniensis* y *C. africana* se presentan en muy baja frecuencia (0,2-2 %) (Hazirolan, 2017; Naeimi, 2018; Hashemi, 2019).





## INTRODUCCION

Además de la formación de blastoconidios, *C. albicans* s. s puede formar estructuras características de su micelio vegetativo tales como pseudohifas e incluso hifas verdaderas y clamidoconidios, estas estructuras no están presentes en *C. africana*.

En la **Tabla 1** se muestran las principales características de las especies del complejo *C. albicans* (Kurtzman, 2011).

6

**Tabla 1.** Características morfo-fisiológicas de las especies del complejo *C. albicans*

	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida africana</i>
Características	CBS 562	CBS 7987	CBS 8781
Crecimiento (37 °C)	+	+	+
SDA + cicloheximida (25 °C)	+	+	+
SDA (37 °C)	+	+	+
YPD (30 °C)	+	+	+
YPD (42 °C)	+	V	-
Agar tabaco (pigmento marrón)	-	+	-
Tubos germinales	+	+	+
Ureasa (25 °C)	-	-	-
Ascosporas	-	-	-
Clamidosporas	+	+++	-
Pseudohifas	+	+	-

SDA: Agar Sabouraud dextrosa; YPD: extracto de levadura, peptona, dextrosa; V: variable



## INTRODUCCION

*C. albicans* s.s forma parte de la biota mucocutánea gastrointestinal y genitourinaria, se comporta como oportunista, y según las condiciones predisponentes del hospedero puede comportarse como patógeno (De la Calle Rodriguez, 2012).

En la actualidad, los conocimientos adquiridos sobre el comportamiento de este hongo, sus factores de virulencia y las respuestas inmunológicas de parte del hospedero han permitido comprender los mecanismos de acción en las distintas micosis que produce (Miro, 2017).

7

### 1.4.1.1.- Factores de virulencia

La manifestación de factores de virulencia durante los procesos de invasión e infección tisular se evidencian con distintos eventos relacionados con la morfogénesis y la expresión de moléculas, entre otros (Miro, 2017).

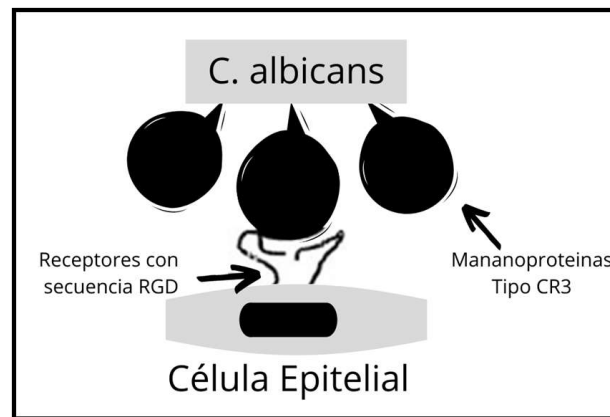
A continuación, mencionamos brevemente los principales factores de virulencia.

#### 1.4.1.1.a- Cambio de la fase levaduriforme a fase hifal

La transición de la fase de levadura a la fase hifal (dimorfismo) es considerado como el factor de virulencia más importante de *C. albicans* y está regulado por genes que codifican para distintos factores que permiten aumentar la virulencia y la evasión de la respuesta inmune del hospedero (De la Calle Rodriguez, 2012; Miro, 2017).

#### 1.4.1.1.b- Adhesinas

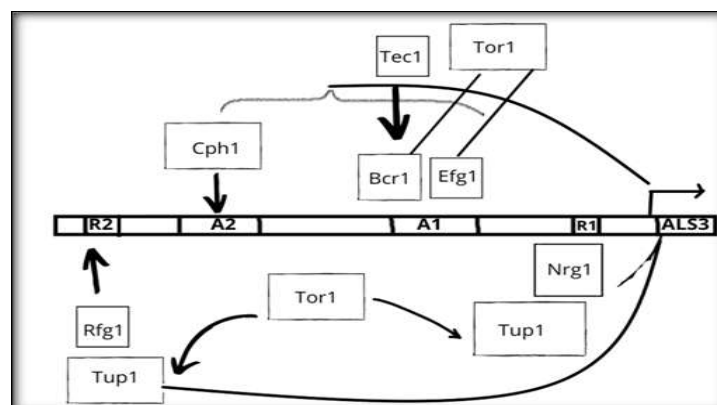
Son biomoléculas que promueven la unión a las células hospederas y a sus ligandos. Existe un grupo de adhesinas codificado por la familia de genes ALS (Agglutinin - Like Sequence), en particular la ALS3, que transcriben ocho proteínas de la superficie celular ligado a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que facilitan la adherencia del hongo a las células epiteliales e induce la endocitosis del organismo (Panizo, 2001; Kumamoto, 2005; De la calle Rodriguez, 2012; Miro, 2017). **(Figura 1).**



**Figura 1.** Proteínas de superficie de *Candida albicans* tipo CR3 reconocen secuencias de aminoácidos (Arginina- Glicina- Aspartato) RGD en células epiteliales. (Fuente: Panizo, 2001)

La expresión de la proteína Als3 está regulada principalmente a nivel transcripcional. ALS3 es un gen específico de hifas y pseudohifas de *C. albicans*, pero no por los organismos en fase de levadura (Argimon, 2007; Liu, 2011).

El análisis del promotor ALS3 revela que contiene dos regiones de represión (R1 y R2) y dos regiones de activación (A1 y A2) (**Figura 2**). (Liu, 2011; De la Calle Rodriguez, 2012).



**Figura 2.** Diagrama de la regulación transcripcional de la expresión de ALS3. A1 y A2 son regiones de activación en el promotor de ALS3, y R1 y R2 son regiones represoras. (Liu, 2011)

Por lo tanto, a estas regiones reguladoras se les pueden unir factores de transcripción que activen o inhiban la expresión del ALS3. Bastidas *et. al* (2009) encontraron que la expresión de ALS3 es inhibida bajo condiciones de alta



## INTRODUCCION

disponibilidad de nutrientes. Esta inhibición ocurre principalmente través de la proteína quinasa Tor1, la cual induce la expresión Nrg1 y Tup1 (implicados en las regiones de represión) mientras reprime la expresión de Efg1 y Bcr1 (implicados en las regiones de activación (Bastidas, 2009; Liu, 2011).

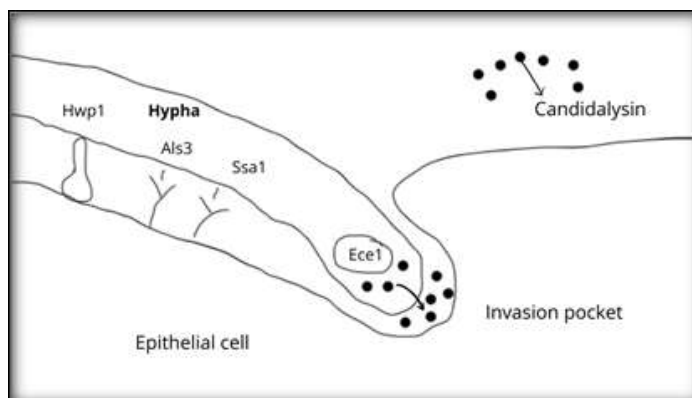
### 1.4.1.1.c- Enzimas hidrolíticas

La producción de enzimas hidrolíticas, entre las que se destacan proteinasas (secretory aspartyl proteinases - Sap) y fosfolipasas (PL), se encuentra entre los factores más importantes de virulencia de *C. albicans* (Blanco, 2010, Miro 2017).

Estas enzimas hidrolizan proteínas y fosfolípidos de la membrana celular del hospedero favoreciendo la invasión a los tejidos (**Figura 3**) (Hernández-Solís, 2014).

La expresión de las Sap puede ser regulada por cambios en el microambiente como el pH, la presencia de un determinado morfotipo y la etapa del proceso infeccioso (De la Calle Rodriguez, 2012; Alburquenque, 2013; Pietrella, 2013; Miro, 2017, Lima, 2018).

En la **Figura 3** se observa la relación hifa –célula epitelial, los receptores de membrana de la célula se unen a invasinas Hwp1, y adhesinas ALs3 y Ssa1 de la hifa, que favorecen la adhesión y absorción por parte de la célula epitelial. La hifa también secreta la proteína Ece1 como péptidos cortos, solo uno de ellos, la candidalísina presenta actividad citolítica y se acumula en el espacio de invasión intoxicándolo y causando disrupción de la barrera epitelial y modulación de la respuesta inmune. (Moyes, 2016; Mitchell, 2016).



**Figura 3.** Relación hifa – célula huésped (Mitchell, 2016)

La invasión de los tejidos por parte de *C. albicans* ocurre a través de una invasión tisular activa o por endocitosis pasiva inducida, favorecida por la Als3 de la levadura que simula acciones de proteínas de las células epiteliales (Alburquenque, 2013).

Las células epiteliales son la barrera física frente a los microorganismos y, a través de señales que activarían la respuesta inmune, deben diferenciar si su comportamiento es de comensal (blastoconidios) o invasivo (hifas); a su vez, *C. albicans* puede evadir esta respuesta. La invasión del microorganismo o su eliminación por parte del hospedero dependerá de la interrelación entre ambos (Alburquenque, 2013).

#### **1.4.1.1.d- Formación de biopelículas**

Las biopelículas son estructuras conformadas por levaduras e hifas (en el caso de *C. albicans*), dentro de una matriz extracelular compuesta por exopolisacáridos. Para su formación es necesario que las levaduras se unan a superficies vivas o inertes: látex, silicona o plástico por medio de adhesinas, que empiecen a formar tubos germinales, que se adhieran fuertemente a las células endoteliales y finalmente, que originen hifas, las cuales maduran dentro de la matriz extracelular, se produce captura eficiente de nutrientes, aumento de su tolerancia a agentes químicos, físicos o biológicos. Esta comunidad microbiana sobrevive a condiciones críticas. (De la Calle Rodriguez, 2012; Brand, 2012; del Pozo, 2016).



## INTRODUCCION

La biopelícula otorga a *Candida* características que aumentan su patogenicidad:

- a) Dificulta la penetración de los fármacos antifúngicos, lo que le proporciona resistencia.
- b) Modifica la interacción entre el hongo y la célula epitelial, esto impide el adecuado reconocimiento y activación de los mecanismos innatos y la respuesta inflamatoria del hospedero.
- c) Vuelve ineficientes los mecanismos inmunes de defensa y evade así, la respuesta del hospedero (Castrillon Rivera, 2013).

La adhesina Als3 de *C. albicans* es la que comienza el proceso, de allí su importancia para trabajar en búsqueda de una vacuna que ejerza su actividad sobre su mecanismo de acción (Liu, 2011).

### 1.4.2.- Complejo *Candida glabrata*

Las levaduras del complejo *C. glabrata* son responsables del 10-30 % de todas las infecciones por *Candida*, es considerada un patógeno oportunista causante de infecciones comunitarias y nosocomiales (Guinea, 2014; Giri, 2014; Torres Rodríguez, 2015; Carrillo Muñoz, 2015).

*C. glabrata* (Meyer y Yarrow, 1978) es la especie-tipo, en 1917 fue nominada por Anderson como *Cryptococcus glabratus*, luego en 1938 Lodder y De Vries la reclasificaron como *Torulopsis glabrata*.

Se la describe como una levadura productora de colonias lisas de consistencia blanda y de color crema, constituidas por células de 2,5-5  $\mu\text{m}$  X 3,5-4,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Presentan formas individuales ovoides, incapaces de formar pseudohifas o pseudomicelio o, como máximo, pueden formar una cadena corta de levaduras ovoides. La gemación es multilateral, no produce cápsula ni artrosporas, y tampoco se han descrito esporas sexuales. Se trata de una levadura haploide, a diferencia de *C. albicans* (Torres Rodriguez, 2015; Carrillo Muñoz, 2015; Tam, 2015).

*C. glabrata* forma parte de la biota comensal del tracto gastrointestinal de las personas. En la actualidad y gracias a los estudios moleculares se conoce



## INTRODUCCION

que *C. glabrata* forma parte del complejo *C. glabrata* formado por tres especies crípticas, que son indistinguibles por su fenotipo: *C. glabrata* sensu stricto (*C. glabrata* s. s.), *Candida bracarensis* y *Candida nivariensis*, y junto *Nakaseomyces delphensis*, integran el “grupo *glabrata*” (Gabaldon, 2013; Angoulvant, 2016; Espinosa Pérez, 2017). Las especies del “grupo *glabrata*”, a excepción de *N. delphensis* son patógenas para el ser humano.

Si bien no se conoce con precisión si *C. bracarensis* y *C. nivariensis* comparten el mismo hábitat, de acuerdo a los reportes en la bibliografía, las tres especies del complejo *C. glabrata* compartirían los mismos nichos colonizando las mucosas del aparato digestivo y genital (Angoulvant, 2016).

En la **Tabla 2** se resumen las características del complejo *C. glabrata*.

**Tabla 2.** Principales características fisiológicas de las especies del complejo *C. glabrata* (Angoulvant, 2016).

Característica	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida nivariensis</i>	<i>Candida bracarensis</i>
	CBS 138	CBS 9983	CBS 10154
Crecimiento (37 °C)	-	-	-
SDA + cicloheximida (25 °C)	-	-	+
SDA (37 °C)	+	+	+
YPD (30 °C)	+	+	+
YPD (45 °C)	-	-	-
Turbidez en YPD (37 °C)	+	-	-
Tubos germinales	-	-	-
Ureasa (25 °C)	-	-	-
Ascosporas	-	-	-
Clamidosporas	-	-	-
Pseudohifas	-	-	-

SDA: Agar Sabouraud dextrosa; YPD: extracto de levadura, peptona, dextrosa



### 1.4.2.1.- Epidemiología del complejo *C. glabrata*

La incidencia de *C. glabrata* s.s. es más frecuente en adultos mayores de 60 años, y es infrecuente en recién nacidos. Los factores de riesgo predisponentes en pacientes que sufren infecciones por *C. glabrata* s. s. son los tiempos prolongados de hospitalización, el uso de antimicrobianos de amplio espectro, trasplantes de órgano sólido y enfermedades oncohematológicas (Diekema, 2012). *C. glabrata* s. s ocupa el segundo lugar (8-11 %) después de *C. albicans* s.s como agente etiológico de CVV (Arroyo Fajardo, 2017)

Estas levaduras despiertan interés porque suelen presentar resistencia *in vitro -in vivo* frente a los azoles, considerados los agentes antifúngicos más empleados en el tratamiento de las infecciones por levaduras. (Tscherner, 2011; Torres Rodriguez, 2015).

### 1.4.2.2.- Factores de virulencia de *C. glabrata*

El genoma de *C. glabrata* contiene una familia de 17-23 genes EPA, que codifican para el glicosilfosfatidilinositol (GPI), responsables de la adherencia al epitelio humano y a los macrófagos. Estos genes también han sido descritos, aunque en menor cantidad, en *C. bracarensis* (12 genes) y en *C. nivariensis* (9 genes) (Bialková, 2006; Rodríguez, 2014).

*C. glabrata* s. s. no produce proteasas extracelulares, aunque ese no es un factor limitante, pues posee otras hidrolasas como las fosfolipasas que le permiten el paso a través de la membrana de la célula huésped. *C. glabrata* s. s. además hidroliza enlaces tipo éster en los glicerofosfolípidos, una molécula común de las membranas celulares humanas. Otro factor de virulencia de *C. glabrata* es la capacidad de producir y liberar hemolisinas, importantes para la incorporación de hierro (Tam, 2015).

Además, puede colonizar diferentes nichos en el hospedador y para sobrevivir y proliferar utiliza numerosos mecanismos que le permiten adaptarse y desarrollar su actividad como patógeno. Entre los mecanismos se destaca la capacidad de mantener la hambruna a largo plazo de carbono y hierro luego de la fagocitosis por los macrófagos, mecanismos enzimáticos para escape de fagolisosomas y una alta tolerancia al estrés nitrosativo y oxidativo. Este estrés





## INTRODUCCION

se plantea por desafío con medicamentos antimicóticos, como también por interacciones competitivas con otros microorganismos. (Kołaczowska, 2016).

Con respecto a la capacidad de formar biopelículas *C. glabrata*, al contrario que *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, no forma filamentos, por lo que sus biopelículas están formadas por grupos de células levaduriformes embebidas en la matriz extracelular, con menor biomasa y actividad metabólica que las otras especies. La matriz extracelular contiene elevada cantidad de proteínas (Del Pozo, 2016).

Además de *C. albicans* s.s y *C. glabrata* s.s otras especies de levaduras pueden causar CVV, aunque en muy baja frecuencia.

En la **Tabla 3** se muestran las características generales de levaduras no-*Candida albicans* implicadas como posibles agentes etiológicos (Kołaczowska, 2016).

**Tabla 3.** Características generales de las especies no-*C. albicans* (Kołaczowska, 2016)

Característica	Especies		
	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Ploidia	Haploide	Diploide	Diploide
Factores de virulencia			
Adhesinas	Familia de la EPA	Familia tipo ALS	Familia tipo ALS
Hifas/pseudohifas	Ausente *	Pseudohifas	Hifas/pseudohifas
Capacidad de formar biopelículas/forma	Moderado/células esféricas agrupadas	Alto/menos estructurado, monocapa o multicapa	Monocapa alta/compacta
Principales reguladores de biopelículas	Bcr1	Bcr1, Cph2	Bcr1
Proteasas secretadas	Ausente	SAPP1-3	SAPT1-4



## INTRODUCCION

Resistencia a las drogas	Resistencia natural/adquirida frente a los azoles	Aumento de la resistencia a las equinocandinas,	Resistencia natural a la flucitosina, resistencia adquirida al fluconazol, resistencia adquirida a las equinocandinas
--------------------------	---	---	---

### 2.- Candidiasis vulvovaginal recidivante/ recurrente

La CVVR se define como la ocurrencia de cuatro o más episodios de CVV en un mismo año. (Sobel, 2016; Donders, 2017).

La patogénesis de la CVVR es multifactorial e incluye entre otros, factores genéticos (predisposición hereditaria), hormonales (diabetes no controlada), de comportamiento (uso de determinados anticonceptivos), conductas sexuales, etc. (Sobel, 2016).

En trabajos recientes se investiga la posible relación entre la CVVR con mutaciones o defectos en el sistema inmune de las pacientes. Es posible que la presencia de mutaciones puntuales en el receptor tipo Toll 2 (TLR2) y los polimorfismos en el gen del inflammasoma NLRP3 sean las responsables de generar mayor predisposición a padecer CVVR (Sobel, 2016; Miro, 2017).

La prevalencia de esta patología se desconoce por no ser de denuncia obligatoria y porque además se ve enmascarada por errores de diagnóstico (Tapia, 2012), no hay datos sobre la frecuencia de casos complicados, pero la coexistencia con vaginosis bacteriana inespecífica ha crecido en los últimos años (Ardizoli, 2018).

### 3.- Tratamiento de la candidiasis vulvovaginal

El tratamiento de las micosis vaginales ha sufrido una necesaria evolución, desde los antifúngicos considerados de "primera generación", derivados de productos naturales o también de la actividad metabólica de determinados microorganismos, hasta los de "segunda generación", en los que predomina la síntesis química.

El tratamiento de la CVV depende en gran medida de las características del cuadro clínico (intensidad de los síntomas, frecuencia de los episodios), la presencia de factores de riesgo difícilmente corregibles (inmunodepresión,



## INTRODUCCION

déficits congénitos, diabetes mellitus, entre otros) y el tipo de *Candida* responsable de la infección (especies no-*C. albicans*) (García Heredia, 2006; Negroni, 2008; Alsina, 2016).

En la actualidad existen distintas guías para el manejo terapéutico cuyas recomendaciones surgen de numerosos trabajos multidisciplinarios.

En las guías de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas 2016 (por sus siglas en inglés IDSA) se recomienda el tratamiento tópico para los episodios de CVV no complicados, o bien el uso de una dosis única de 150 mg de fluconazol vía oral. Mientras que para las formas más severas recomiendan 150 mg de fluconazol cada 72 h durante 10 días. (Pappas, 2016).

Para *C. glabrata* es tratamiento indicado es con nistatina local, a razón de 1 óvulo o supositorio vaginal (100000 U) cada 24 h durante 14 días (Pappas, 2016; Ardizzoli, 2018).

Por su parte, la Guía Europea Internacional para el Manejo del Flujo Vaginal (por sus siglas en inglés IUST/WHO) propone un esquema similar de tratamiento y agrega el uso de 200 mg de itraconazol cada 12 h/1 día. Además, incluye el uso de una dosis única de tabletas vaginales de 500 mg de clotrimazol o 200 mg por día durante 3 días, una dosis única de óvulos vaginales de 1200 mg de miconazol, o 400 mg durante 3 días. (Sherrard, 2018).

Ambas guías coinciden en que no debe administrarse tratamiento oral con fluconazol en embarazadas, en estas pacientes, el uso de drogas antifúngicas debe ser estrictamente controlado debido a la toxicidad de los fármacos, los que pueden absorberse vía local (García Heredia, 2006).

En Argentina, el tratamiento recomendado en las formas agudas es:

- Tratamientos locales:
  - Nistatina 100.000 U, óvulos y tabletas vaginales x 6 a 14 unidades (en Argentina envases de 6 y 12).
  - Imidazoles diversos clotrimazol, miconazol y ketoconazol en óvulos y cremas.
  - Triazoles isoconazol (óvulos de 600 mg para monodosis).
  - Ciclopiroxolamina (sólo crema).
  - Tratamientos de 7 a 14 días y aplicación de cremas en la vulva por igual lapso.

○ Tratamientos sistémicos:



## INTRODUCCION

□ Triazoles: fluconazol cápsulas o comprimidos 150 mg o 200 mg, 3 tomas en 7 días; itraconazol cápsulas 200 mg por toma después de comer, 3 veces en 7 días. (Ardizolli, 2018.)

Para las formas agudas debidas a *C. glabrata* y *C. krusei*

- *C. glabrata*: supositorios vaginales de ácido bórico 600 mg x 14 días, no existe como tal en el comercio de nuestro país, solo recetas magistrales, nistatina 100.000 U tabletas vaginales x 14 días, cremas vaginales de ciclopiroxolamina, fluconazol 800 mg/día durante 2 a 3 semanas, difícil de aceptar en nuestro medio, por el costo y los prejuicios.
- *C. krusei*: esta especie es resistente a los triazoles, pero pueden indicarse los imidazoles: clotrimazol en óvulos por 6 días, voriconazol oral a razón de 400 mg/día durante 5 días. Costo muy elevado para nuestro mercado.
  - Tratamientos de formas complicadas con vaginosis bacteriana: óvulos con nistatina y metronidazol x 10 unidades, cápsulas vaginales con ketoconazol y clindamicina x 7 unidades.
  - Formas recurrentes: no hay tratamientos para corregir los defectos inmunitarios, sólo se aplican tratamientos antifúngicos sistémicos durante lapsos prolongados (Ardizzolli, 2018).

A pesar de contar con distintas drogas antifúngicas para tratar la CVV, no siempre son efectivas, y la búsqueda de nuevas moléculas es un área de investigación en expansión. En este sentido, el uso de productos naturales obtenidos de plantas se presenta como una alternativa potencial, ya que en distintos estudios se evidencia menor toxicidad y en algunos casos, actividad antifúngica de amplio espectro.

Asimismo, el uso de probióticos es objeto de estudio con el fin de demostrar utilidad en el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas y en mucosas.

El probiótico más estudiado en infecciones fúngicas es *Lactobacillus*, capaz de inhibir el crecimiento de *C. albicans* en estudios *in vitro* (Ferris, 2002).

Desafortunadamente los resultados se limitan a experiencias *in vitro*, pero no hay experiencias clínicas que evidencien la utilidad de estos compuestos (Sánchez-Martín, 2019).



#### 4. Inmunidad innata y *C. albicans*

El sistema inmunitario inicia y modula la respuesta inmune adaptativa mediada por células (linfocitos) T y B que interactúan con células presentadoras de antígeno, tales como las células dendríticas (Netea, 2008).

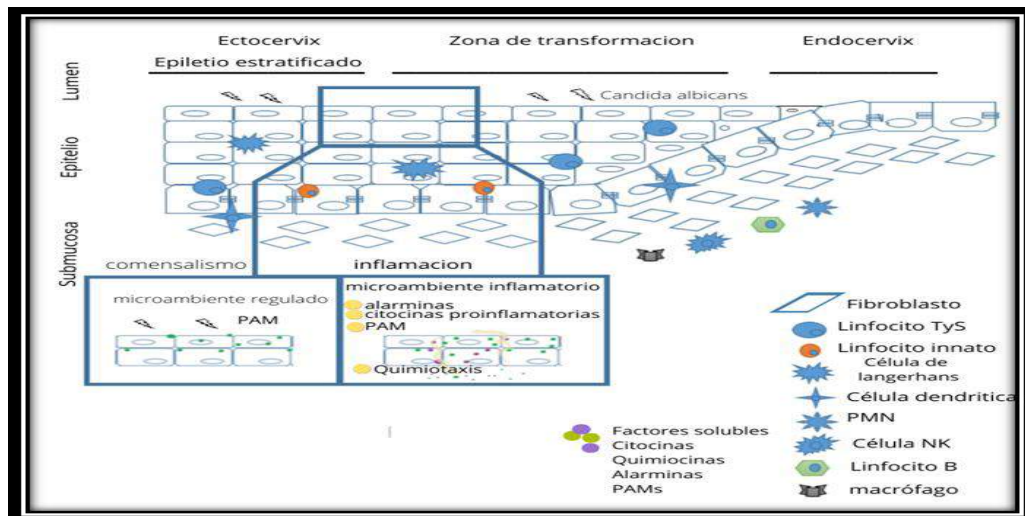
Los tipos celulares que participan en la inmunidad innata frente a *C. albicans* son las células epiteliales y las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos-macrófagos y células dendríticas). En el reclutamiento y activación de estas últimas, participan diversas citoquinas proinflamatorias y además hay factores solubles involucrados como el sistema de complemento y anticuerpos.

Se ha descrito que células epiteliales orales y vaginales pueden inhibir el crecimiento de *C. albicans* de manera contacto-dependiente. Aunque las citoquinas proinflamatorias producidas por las células epiteliales, no tienen un efecto antifúngico directo, éstas sirven como señales para las células inflamatorias de las mucosas para potenciar su función antifúngica. El reconocimiento de *C. albicans* en su estado patogénico para activar una respuesta por parte del hospedero se realiza a través de receptores (pattern recognition receptors, PRRs), que reconocen estructuras conservadas llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen associated molecular patterns, PAMP) de *Candida* (Alburquenque, 2013; Miro, 2017).

Las células epiteliales secretan mediadores solubles como alarminas, péptidos antimicrobianos, quimiocinas y citocinas como la IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, y el TNF $\alpha$ , que están involucrados activamente en la fase inicial de la respuesta inmunitaria y contribuyen al reclutamiento de otras poblaciones celulares. Además, poseen la capacidad de discriminar entre la forma saprofítica de *C. albicans* y su transición a la fase micelial; de esta manera, la forma levaduriforme es tolerada y la emisión de la pseudohifa es considerada una señal de peligro ante la cual la CE inicia la respuesta inflamatoria local.

La liberación de alarminas e IL-8 favorecen el infiltrado de PMN y contribuyen a la aparición de síntomas en la CVV. De esta manera la colonización asintomática vaginal ocurre en ausencia de respuesta inflamatoria,

mientras que la forma sintomática está acompañada de un abundante infiltrado de PMN (Miro, 2017). (**Figura 4**).



**Figura 4.** Respuesta inmune innata local en el tracto genital femenino. Esquema del tracto genital femenino que ilustra la ubicación de las diferentes poblaciones celulares. En condiciones de homeostasis el microambiente local se encuentra finamente regulado con concentraciones aumentadas de citocinas antiinflamatorias y péptidos antimicrobianos (PAM) de expresión constitutiva; *Candida albicans* se encuentra en su estado comensal. La ruptura de este estado de equilibrio debido a la presencia de factores predisponentes o defectos genéticos favorece la morfogénesis fúngica, la expresión de factores de virulencia y el establecimiento de la infección. La liberación de alarminas, PAM, sustancias quimiotácticas y citocinas generan un microambiente inflamatorio con infiltrado celular que, en su conjunto, determinan la aparición de los síntomas de la enfermedad. (**Figura tomada literalmente de Miro, 2017**)

En estudios efectuados en pacientes con CVV en los que se estableció grados de inflamación, se observó una correlación positiva entre la presencia de PMN y la carga fúngica vaginal (Peters, 2014).

En este escenario, la contribución del PMN está relacionada con la respuesta inflamatoria local más que con su rol de célula efectora fungicida (Peters, 2014; Miro, 2017).

La transición de levadura a hifa y la producción de factores de virulencia causan la disrupción epitelial, lo que provoca como respuesta el reclutamiento de PMN, que contribuyen a la exacerbación del fenómeno (Filler, 2012; Miro, 2017).



## 5.- Vacunas propuestas para CVV

### -Vacuna NDV-3A

En los últimos años distintos investigadores se abocaron al diseño de una vacuna que pueda ser de utilidad para la prevención de la CVV y tomaron como target a la adhesina Als3-p por su rol en los procesos de adherencia e invasión tisular en la célula hospedadora (Ibrahim, 2013; Sui, 2017).

Como resultado de las investigaciones se logró diseñar a la vacuna NDV-3 formada por la porción N-terminal de la adhesina Als3-p de *C. albicans* más el agregado de hidróxido de aluminio en solución salina tamponada con fosfato.

Schmidt *et al*, probaron en ratones el uso de la vacuna NDV-3 y comprobó que fue capaz de protegerlos contra CVV, candidiasis sistémica y orofaríngea luego del desafío por vía intravenosa con *C. albicans* y otras especies de *Candida*. Luego, la vacuna NDV-3 se probó en 40 voluntarios humanos y los resultados fueron promisorios, la vacuna fue bien tolerada, los pacientes presentaron escasos efectos adversos, alcanzaron títulos de IgG anti-Als3-p e Ig A a los 14 días pos vacunación con 100 % de seroconversión. De acuerdo a los datos de estos ensayos *in vivo*, los anticuerpos que generaron los individuos vacunados con NDV-3 promovieron la opsonofagocitosis de *C. albicans* y además bloquearon su adherencia, invasión y lesión tisular (Schmidt, 2012).

En un trabajo reciente realizado por Edwards *et al*, en el que utilizó la vacuna NDV-3 en 188 mujeres con CVVR, la vacuna resultó segura, inocua y generó respuestas inmunitarias rápidas y robustas de células B y T. Asimismo, se observó un aumento significativo en el porcentaje de pacientes que no presentaron síntomas 12 meses pos vacunación. (Edwards, 2018).

## 6.- Antifúngicos

Los antifúngicos son compuestos naturales o sintéticos, con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción que pueden producir modificaciones en estructuras básicas de la célula fúngica inhibiendo su desarrollo y alterando su viabilidad (Fuentes, 2014).



La clasificación de los antifúngicos se realiza según:

- Estructura: polienos, azoles, alilaminas, lipopéptidos, derivados de la morfolina, piridona, benzofurano, tiocarbamato.
- Origen: producidos por organismos vivos, derivados de síntesis química.
- Espectro de acción (amplio o restringido).
- Mecanismo de acción (fungistáticos y fungicidas).
- Vía de administración oral o parenteral, tópicos o sistémicos.
- Toxicidad y selectividad de acción.

### 6.1- Clasificación de los antifúngicos según su diana de acción

En general, el diseño, producción y validación de las moléculas antifúngicas se realizó teniendo en cuenta los potenciales sitios blancos presentes en la célula fúngica. Algunos antifúngicos tienen como diana al ergosterol y actúan sobre la membrana (polienos, alilaminas y azoles), otros sobre la pared fúngica (equinocandinas), y sobre el núcleo (antimetabolitos, flucitosina). **(Figura 6)**.

#### 6.1.1- Antifúngicos que tienen como diana al ergosterol.

##### 6.1.1.1.- Azoles

Los azoles constituyen una de las familias más numerosas, en general son de amplio espectro.

El mecanismo de acción de los azoles se centra en la inhibición de la enzima  $14\text{-}\alpha$ -esterol desmetilasa, así provocan una reducción de la síntesis del ergosterol con acumulación del  $14\text{-}\alpha$ -metilesterol, se interrumpe la formación de las cadenas de fosfolípidos de la membrana, se altera la permeabilidad y se afectan los sistemas enzimáticos de membrana, ocurre la inhibición del crecimiento (Lorenzo, 2008; Ruiz Quiroz, 2013).

Existen distintas familias de azoles clasificadas de acuerdo a su composición.

##### 6.1.1.1.a- Derivados imidazólicos

Incluye al ketoconazol, el clotrimazol, el miconazol, el econazol, el butoconazol, el oxiconazol, el sertaconazol y el sulconazol. El ketoconazol es





## INTRODUCCION

activo contra hongos dimorfos como *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix* spp. y una gran variedad de dermatofitos, aunque el uso vía sistémica está prohibido por la toxicidad y los efectos colaterales indeseables (Lorenzo, 2008). De este grupo, el clotrimazol es usado en forma local para el tratamiento de la CVV.

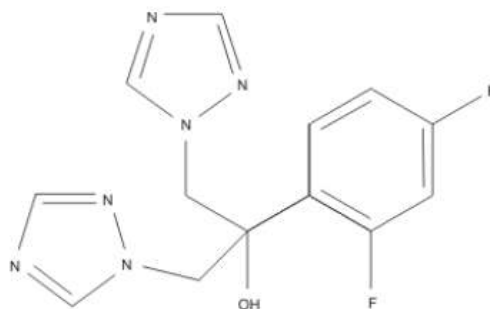
### 6.1.1.1.b- Derivados triazólicos

Los triazoles ampliamente conocidos son el fluconazol y el itraconazol, además son usados comúnmente en el tratamiento de las CVV.

Dentro de los triazoles de segunda generación, se incluye al isavuconazol, el voriconazol, el ravuconazol y el posaconazol. Con excepción del ravuconazol que se discontinuó su uso en humanos por resultar tóxico, estos triazoles cuentan con un amplio espectro y menor toxicidad en comparación con los antifúngicos antiguos más utilizados (Lorenzo, 2008).

#### - Fluconazol

Como otros triazoles, tiene dos anillos que contienen tres átomos de nitrógeno. El anillo bencénico presenta dos átomos de flúor. Es una molécula polar y simétrica lo que favorece su hidrosolubilidad. **(Figura 5).**



**Figura 5.** Estructura química del fluconazol

El fluconazol es el azol mejor tolerado, el menos tóxico, aunque es el antifúngico que genera mayores tasas de resistencia, principalmente en levaduras. Cuando se lo administra vía oral, la biodisponibilidad es alta (92 %), la absorción no se afecta por la ingesta de alimentos, pH gástrico o estado de enfermedad. Su unión a proteínas es baja (10 %), es hidrosoluble y tiene una



## INTRODUCCION

excelente difusión al líquido cefalorraquídeo (80 % de la concentración encontrada en sangre). La difusión a articulaciones, humor vítreo, saliva, secreciones vaginales, es similar o incluso más alta que en el suero. Tiene metabolismo hepático en muy poca cantidad. Su eliminación es renal, y se excreta sin mayores modificaciones, lo cual resulta en concentraciones 10 a 20 veces mayores que las encontradas en sangre. Debe hacerse ajuste de dosis si hay patología renal (Díaz, 2012).

23

### 6.1.1.2.- Polienos

Este grupo incluye a la anfotericina B, la nistatina y la natamicina. El mecanismo de acción de los polienos consiste en la unión al ergosterol de la membrana fúngica, como consecuencia de esa unión se forma un orificio o poro transmembrana, con la consiguiente alteración de la permeabilidad y de la función de barrera osmótica.

La anfotericina B se administra únicamente vía intravenosa y es el polieno de elección para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas debido a su potente actividad y amplio espectro antifúngico.

La nistatina se utiliza en el tratamiento de infecciones mucocutáneas (orales y vaginales) y la natamicina (infecciones oculares), ambos polienos tienen el mismo mecanismo de acción que el de la anfotericina B (Lorenzo, 2008).

### 6.1.2.- Antifúngicos que tienen como blanco a la pared celular fúngica

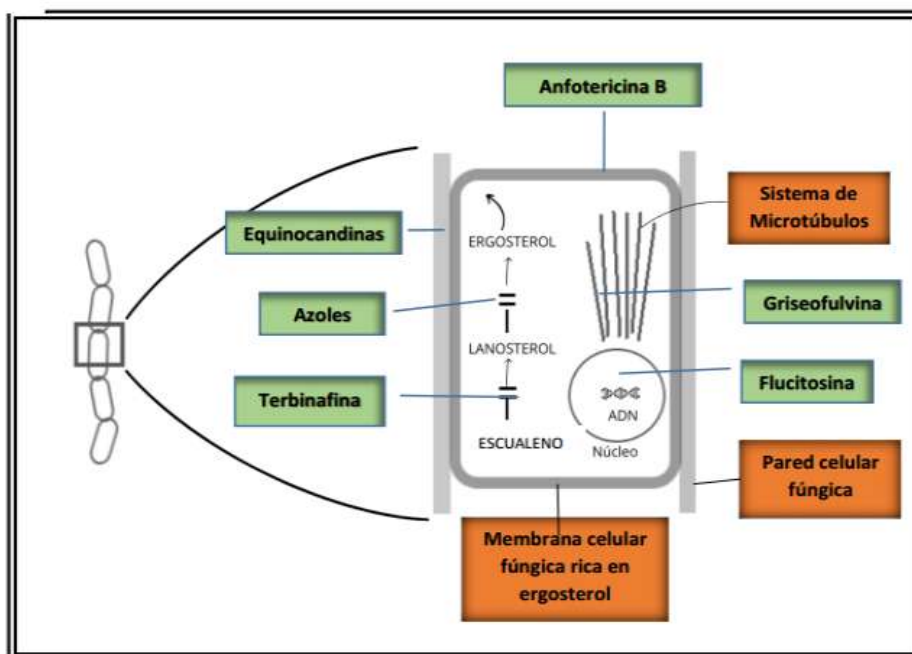
#### 6.1.2.a- Equinocandinas

Las equinocandinas caspofungina, micafungina y anidulafungina comparten el mecanismo de acción al actuar sobre la enzima 1-3  $\beta$ -glucanosintetasa, implicada en la síntesis de pared fúngica.

Las equinocandinas son activas frente a los hongos *Ascomycetes*, entre ellos se incluye a la mayoría de las especies de *Candida* de importancia clínica, así como también frente a *Aspergillus* spp. carecen de actividad frente a los hongos *Basidiomycetes* como *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Malassezia*,

*Trichosporon*, y no deben utilizarse para *Fusarium* sp. y Mucorales. (Zapata Gonzalez, 2012).

Las equinocandinas tienen efectos fungicidas en levaduras y fungistáticos en hongos filamentosos, y la resistencia secundaria a estos antifúngicos es poco común (Cuenca-Estrella, 2010; Dudiuk, 2017). No son antifúngicos indicados para el tratamiento de las CVV.



**Figura 6.** Sitios diana de los antifúngicos

### 7.- Resistencia a los antifúngicos

Durante muchos años, los compuestos antifúngicos fueron escasos y poco efectivos. A partir de 1970, los tratamientos con la griseofulvina y la nistatina para las dermatofitosis de piel lampiña resultaron ser muy eficaces, no así para las onicomiasis. Esta situación mejoró con la aparición del ketoconazol, el itraconazol y el fluconazol. A partir de mediados del siglo pasado, la comercialización de la anfotericina B, aunque tóxica, ayudó de manera importante en el tratamiento de micosis sistémicas.

La década de 1980 marcó un hito en el campo de la Salud, principalmente por la aparición de la pandemia del sida, y con ella, la emergencia de hongos



## INTRODUCCION

potencialmente patógenos, muchos de los cuales desarrollaron mecanismos de resistencia frente a los antifúngicos.

Por otra parte, en las últimas décadas se produjo un avance significativo en la implementación y desarrollo de técnicas invasoras de diagnóstico y tratamiento, en los trasplantes de órganos, así como el uso indiscriminado de drogas esteroides, inmunosupresores. En paralelo a estos avances comenzaron a detectarse los primeros casos de falla terapéutica (Kolaczowska, 2016).

Es importante remarcar que la falla terapéutica es un acontecimiento multifactorial, que puede ser atribuido, en parte, a distintos estados de deficiencia inmunológica del paciente, a la baja biodisponibilidad de los antimicóticos o bien, alteraciones en el metabolismo de los antifúngicos (como el síndrome de mala absorción).

Por otro lado, las interacciones medicamentosas y la resistencia a los antifúngicos primaria o secundaria, son una parte del problema que lleva a la implementación de nuevos tratamientos con un aumento considerable en los costos de salud (Allevato, 2007; Mendez Tovar, 2007; Manzano-Gayosso, 2008; Garcia Cortés, 2012; Castrillon Rivera, 2013; Ortigoza-Medrano, 2014, Sobel, 2018)

Desde el punto de vista clínico se considera tanto la resistencia epidemiológica como la resistencia clínica, ya que el éxito en el tratamiento de las infecciones fúngicas no solo depende de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antifúngico, sino también del hospedero (Pontón, 2006; Méndez Tovar, 2007; Tapia, 2012; Gutiérrez Martínez, 2012; Córdoba, 2018).

Por lo tanto, es necesario considerar los siguientes conceptos:

**7.1- Resistencia microbiológica:** una cepa es resistente a un antifúngico cuando su CIM es más elevada que los puntos de corte para esa especie (Pontón, 2006; Tapia, 2012; Córdoba, 2018).

Se consideran tres tipos de resistencia microbiológica:

1-Resistencia intrínseca: cuando ningún miembro de una especie es sensible a un antifúngico. Se dice insensible, ya que abarca a toda la especie y no solo a alguno de sus miembros. Ej.: *C. krusei* y *Aspergillus* spp. frente al fluconazol (Pontón, 2006; Manzano-Gayosso, 2008; Tapia, 2012; Córdoba, 2018).



## INTRODUCCION

2-Resistencia primaria: cuando una cepa perteneciente a una especie normalmente sensible al antifúngico, posee una resistencia natural al mismo sin haber estado en contacto con el compuesto. Ej: *C. albicans* y fluconazol o a flucitosina (Pontón, 2006; Manzano-Gayosso, 2008; Tapia, 2012; Córdoba, 2018).

3-Resistencia secundaria: cuando una cepa previamente sensible adquiere resistencia al compuesto tras haber entrado en contacto con él. Ej: *C. glabrata* y fluconazol (Pontón, 2006; Manzano-Gayosso, 2008; Tapia, 2012; Córdoba, 2018).

26

**7.2.- Resistencia clínica:** un hongo es resistente a un antifúngico cuando continúa creciendo y produciendo sintomatología a pesar de que la concentración de fármaco es máxima en el lugar de infección, el paciente generalmente presenta compromiso grave de la respuesta inmune y aunque se le administren fármacos, su sistema inmune no va a ser capaz de eliminar el patógeno (Pontón, 2006; Manzano-Gayosso, 2008; Tapia, 2012; Córdoba, 2018).

### 8.- Métodos de evaluación de sensibilidad/resistencia

Las pruebas de sensibilidad tienen como finalidad conocer si los microorganismos ensayados son sensibles o resistentes a los antimicrobianos. Es importante recordar que las condiciones de realización de estas pruebas son artificiales y a pesar de ser controladas y estandarizadas, no llegan a reproducir lo que ocurre durante la interacción entre un microorganismo/antimicrobiano en el organismo de las personas o de los animales (Córdoba, 2018).

En la actualidad, el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) son los organismos encargados de diseñar, desarrollar y estandarizar los métodos de referencia para evaluar la sensibilidad *in vitro* de levaduras y hongos miceliales frente a los antifúngicos.

De esta manera es posible determinar, *in vitro*, cual es la CIM de los antifúngicos capaz de inhibir el desarrollo de los microorganismos al compararlos con el control de crecimiento. Así, al conocer el perfil de sensibilidad de los microorganismos en estudio es posible colaborar con la elección del tratamiento



## INTRODUCCION

más adecuado y más eficaz. Además, los estudios de vigilancia local y regional son fundamentales para monitorear la aparición de resistencia en las cepas circulantes en la región (Díaz, 2005; Pfaller, 2012, Córdoba, 2018).

Para las levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus neoformans* existen los documentos M27-4ta ed (CLSI, 2017) y el EDef. 7.3.2 del EUCAST (EUCAST, 2020) que basan la técnica en la dilución en caldo, mientras que el documento M44-A3 del CLSI (CLSI, 2018) es el estándar para difusión en agar. Estos métodos de referencia son equiparables, equivalentes y comparables, los resultados que se obtienen son robustos, confiables y pueden ser usados como guía para la elección del tratamiento más adecuado. En la **Tabla 4** se resumen las principales características de los métodos de referencia por dilución en caldo.

27

**Tabla 4.** Características de los métodos de referencia

Parámetro	CLSI	EUCAST
Medio	RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato y concentración de glucosa de 0,2 %	RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato y concentración de glucosa de 2 %
Densidad del inóculo	0,5-2,5 x10 <sup>3</sup> ufc/ml	1-5x10 <sup>3</sup> ufc/ml
Lectura	Visual	Espectrofotométrica
Punto final para la lectura de la CIM de anfotericina B	Ópticamente transparente y con evidente disminución.	Concentración más baja que inhibe el crecimiento al menos en 90 %
Punto final para la lectura de CIM de azoles y equinocandinas	Evidente disminución	Concentración más baja que inhibe el crecimiento al menos en 50 %
Tiempo de incubación	48 h	24 h
Forma del pocillo en la placa	Redondo	Plano

Modificado de referencias 6,11,13.

### 8.1 Pruebas de sensibilidad en medio líquido y en medio sólido (Zapata-González, 2012)

Existen distintos procedimientos para determinar la sensibilidad de los microorganismos frente a los antimicrobianos. A continuación, se describen someramente los utilizados en la práctica diaria:



### 8.1.1.- Dilución en caldo

El ensayo se realiza en medio líquido y consiste en enfrentar un inóculo estandarizado del microorganismo en estudio frente a distintas concentraciones de un determinado antifúngico. Luego de la incubación en tiempo y temperatura adecuada se lee, se determina cual es la concentración del antimicrobiano que produce la inhibición del crecimiento del microorganismo al compararlo con un control y el resultado se interpreta como valor de la CIM, generalmente expresado en  $\mu\text{g/mL}$

### 8.1.2.- Difusión en agar

El ensayo se realiza en medio sólido, se inocula el microorganismo sobre la superficie del agar. El reservorio puede ser disco, tableta o tiras embebidos en concentraciones pre establecidas del antifúngico a evaluar. Luego de la incubación a temperatura y tiempo adecuados, en caso de ocurrir la interacción, se produce una zona de inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor del reservorio. Los resultados se expresan en milímetros (discos, tabletas) o en  $\mu\text{g/mL}$  (tiras). Dependiendo del tamaño de la zona, se puede determinar si el microorganismo es sensible, intermedio, o resistente al antimicrobiano.

## 8.2. Métodos comerciales:

Existen en el mercado distintas técnicas comerciales que pueden utilizarse con confianza en la rutina de los laboratorios clínicos.

Entre los métodos comerciales más confiables y costos accesibles se encuentran:

**8.2.1. E- test/Liofilchem:** son tiras embebidas en distintas concentraciones de antifúngicos y permiten determinar la CIM en medio sólido. Debido a su eficacia, fácil implementación y lectura, es uno de los métodos más utilizados. Aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para determinar la sensibilidad *in vitro* de *Candida* spp frente a los antifúngicos. ([www.bioMerieux.com](http://www.bioMerieux.com)).



## INTRODUCCION

**8.2.2. Discos/Tabletas:** son reservorios de concentraciones fijas de antifúngicos. En el mercado se encuentran disponibles los discos Oxoid (Bioartis), los discos BBL (Benton Dickinson), las tabletas Neo-Sensitabs™, Rosco (Rosco Diagnostica, DK). Son reactivos usados para determinar la sensibilidad *in vitro* de *Candida* spp frente a los antifúngicos.

**8.2.3. Sensitre® YeastOne (TREK Diagnostic Systems):** se usa para determinar la CIM por microdilución en caldo en *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus* sp. Consiste en una placa de 96 pocillos que contiene distintas concentraciones de antifúngicos, medio de cultivo y un compuesto cromogénico como indicador colorimétrico de oxidación-reducción (azul alamar) para facilitar la lectura interpretación de los resultados.

Lo novedoso de este reactivo es que no se lee turbidez, se lee el cambio de color, se mide la viabilidad del microorganismo. ([www.trekds.com](http://www.trekds.com)).

## 9.- Fitoterapia

La Fitoterapia, del griego-*phytós* ('planta' o 'vegetal') y *therapeia* ('terapia'), se refiere al uso de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), una planta medicinal es aquella que, en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o preventivos o que son precursores para la semi síntesis químico-farmacéutica.

<https://www.portalfarma.com/Profesionales/campanaspf/categorias/Paginas/introduccionlafitoterapia.aspx>.

La OMS define droga como la parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica.

La Real Farmacopea Española establece que "se consideran drogas vegetales las plantas, partes de plantas, algas, hongos o líquenes, enteros, fragmentados o cortados, sin procesar, generalmente desecados, aunque también a veces en





## INTRODUCCION

*estado fresco. También se consideran drogas vegetales ciertos exudados que no han sido sometidos a un tratamiento específico".*

<https://www.portalfarma.com/Profesionales/campanaspf/categorias/Paginas/introduccionalafitoterapia.aspx>.

La aparición de resistencia de los microorganismos a algunos antimicrobianos sintéticos, junto con la toxicidad durante el tratamiento prolongado, sumado a los altos costos motivó que las investigaciones se abocaron a la búsqueda y aplicación de nuevos compuestos biológicamente activos que exhiban efectos secundarios mínimos.

En ese sentido, las plantas medicinales y sus extractos son ampliamente utilizados por la medicina tradicional, como terapias alternativas.

Desde sus orígenes, el hombre ha utilizado a las plantas con fines medicinales, independientemente de la etnia, región geográfica, religión o situación económica. Esto se debe a que las plantas medicinales son una fuente importante de moléculas con actividad terapéutica.

La creciente aceptación de los compuestos naturales, y especialmente la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos a partir de plantas medicinales, se ha vuelto un desafío importante. Entre las principales ventajas de las plantas medicinales se encuentran la producción de distintos metabolitos secundarios, muchos de los cuales presentan actividad antifúngica. Entre los compuestos más conocidos y activos se encuentran: flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, etc. (Davicino, 2007, Wen, 2011).

Además de la potencial utilidad en fitoterapia, la industria farmacéutica utiliza los principios activos de las plantas para elaborar medicamentos de síntesis, y producirlos a granel.

[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/fitomedicina\\_doc.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/fitomedicina_doc.pdf)

Según la OMS, el 80 % de la población mundial utiliza las plantas como principal remedio medicinal y más del 25 % de los fármacos existentes se obtiene de extractos vegetales, o bien se han sintetizado a partir de sustancias encontradas en la investigación fitoquímica (Chen, 2016). En la actualidad, el uso de plantas medicinales se afianzó tanto en los países desarrollados como en los



## INTRODUCCION

menos industrializados y con economía en desarrollo, donde el acceso de la población a los medicamentos comerciales no siempre es posible. (Barañaño, 2015).

### 9.1. Modo de preparación de fitoterápicos

**9.1.1. Tisanas:** son preparaciones líquidas de la planta medicinal, que se encuentra en concentraciones bajas, y son consumidas regularmente por las personas, por ejemplo:

**9.1.1.a. Infusiones:** en las que el producto vegetal sean flores, hojas o tallos, se someten a la temperatura de ebullición del agua con el fin de extraer productos solubles con el mínimo cambio en su estructura química, manteniendo gran porcentaje de sus propiedades curativas. Estas preparaciones recomiendan emplear 20-30 g de vegetal en 1 litro de agua, de conservación no mayor a 12 horas” (Torres Camacho, 2014).

**9.1.1.b. Decocción:** “es un preparado en base a la porción dura de la planta medicinal, como la corteza, fruto, semilla o raíz, y se somete a un proceso que implica la pérdida de sus principios activos debido a la acción del calor. Para su preparación se recomienda usar 30-50 g de planta medicinal en 1 litro de agua, con una conservación no mayor a una semana” (Torres Camacho, 2014).

**9.1.1.c. Maceración:** “es un preparado de plantas medicinales trituradas, empleando como disolvente, agua a temperatura ambiente, favoreciendo la conservación de sus principios activos por acción del calor e inhibiendo la liberación de taninos, considerado como el principio activo generador del sabor amargo y áspero de algunas plantas. Se recomienda en su preparación el empleo de 30-50 g de planta en 1 litro de agua, con una conservación no mayor a un mes después de ser filtrado”. (Torres Camacho, 2014).

**9.1.2. Extractos:** “denominado así a la preparación de un producto vegetal en base a un disolvente valorizable como el éter, agua o alcohol, hasta obtener una consistencia fluida, blanda o seca” (Torres Camacho, 2014).

**9.1.3. Otras formas:** tinturas, zumos, ungüentos, jarabes, aceites esenciales, etc.



## INTRODUCCION

En casos de vulvovaginitis son de uso popular los llamados “baños de asiento”.

<https://www.vix.com/es/salud/197402/los-banos-de-asiento-funcionan-para-tratar-infecciones-intimas-algunas-opciones-con-manzanilla>

### 10.- YERBA MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hilarie)



*... en el mate compartido se unen la materia y el espíritu.*

#### 10.1.- Leyenda de la Caa Yari <https://yerbamateargentina.org.ar/leyenda-de-la-yerba-mate/>

Contaban los ancianos indios guaraníes que, a la vera de un arroyo, en medio de la selva misionera, se había detenido un indio de mucha edad que, agobiado por el peso de los años, ya no podía seguir a su tribu. Los suyos siguieron su camino, el natural deambular de los guaraníes, que no se asentaban en un lugar más allá de lo que duraba una cosecha. Quedaron entonces el anciano y su hija, la hermosa Yari que no pudo abandonarlo, en la espesura del monte.



## INTRODUCCION

Una tarde llego hasta su refugio un extraño viajero, que hablaba el mismo idioma que ellos, pero a quien su traza y sus ropas lo hacían ajeno a la región y a la raza.

*Yari* y su padre asaron un acutí (roedor regional) y convidaron también al extraño el más preciado y abundante plato de los guaraníes el tambú (gusano de carne blanca), criado en los troncos de

pindó, que además de carne proporciona un aceite con el que curaban heridas, aceleraban la digestión y se precavían de los insectos de la selva, y otros humildes manjares que les brinda el monte.

Al recibir tanta hospitalidad y esfuerzo por parte del padre y su hija, el visitante, que no era otro que *Tupá* (Dios del Bien). Quiso recompensarlos para que pudieran dar siempre un generoso agasajo a sus huéspedes y aliviar sus largas horas de soledad.

Hizo brotar *Tupá* una nueva planta en la selva y nombró diosa protectora de ella a *Yarí*. Les enseñó a secar sus ramas al fuego y preparar una exquisita infusión que repondría las fuerzas de quien la tomara y haría las delicias de sus visitantes. Quedó pues la planta bajo la tierna protección de la hermosa joven, que fue desde entonces *Caa Yari*, custodia de los yerbales y su fruto. El regalo de *Tupá*, la infusión vivificadora, no era otra cosa que nuestra yerba mate (Lagier, 2014).

### 10.2.-Orígenes

*Ilex paraguariensis* (tal es su nombre científico), comúnmente llamada *yerba mate*, tiene su hábitat natural en el sur de Paraguay, sudoeste de Brasil y



## INTRODUCCION

noreste de Argentina, más precisamente, en la provincia de Misiones (que representa el 90 % del total producido) y el norte de la provincia de Corrientes, zona denominada selva paranaense.

Sus orígenes se pierden en los tiempos remotos. Alimento básico de los guaraníes, era conocida por éstos como *caa-mate* (el término *caa* significa en guaraní “planta o hierba”, mientras que el vocablo *mate*, proviene de la palabra quechua *mati*, con la cual se designaba a la calabacilla que los aborígenes empleaban para beber la infusión (Instituto Nacional de la Yerba mate. INYM) <https://www.inym.org.ar/es/>

34

### 10.3.- Acerca de su cultivo

La *I. paraguariensis* es un árbol que, en estado salvaje, llega a alcanzar 15 metros de altura. El tronco es recto y cilíndrico y está recubierto por una fina corteza pardo grisácea y acanalada. Las ramas, que brotan del tallo en un ángulo de 90 grados, poseen una copa apicada. Las hojas, de aproximadamente 11 centímetros de largo y 5 de ancho, son de color verde oscuro, con nervaduras amarillentas muy marcadas (INYM).

El cultivo de *I. paraguariensis* requiere temperaturas tropicales o subtropicales (con una media de 20 ° C) y una alta humedad ambiente, con precipitaciones anuales del orden de los 1.500 mm anuales, en época de floración. El suelo de cultivo debe ser ligeramente ácido, arenoso-arcilloso y de textura fina o media, con altos niveles de ácido fosfórico, potasio y hierro, resultan idóneos los terrenos bajos, con buen drenaje y que admitan una radicación profunda.

En la Argentina, Si bien los pueblos originarios conocían esta planta y sus cualidades, a partir de la conquista de América se tienen referencias bibliográficas acerca de sus virtudes, producción y consumo, los primeros cultivos de *I. paraguariensis* fueron introducidos por los jesuitas en el siglo XVII. Tras la expulsión de éstos en 1769 por la Corona española, los yerbatales fueron abandonados, perdiéndose, prácticamente, la tradición de su cultivo. Recién en 1903 se realizó la primera plantación racional y de importancia. En San Ignacio,

## INTRODUCCION

Misiones, existen plantas de *I. paraguariensis* de hasta 100 años justamente donde se encuentran ubicadas las célebres reducciones jesuíticas.

Con el transcurso de los años, las técnicas aplicadas al cultivo y la poda fueron perfeccionándose, optimizándose así el rendimiento de las plantaciones. Actualmente, con unas 200.000 hectáreas cultivadas, Argentina es el primer productor mundial de yerba mate, seguida por Brasil y Paraguay. En la **Figura 7** se muestra la ubicación geográfica de la zona productora de yerba mate en la República Argentina. (INYM)

35



**Figura 7.** Zona geográfica de la zona productora de yerba mate en la República Argentina. (Fuente: <https://verbamateargentina.org.ar/>) (Instituto Nacional de la Yerba Mate, INYM).

Los aborígenes conocían bien esta planta y sus numerosas virtudes, ya que formaban parte de sus hábitos y su dieta, como se diferenciaban de otros pueblos originarios por su vigor y contextura física, los españoles atribuyeron acertadamente esas cualidades al consumo del mate. Los pueblos originarios carecían de escritura, se remite a la tradición oral, contada por los ancianos al calor del fuego y que fue pasando de generación en generación, muchas veces con un cuenco de mate en las manos para entrar en tema (INYM).



## INTRODUCCION

En Argentina el mate es el recipiente en el que se coloca la infusión para luego ser consumida. El origen de la palabra “mate” deriva del quechua “Mati”, que significa calabaza. El mate de calabaza o “porongo” es el más utilizado y se elabora a partir del fruto de una planta (*Lagenaria vulgaris*) (**Figura 8**).

La *L. vulgaris* es la familia de calabazas autóctonas de la zona yerbatera, además de utilizarla para elaborar el mate, los las utilizaban para transportar agua durante sus largas caminatas por la selva y también para almacenar granos (INYM).

36



**Figura 8.** Fruto de *Lagenaria vulgaris* utilizado como mate.

### 10.4.- Descripción de la planta

#### 1. Sistemática

Ubicación sistemática de la yerba mate (ficha técnica)

División: Espermatofitas

Subdivisión: Angiospermas.

Clase: Dicotiledóneas.

Orden: Sapindales.

Familia: Aquifoliáceas.

Género: *Ilex*.

Especie: *paraguariensis*.

Nombre científico: *Ilex paraguariensis*.

Nombre común: Yerba Mate.

<https://yerbamateargentina.org.ar/yerba-mate/que-es-la-yerba-mate/>



## INTRODUCCION

En Europa la planta de yerba mate recibió la denominación de *Ilex theezans* por Bonpland (médico y expedicionista francés, pionero en el cultivo de la yerba mate) en 1821.

Pero fue el sabio francés Saint Hilarie (naturalista francés) quien la clasificó en 1822 como *Ilex paraguayensis* y es la denominación publicada en sus obras “Mémoires du Museum d`Histoire naturelle” y “Histoire des plantes plus remarquables du Brèsil et du Paraguay” (1824) que perdura hasta la fecha. La denominación proviene de los antiguos jesuitas o historiadores españoles que conocían la planta como Hierba del Paraguay. De sus 181 especies, 175 se encuentran dispersas en toda Sudamérica (Lagier, 2014).

37

### 10.4.1.- Morfología externa (Lagier, 2014)

Árbol originario de América del Sur, abunda en estado silvestre y en plantaciones cultivadas. Por razones prácticas para el cultivo y explotación racional, se mantiene una altura de 3 a 6 metros, presentando un corto tronco que ramifica a corta altura del suelo, adquiriendo por sucesivas podas el aspecto del arbusto. (**Figura 9**).

En estado silvestre, la planta necesita 30 años aproximadamente para alcanzar su desarrollo. Logra alturas de 12 a 20 metros, formando un majestuoso árbol cargado de hojas, de tronco recto de hasta 70 centímetros de diámetro, corteza lisa y color grisáceo-ceniciento.



**Figura 9.** Cultivares de yerba mate en Misiones





#### **10.4.2.- Las hojas**

Las hojas, en estado natural perduran en la planta por 3 años, son alternas, coráceas, de forma cuneiformes ovales y elípticas, con borde ligeramente dentado.

Las dimensiones de las hojas difieren según las variedades, de 5, 10 y 15 centímetros de largo, por 2 a 5 centímetros de ancho. En estado de madurez las hojas son espesas, duras y lucientes, como enceradas, de color verde más intenso en la cara superior que la inferior. Presentan un corto pecíolo de color claro verdoso, a veces ligeramente rosado. Su nervadura central y secundaria se destaca netamente por su color amarillo verdoso en la cara superior de la lámina foliar, y por ser muy salientes en la cara inferior. **(Figura 10).**

#### **10.4.3.- Las flores**

La floración tiene lugar en los meses de octubre a diciembre, es de tipo racimoso en falsas panojas, desarrollándose en las axilas de las hojas y en las bases de las ramitas con 40 a 50 flores por racimo. Sus flores son muy pequeñas, polígamas, dioicas, con cáliz y corola de constitución tetrámera, con nervadura central y terminada en punta, de color blanquecino o pálido verdoso, con igual número de estambres (4 o 5) ubicados en los intervalos de estos, presentando, según sea su género, gineceo normal o atrófico. **(Figura 10).**

#### **10.4.4.- Los frutos**

Después de la fecundación se desarrollan los frutos que consisten en una pequeña baya de unos 5 a 7 milímetros de diámetro, que madura de enero a marzo, adquiriendo un color azul oscuro o negro violáceo y coronado por un pequeño estigma más o menos saliente. Cada fruto, que desecado tiene un aspecto de grano de pimienta, contiene de 4 a 8 semillitas de color amarillo pálido, ligeramente rugosas, dispuestos como segmentos de naranja. **(Figura 10).**



**Figura 10.** Hojas, flores y frutos de *I. paraguariensis*

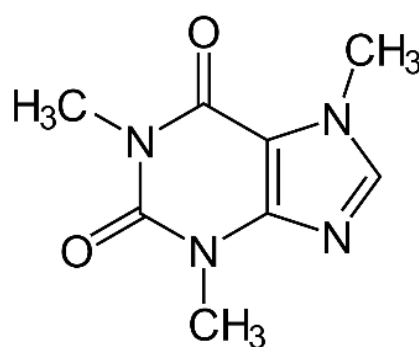
La raíz, de color marrón, es de tipo pivotante, con raíces secundarias que insinúan en el mismo sentido.

### 10.5.- Composición química de la yerba mate

La mayoría de las propiedades biológicas de la yerba mate han sido asociadas al alto contenido de componentes bioactivos presentes en las hojas de *I. paraguariensis*, estos se detallan a continuación:

#### 10.5.1.- Xantinas

Las xantinas son sustancias que pertenecen a un grupo químico de bases purínicas, las presentes en la yerba mate son la cafeína en mayor proporción (0,8 a 2 %) y la teobromina (0,3 a 0,9 %). (**Figura 11**).



**Figura 11.** Estructura química de la cafeína



## INTRODUCCION

Se les atribuyen las propiedades: energizantes, anticancerígeno, evita la obesidad y diurético. La cafeína es importante para evaluar la calidad del producto, puesto que sus propiedades estimulantes son una de las principales razones por las cuales las personas consumen la yerba mate (Schmalko, 2001).

### 10.5.2.- Polifenoles

Los polifenoles son compuestos fenólicos que provienen del metabolismo vegetal de los hidratos de carbono. Su estructura química presenta un anillo aromático unido a dos o más grupos hidroxilicos. Dentro de ellos se encuentran los derivados cafeoilquínicos (entre el 8 a 10 %, principalmente el ácido clorogénico) y en menor proporción los flavonoides (principalmente la rutina). (Figura 12).

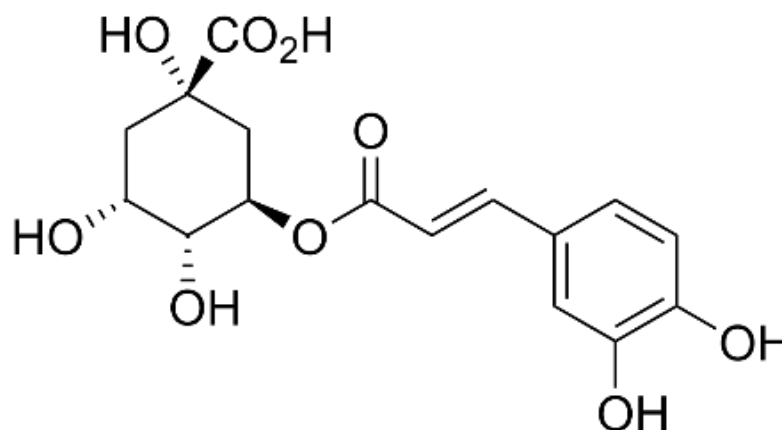


Figura 12. Estructura química del ácido clorogénico

Las plantas se adaptan a las radiaciones UV-B por aumento de la producción de metabolitos secundarios tales como fenoles y flavonoides, se acumulan en las células de la epidermis de diversas especies vegetales, y por ser compuestos que absorben radiación, reducen el efecto toxico de la luz UV-B sobre los distintos componentes celulares (Carrasco-Ríos, 2009).

Los flavonoides por sus efectos foto-protectores en plantas actuando como filtros solares por absorción de la UVB poseen efectos antioxidantes, protegiendo así a las plantas contra el estrés oxidativo inducido por la UVB y dicho mecanismo podría ser extrapolado a la foto-protección en humanos.

Los efectos antioxidantes de extractos de plantas son evaluados con el fin de ser incorporados en productos de uso tópico (Mejía Giraldo, 2014). Por ello a los polifenoles se les atribuye la principal actividad como antioxidantes.

A su vez tienen otras propiedades como: anticarcinogénicos, hipoglucemiante, antiobesidad, hipocolesterolémicos, antihipertensivos, cardioprotectores, antiinflamatorios, antibacterianos, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios.

Poseen propiedades protectoras contra la osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Parkinson, efectos estimulantes del sistema nervioso central y propiedades diuréticas y coleréticas.

Además, en la industria se los utiliza por características como su aroma, color, astringencia (Pedrola, 2010. Schmalko, 2013, Thea, 2016).

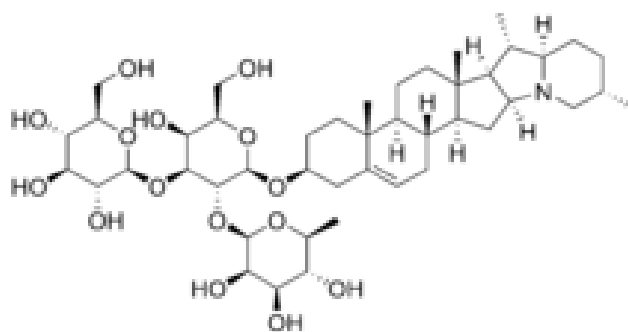
### 10.5.3.- Saponinas

Las hojas de yerba mate poseen un alto contenido de saponinas triterpénicas (entre 1,0 - 1,5 % del peso seco. Las saponinas son sustancias glucosídicas con la propiedad de, en soluciones acuosas, la formación de espumas. Debido a la reducción de la tensión superficial, presentan acción detergente y emulsificante. Son responsables por el índice de amargor y de la espuma de la yerba mate; factores que contribuyen al distintivo sabor del mate.

**Figura 13.**



a-



b-

**Figura 13.** a- Aspecto de la saponina triterpénica; b- Estructura química



## INTRODUCCION

Se les atribuyen la propiedad de ser antiinflamatorias, hipocolesterolémica y de tener efecto protector contra el cáncer. (Brumovsky, 2008; Rodríguez Vaquero, 2010, Schmalko, 2013; Thea, 2016).

**10.6.- Características nutricionales de la yerba mate** (INYM, Brumovsky, 2008; Rodríguez Vaquero, 2010; Schmalko, 20013; Thea, 2016).

42

- La yerba mate es un estimulante natural que no produce hábito, contiene mateína es un estimulante más sano que la cafeína (café) y la teína (té). Está comprobado que activa la vida cerebral y excita el aparato locomotor -además de otras funciones del organismo-, gracias su calidad de tonificante.
- Sus ventajas frente a las infusiones mencionadas son: acción estimulante más prolongada (16-20 h), inexistencias de efectos residuales (insomnio, irritabilidad); concentración de cafeína comparativamente baja. Según estudios de renombrados centros científicos, se determinó que la yerba mate encabeza la lista de plantas ricas en vitaminas. Posee “ácido pantoténico” (complejo B) que mantiene una cantidad adecuada de adrenalina en el torrente sanguíneo, regenerando células y tiene efecto corrector en trastornos de tipo nervioso del sistema digestivo.
- Contribuye a la fijación del fósforo, indispensable para las células nerviosas y posee una importante acción benéfica para la memoria y contra la fatiga cerebral, contiene Vitamina E, importante para la actividad sexual, y contiene colina de importancia para la regulación del colesterol en la sangre, además de otros minerales
- Otros componentes y propiedades nutritivas se observan en la **Tabla 5**.



Tabla 5. Características nutricionales de la yerba mate

Composición general		Vitaminas	
	Valores promedio		Valores promedio
Calorías (kcal.)	4,34	Vitamina C (mg.)	0,135
Glucosa (g.)	0,015	Piridoxina (B6) (mg.)	0,015
Sacarosa (g.)	0,082	Niacina (mg.)	0,121
Proteínas (Nx5.75) (g.)	0,102	Tiamina (B1) (mg.)	0,044
Materia grasa (g.)	0	Minerales	
Fibras (g.)	0	Calcio (mg.)	2,96
Cafeína (g.)	0,35	Fósforo (mg.)	1,67
Cenizas (g.)	0,105	Hierro (mg.)	0,07
Extracto de agua (g.)	1,110	Magnesio (mg.)	2.40
		Potasio (mg.)	2,75
		Sodio (mg.)	0,76

### 10.7.- Poder antimicrobiano de la yerba mate

La yerba mate ha sido estudiada también por su potencial antimicrobiano sobre bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp y Gram negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella* (Dellacasa, 2001, Dellacasa, 2007; Rodriguez Vaquero, 2010; Burris, 2011; Burris, 2012; Rempe, 2015; Rempe, 2017), y sobre hongos filamentosos como *Fusarium* y *Malassezia* (Filip, 2010; Medvedeff, 2013). El potencial está estrictamente relacionado a la presencia, principalmente, de compuestos fenólicos, cuyos principales representantes son ácido gálico, siríngico, cafeico, ferúlico y p-cumarico (Prado, 2013; Thea, 2016; Gonzalez Coria, 2018).

En cuanto a la presencia de saponinas ya en 1999, Haraguchi *et al*, sugirieron que los triterpenos (saponinas) presentes en plantas del género *Ilex*, favorecen su actividad antimicrobiana por alteración de la membrana lipídica de los microorganismos. Esta característica fue desafío para Bauman y cols. que investigaron el efecto de las saponinas sobre la estructura de la membrana celular a través de la hemólisis de eritrocitos humanos *in vitro*, demostrando que



## ***INTRODUCCION***

estas lisaban los eritrocitos ocasionando un daño irreversible a la bicapa lipídica (Bauman, 2000).

En cuanto a su actividad inhibitoria frente al desarrollo de hongos levaduriformes, hay muy pocos estudios realizados (De Biasi, 2009; Carelli, 2011, Fretes Corrales, 2017), en nuestra provincia no hay ensayos documentados.



## HIPÓTESIS

Los extractos acuosos obtenidos de hojas de *I. paraguariensis* muestran actividad antifúngica *in vitro* sobre las especies de *Candida* aisladas de candidiasis vulvovaginal en un rango de concentración semejante al de los antifúngicos convencionales.





## OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar y comparar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos acuosos obtenidos de hojas de *I. paraguariensis* y antifúngicos convencionales frente a *Candida* spp. aisladas de pacientes con candidiasis vulvovaginal.

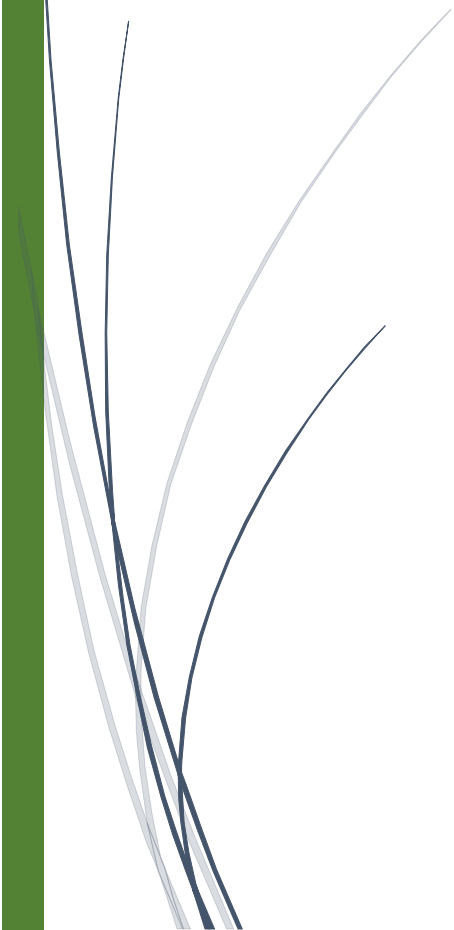
47

### Objetivos específicos

- 1- Caracterizar en género y especie a las levaduras aisladas de CVV.
- 2- Determinar la sensibilidad *in vitro* de las levaduras en estudio por difusión en medio sólido con discos y tabletas cargados con fluconazol, nistatina, itraconazol y clotrimazol.
- 3- Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de las levaduras en estudio por difusión en medio sólido con el extracto acuoso de hojas de *I. paraguariensis* (St. Hilarie).
- 4- Determinar la concentración inhibitoria mínima *in vitro* por microdilución en caldo de fluconazol, nistatina, itraconazol y clotrimazol frente a las levaduras en estudio.
- 5- Determinar la concentración inhibitoria mínima *in vitro* por microdilución en caldo del extracto acuoso de yerba mate frente a las levaduras en estudio.
- 6- Comparar los resultados obtenidos y evaluar la eficacia *in vitro* de los extractos acuosos de hojas de *I. paraguariensis*.

# MATERIALES Y METODOS

CAPITULO 2





## **1. Tipo de diseño**

La estrategia metodológica utilizada en el proyecto fue:

- Según el estado de arte: exploratorio y descriptivo.
- Según el grado de control: experimental.
- Según el estudio de la dimensión temporal: transversal.
- Según el momento en que se construyen los datos: prospectivo.
- Según el tipo de tarea que se realiza: de campo.
- Según el enfoque metodológico: cuantitativo.

## **2. Universo**

Se utilizaron aislados de levaduras obtenidas de muestras de flujo vaginal de pacientes con infección vulvovaginal y que fueron derivadas de diferentes hospitales de la ciudad de Posadas (Misiones) al Servicio de Diagnóstico Micológico de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (FCEQyN), Universidad Nacional de Misiones (UNaM), Argentina.

Con el fin de encriptar la trazabilidad de los aislados se los nominó en orden secuencial con números arábigos, comenzando por el 1 y finalizando en el 139.

## **3. Muestra**

La muestra estuvo constituida por aislamientos de hongos levaduriformes. El muestreo fue no probabilístico, accidental. El criterio de inclusión fueron las levaduras aisladas de pacientes con vulvovaginitis candidiasica derivadas al Servicio de Diagnóstico Micológico. Las muestras fueron ingresadas por demanda espontánea, no se seleccionó por edad, ni por presencia o no de embarazo de las pacientes.

## **4. Estructura de los datos** (Bottinelli, M., 2007).

**4.1. Unidades de análisis (UA):** las UA fueron cada una de las cepas en estudio de las siguientes especies de hongos levaduriformes:

Especie *C. albicans*.

Especie *C. glabrata*.



## MATERIALES Y METODOS

Especie *C. parapsilosis*.

Especie *C. tropicalis*.

Especie *Pichia kudriavzevii* (sin. *Issatchenkia orientalis*) (anamorfo *C. krusei*), en adelante *C. krusei*.

Especie *S. cerevisiae*.

49

**4.2. Variables (V):** los atributos de las UA analizados fueron:

- Especies de levaduras: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *S. cerevisiae*.
- Variabilidad inherente a cada cepa en estudio.
- Concentración de extractos acuosos de hojas de yerba mate (EAHYM).
- Concentración de antifúngicos (fluconazol, itraconazol, clotrimazol, nistatina).
- Tiempo de incubación (24, 48 h).
- Sensibilidad (S) *in vitro* de las cepas de levaduras frente a los antifúngicos (a distinto tiempo y distintas concentraciones de los antifúngicos) (Métodos difusión en agar y métodos de microdilución en medio líquido, para determinar la concentración inhibitoria mínima-CIM).
- Sensibilidad *in vitro* de las cepas frente a los EAHYM (a distinto tiempo y distintas concentraciones del extracto). Métodos difusión en agar y métodos de dilución.

**4.3. Escalas de valores (R):**

**4.3.1 Método de difusión en agar:** la actividad del antifúngico en estudio se valoró según el valor en milímetros (mm) del diámetro del halo de inhibición del crecimiento fúngico (A la fecha no fueron definidos los puntos de corte clínicos para algunas especies de levaduras).

La potencia para cada antifúngico de la tableta Neo- Sensitabs™ (Rosco Diagnostica) ([www.rosco.dk](http://www.rosco.dk)) fue:

- Clotrimazol 10 µg.
- Fluconazol 25 µg.
- Itraconazol 8 µg.
- Nistatina 50 µg.



## MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron discos cargados con fluconazol 25 µg de la firma comercial Oxoid (Bioartis, Buenos Aires, Argentina) y discos Malbrán manufacturados por el Instituto de Producción de Biológicos (INPB) del INEIA. ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”.

En la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) se consideró como CIM a la concentración más baja del antifúngico que produce inhibición evidente de crecimiento fúngico (para cada cepa y para cada antifúngico probado) comparado con el control de crecimiento.

El intervalo de concentraciones para cada antifúngico, incluyeron los puntos críticos: azoles 128-0,25 µg/mL, polienos: 16-0,03 µg/mL.

El intervalo de concentraciones para el EAHYM en estudio estuvo entre: 400 mg/mL y 0,78 mg/mL.

### 4.4. Indicadores y dimensiones:

Los procedimientos y dimensiones utilizados para medir las variables fueron:

- Métodos microbiológicos convencionales para la identificación de las levaduras, consistentes en: estudios sistemáticos de sus características morfológicas y fisiológicas bajo condiciones estandarizadas:
  - 1) Observación microscópica: examen directo y tinciones.
  - 2) Cultivo en medios rutinarios e identificación de los microorganismos.
  - 3) Pruebas bioquímicas.

Las dimensiones consideradas fueron características culturales macro, microscópicas y bioquímicas de las especies de levaduras seleccionadas.

- Método de difusión en medio sólido para el estudio de sensibilidad de las levaduras frente a los antifúngicos y el EAHYM. Las dimensiones a tener en cuenta fueron: especie fúngica, concentración del inóculo, concentración del EAHYM, concentración del antifúngico, temperatura y tiempo de incubación, puntos de corte clínico.
- Método de dilución en caldo para determinar la CIM de los antifúngicos y del EAHYM, que inhibieron el desarrollo de las cepas de levaduras estudiadas. Las dimensiones tenidas en cuenta fueron: especie fúngica, concentración



## MATERIALES Y METODOS

del inóculo, concentración del EAHYM, concentración del antifúngico, temperatura y tiempo de incubación, puntos de corte clínico.

### 4.5 Fuente de información

El tipo de información es primaria.

### 4.6 Instrumentos, herramientas

Se confeccionaron registros para volcar datos de las pacientes (edad, embarazo, si/no, tiempo), identificación de las levaduras, resultados de sensibilidad obtenidos con los ensayos utilizando EAHYM y los antifúngicos.

51

## 5. Pruebas para la identificación fenotípica de levaduras

Las pruebas realizadas fueron:

### 5.1 Crecimiento a 28 °C y 37 °C.

**5.2 Siembra en agar cromógeno CHROMagar Candida** (CHROMagar, Paris, France) para la identificación presuntiva del complejo *C. albicans* / *C. dubliniensis* (color verde). *C. tropicalis* (color azul) y *C. krusei* (colonias color rosa, centro púrpura, secas, textura rugosa). No son identificadas presuntivamente las levaduras que muestren colonias de color rosa, lila, crema, otros colores (Odds, 1994).

**5.3 Visualización del fenómeno de Reynolds - Braude** para la identificación presuntiva del complejo *C. albicans* / *C. dubliniensis*. Se observa la formación de un tubo germinativo entre las 2 y ½ y 3 h de incubación en suero bovino a 37 °C (Buckley, 1963).

**5.4 Estudio de la micromorfología en medio Agar leche 2 % + Tween 80 (AL)** (ver anexo): se observan blastoconidios (levaduras brotadas), pseudomicelio o no y la formación de clamidoconidios terminales simples o múltiples luego de 48 h de incubación a 28 °C-30 °C (Bartoli, 2011).

**5.5 Formación de clamidoconidios en medio tomate-zanahoria (ATZ)** (ver anexo). Se vertieron 3 mL en caliente del medio ATZ sobre un portaobjetos, se dejó solidificar y se sembró por incisión una ansada de la levadura en estudio, se cubrió con un cubreobjetos estéril y se incubó en cámara húmeda a 30 °C



## MATERIALES Y METODOS

durante 48 h. Se observó al microscopio 200x y 400x la presencia o no de clamidoconidios. (Bartoli, 2011).

### **5.6 Formación de clamidoconidios en medio agar tabaco modificado (ATM).**

Se utilizó el medio descrito por Khan y colaboradores (ver anexo). Se vertieron 3 mL en caliente del medio ATM sobre un portaobjetos, se dejó solidificar y se sembró por incisión transversal una ansada de la levadura en estudio, se cubrió con un cubreobjetos estéril y se incubó en cámara húmeda a 30 °C durante 48 h. Se observó al microscopio 200x y 400x la presencia o no de clamidoconidios. (Bartoli, 2011).

**5.7 Crecimiento en medio ATM.** Este medio de cultivo se usó para evidenciar la actividad de la enzima fenoloxidasa producida por *C. dubliniensis* y que se manifiesta con la producción de un color dorado-marrón característico. Las placas se sembraron con un subcultivo fresco de la levadura en estudio en forma de círculos de 1 cm de diámetro y se incubaron a 30 °C durante 48 a 72 h. Se describió la macromorfología de las colonias: la presencia de borde (regular o festoneado), el color (blanco o dorado) y el aspecto (liso o rugoso). (Bartoli, 2011).

**5.8 Actividad lipasa.** El cultivo en medio de opacidad (ver anexo) se utilizó para detectar la actividad de la enzima lipasa. La prueba es positiva (formación de halo alrededor de la colonia) para *C. albicans* y negativa para *C. dubliniensis*. (Bartoli, 2011).

**5.9 Actividad lipolítica.** El medio de cultivo de Slikfin con modificaciones (ver anexo) se usó para detectar la actividad lipolítica de *C. albicans*. Las placas se sembraron con las levaduras en estudio formando círculos de 1 cm de diámetro, se incubaron por 72 h a 30 °C. La lectura fue visual y se observó la presencia o ausencia de halo de opacidad alrededor de la colonia. La formación del halo de opacidad identifica presuntivamente a *C. dubliniensis*. (López, 2005; Pineda 2008, Bartoli 2011).

**5.10 Macromorfología en agar Pal** (ver anexo). Las placas se sembraron con las levaduras en estudio formando círculos de 1 cm de diámetro, se incubaron por 72 h a 30 °C. La lectura fue visual cada 24 h hasta completar 10 días. Se observaron las características culturales tales como aspecto, textura y tonalidad de las colonias. Cada 72 h se realizó la observación microscópica de los cultivos



## MATERIALES Y METODOS

con el fin de visualizar la presencia o ausencia de clamidosporas. La presencia de colonias lisas sin formación de clamidoconidios es un indicador presuntivo de *C. albicans*, mientras que la presencia de colonias rugosas, con bordes filamentosos, con formación de clamidoconidios es un indicador presuntivo de *C. dubliniensis*. (Al Mosaid, 2003).

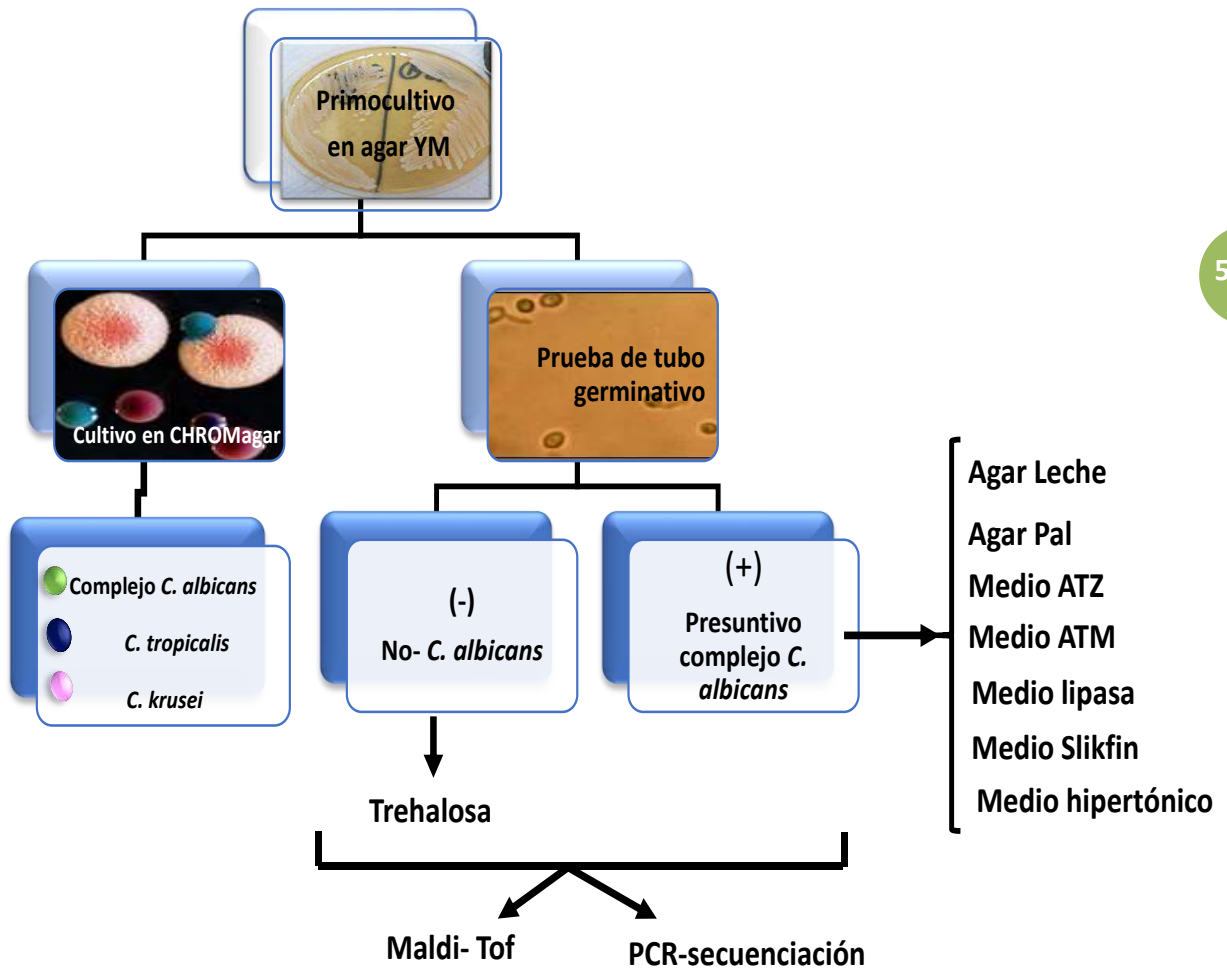
**5.11 Crecimiento en caldo Sabouraud hipertónico** (ver anexo). Es un marcador presuntivo de *C. dubliniensis* basado en su incapacidad a crecer en caldo de Sabouraud dextrosa con NaCl al 6,5 %. Es un ensayo económico, fácil de realizar e interpretar y proporciona resultados consistentes. La prueba no genera resultados falsos positivos o negativos. Los tubos se incubaron a 35 °C durante 96 h y se observó el crecimiento mediante la presencia de turbidez en cada tubo. (Bartoli, 2011).

**5.12 Asimilación de trehalosa:** se utilizaron tabletas de trehalosa, Diatabs™ (Rosco Dinamarca), ([www.rosco.dk](http://www.rosco.dk)). Las tabletas tienen 6 mm de diámetro. Para su lectura e interpretación presentan un código de color que indica si el microorganismo utiliza el sustrato para su metabolismo (López, 2001; Morales López, 2014).

Se partió de cultivos puros, con 24-48 h de incubación en agar morfología para levaduras (ver anexo). Se prepararon tubos de hemólisis con 0,5 mL de solución salina estéril, se añadió 300 µL de una suspensión densa (equivalente a 4 de la escala McFarland) de la levadura en estudio y se agregó una tableta de trehalosa por cada tubo. Los tubos se incubaron a 35-37 °C durante 1 h. Tras la incubación se observó si ocurría el viraje de color rosado al amarillo presuntivamente era *C. glabrata* ya que asimila a la trehalosa.

En la **Figura 14** se muestra el algoritmo de identificación presuntiva que se utilizó para las levaduras incluidas en este estudio.





**Figura 14.** Algoritmo de identificación presuntiva de levaduras. ATZ: agar tomate zanahoria; ATM: agar tabaco modificado.

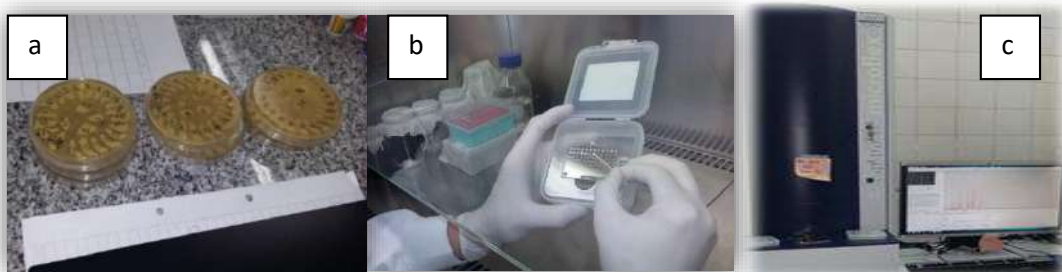
**Cepas control:** se utilizaron como control cepas de la colección de cultivos del Departamento de Micología, de la ANLIS (Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud). INEIA (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Agudas) “Dr. Carlos G. Malbrán” (en adelante Laboratorio de Referencia).

Las cepas fueron: *C. albicans* (DMic 982873) y *C. dubliniensis* (DMic 93695) y *C. glabrata* DMic 982882, además se utilizó *C. glabrata* 90030, perteneciente a la *American Type Culture Collection* (ATCC).

**6- Identificación con técnicas de proteómica:** las 139 cepas identificadas fenotípicamente se derivaron al Departamento Micología del INEIA “Dr. C. G. Malbrán” para su identificación mediante la técnica de espectrometría de masas y de ser necesario, por secuenciación.

La espectrometría de masas *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectro-metry* (MALDI-TOF MS) permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada especie. Un microorganismo dado presentará siempre una serie de picos característicos en el espectro y esto permite la creación de bases de datos con los espectros de masas que presentan los distintos microorganismos. El espectro obtenido para un determinado microorganismo se compara automáticamente con la base de datos, y el resultado se emite junto a un puntaje o *score*.

La preparación de la muestra se realizó transfiriendo una pequeña cantidad de colonia aislada en una placa de acero MSP96 (BrukerDaltonics, Alemania), se cubrió con 1  $\mu$ L de disolución de matriz HCCA porcionado (BrukerDaltonics) y se dejó secar. La adquisición de los espectros se realizó en un espectrómetro de masas microflex (BrukerDaltonics) de manera automática mediante el software MALDI Biotyper (BrukerDaltonics). El software asigna una puntuación a cada identificación entre 0 y 3 que permite evaluar la fiabilidad de la identificación. (**Figura 15**).



**Figura 15.** a- Cultivo de las levaduras. b- Inoculación de la placa. c- Lectura en el equipo MALDI-TOF



## MATERIALES Y METODOS

El sistema realiza un cálculo de similitud entre una huella molecular obtenida mediante espectrometría de masas de un microorganismo desconocido y las huellas moleculares de cepas patrón caracterizadas y almacenadas en una biblioteca de referencia. De esta forma, se pueden identificar microorganismos a nivel de especie en pocos minutos después de realizar los procedimientos de preparación de muestras.

Se considera un puntaje mayor o igual a 1,7 como identificación aceptable de la especie, entre 1,5 y 1,6 identificación aceptable del género, y menor o igual a 1,5 como identificación no fiable. (Maldonado, 2018; Taverna, 2019).

56

### 7- Identificación molecular de especies crípticas

Para realizar la caracterización de las especies crípticas se amplificó la región ITS1–5,8S–ITS2 del DNA ribosómico utilizando los cebadores descritos por White y col. (1990). La PCR se llevó a cabo en 20  $\mu$ L de volumen final conteniendo Buffer 1X, cloruro de magnesio 2,5 mM, dNTPs 200  $\mu$ M, 10  $\mu$ M de cada cebador, Taq polimerasa 0,5 U, utilizando un ciclado compuesto por una desnaturalización inicial 4 min a 94 °C y 35 ciclos de: 40 s 94 °C, 40 s 50 °C y 40 s 72 °C, con una extensión final de 10 min a 72 °C.

Cebadores utilizados (White y col., 1990)

Nombre	Secuencia	Tm	Longitud
ITS1 (S)	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG	64,48	19
ITS4 (As)	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC	58,35	20

S: sentido; As: antisentido.

Los productos de PCR fueron chequeados en geles de agarosa al 2 %, fueron secuenciados utilizando el servicio de MacroGen Corea ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) y analizados con el programa Genius 8 que permite la visualización de los cromatogramas, facilita su control y la conformación de una secuencia consenso para cada secuencia obtenida.

Las secuencias fueron contrastadas contra la base de datos primaria online del NCBI - National Center of Biotechnology Information



## MATERIALES Y METODOS

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se determinó su grado de identidad y similitud con la herramienta BLASTn; y contra la base de datos secundaria o curada de Fungal barcoding (<http://www.fungalbarcoding.org/>), utilizando la herramienta Pairwise sequence alignment.

**8- Conservación de las cepas:** las cepas de levaduras recuperadas se conservaron por duplicado en agar agua y medio Castellani y refrigeradas a 4-8 °C (de Capriles, 1989, Fernández Andreu, 2013).

### 9. Obtención de extractos de *Ilex paraguariensis* (yerba mate)

Durante los meses de junio- julio/2015 se recolectaron hojas de la planta *Ilex paraguariensis* var. *paraguariensis* de cultivares seleccionados y codificados como clon CA 1/74 (cultivar parental femenino) y clon CA 8/74 (cultivar parental masculino), según la guía del Ing. Agr. Sergio Prat Kriun. La muestra de herbario se conserva en el INTA Cerro Azul, Ruta Nacional 14, km 1085, Provincia de Misiones, República Argentina.

Se trabajó con las hojas del cultivar parental masculino, según los expertos es la tendencia de siembra de los cultivadores de yerba, que por su características morfológicas, fenológicas, sanitarias, culturales y tecnológicas lo hacen un cultivo de elección (INTA) (Ver anexo). **(Foto 1 a).**

Una vez realizada la cosecha de las hojas se procedió a trabajar con ellas para evitar el avance de los procesos de degradación de tejidos. Las hojas fueron seleccionadas de acuerdo al aspecto macroscópico, se eligieron las hojas que respondían al color y textura descripto para la planta, sin manchas ni cambios de color, libres de lesiones y de parásitos externos. Luego se realizó el lavado exhaustivo con agua potable para eliminar cualquier material contaminante.

El proceso de secado se realizó en microondas a máxima potencia durante 1 min. Las hojas limpias y secas fueron almacenadas dentro de recipientes rotulados, en ambiente fresco, seco y en oscuridad. Finalmente, se realizó la molienda en máquina eléctrica de trituración de hojas en la cátedra de Farmacología de la carrera de Bioquímica en la Universidad de Buenos Aires (UBA) bajo la dirección de Dra. Rosana Filip, y se obtuvo un fino polvillo de la muestra.



### **9.1- Liofilización**

Se pesaron 25 gr de la muestra obtenida en la molienda y se solubilizaron en 500 mL de agua destilada, concentración del 5 %. Se realizó el método de “decocción” a ebullición durante 20 min., según la Farmacopea Argentina. Séptima edición, 2013. Volumen IV, ANMAT, pág. 239, se lo dejó enfriar, se lo filtró utilizando capas de gasa estéril y finalmente se utilizó bomba de vacío con papel de filtro Watman N°10 estéril, para última filtración. El recuperó se llevó a 500 mL con agua destilada.

Una vez realizada la filtración, la suspensión se colocó en recipientes adecuados (mamaderas) y se llevó al liofilizador. El liofilizador se calibró de acuerdo a las directrices del fabricante. La mamadera se colocó en un sitio del liofilizador con temperatura bajo cero y se mantuvo en rotación hasta que toda la muestra se congeló. El procedimiento insumió aproximadamente 1 hora. Luego se retiró de ese líquido refrigerante y se adaptó a unos picos que hicieron el vacío y comenzó el proceso de sublimación en frío. La muestra, mientras permanece a temperatura ambiente no se descongela durante el liofilizado porque el vacío que hace el aparato impide este proceso.

El liofilizado es una técnica mejor que el deshidratado en estufa porque no degrada la acción de algunos de los componentes de la muestra. El proceso de liofilizado tarda entre 4 a 5 días según la cantidad de muestra (Ramírez-Navas, 2006). **(Figura 16).**

Se liofilizó todo el material obtenido de la molienda para asegurar que los ensayos de laboratorio fueran realizados con el mismo lote. El producto liofilizado fue conservado en frascos de vidrio con tapa hermética, a temperatura ambiente, en ambiente oscuro. Los frascos se recubrieron con papel de aluminio para protegerlos de la luz. **(Foto 1 b).**



**Foto 1.** a-Hojas de yerba mate



b-Extracto liofilizado



**Figura 16.** Esquema de obtención y liofilizado del EHYM

**9.2- Proceso de purificación para determinar polifenoles**

Se realizó el procedimiento de purificación del EAHYM para determinar la composición de polifenoles. (Filip, 2001; Brumovsky, 2008).

Procedimiento:

Se preparó una suspensión con 25 g de hoja de yerba mate en 500 mL de agua y se llevó a cocción. Se obtuvo el extracto crudo.

Con los 500 mL se preparó 1 extracto:

1. Extracto 1-

Se tomó una alícuota de 100 mL del extracto crudo y se realizaron 3 lavados con 25 mL de hexano en ampolla de decantación.



## MATERIALES Y METODOS

- a- Luego se realizaron extracciones (3 veces) con 25 mL de tolueno.
- b- El extracto acuoso así obtenido se conservó y se descartó el extracto orgánico.
- c- Se obtuvo un extracto semi purificado en solución acuosa y se llevó a rotavapor para extraer el remanente de solventes orgánicos.

El resultante de los evaporados de ambos extractos se llevó a 100 mL, se obtuvo:

- 100 mL de extracto crudo.
- 100 mL de extracto 1.

Los extractos se mantuvieron congelados hasta el momento de realizar la determinación de la composición de polifenoles.

### 9.3- Determinación del contenido de polifenoles totales

La cantidad de polifenoles totales fue determinada en el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la ciudad de Posadas, mediante la prueba de FOLIN CIOCALTEU (normas ISO 14502-1-1:2004 (E)). (Ver anexo).

- **Fundamentos de la prueba**

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza para medir el contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales.

Los compuestos fenólicos de la muestra reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu formado por una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico, a pH básico, ocurre una reacción redox, aparece una coloración azul que se mide en espectrofotómetro a 765 nm y se cuantifica en base a la curva de calibración de ácido gálico.

La técnica es precisa y sensible, aunque puede mostrar variaciones según los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción. (García Martínez, 2015).

- **Procedimiento**

Se mezcló 1 mL del extracto diluido con 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (10 en 100), se agitó y se dejó transcurrir 3 a 8 minutos, se agregó 4 mL de la solución de carbonato de sodio. Cada tubo se agitó, se tapó y se dejó en



## MATERIALES Y METODOS

reposo a temperatura ambiente. Luego de 60 minutos se determinó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro marca Spectronic® Genesys™. Las curvas de calibración se prepararon con ácido clorogénico y ácido gálico (0,10, 20, 30, 40, 50 y 60 µg/mL).

Las ecuaciones del ajuste fueron:

$$y = 0,0066 * x - 0,00093,$$

donde x = concentración del patrón ácido clorogénico (R2 = 0,9973)

$$y = 0,0122 * x - 0,00898;$$

siendo x = concentración del patrón ácido gálico (R2 = 0,9986).

Los resultados provenientes de los métodos de extracción 1 y 2 se expresan como gramos de polifenoles equivalentes a ácido clorogénico por 100 g de yerba mate seca, y como gramos de polifenoles equivalentes a ácido gálico por 100 g de yerba mate seca (Brumovsky, 2008).

### 9.4- Verificación de la carga microbiana del extracto vegetal

Para realizar el control microbiológico se hicieron diluciones seriadas del extracto puro, dil1, dil 2 y dil 3, se realizaron coloraciones de Gram y cuando se observó la presencia de estructuras Gram (+) que no desarrollaron en el medio agar morfología, esas estructuras fueron categorizadas como artefactos o detritus vegetales.

### 10- Determinación de la concentración inhibitoria mínima por microdilución de agentes antifúngicos frente a levaduras

Se determinó la CIM siguiendo las directrices del documento EDEF. 7.3.2 del EUCAST (Arendrup, 2020).

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio Antifúngicos del Departamento de Micología del INEIA “Dr. C. G. Malbran”.

Se evaluó la actividad *in vitro* de clotrimazol, itraconazol, nistatina y fluconazol (Sigma-Aldrich, Argentina), y del EAHYM.

Las diluciones de los antifúngicos se realizaron de acuerdo al esquema propuesto en el Documento EDef 7.3.2. Las soluciones madre de todos los





## MATERIALES Y METODOS

antifúngicos se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). En la **Tabla 6** se muestra un ejemplo de diluciones.

**Tabla 6.** Esquema para preparar las series de diluciones de los antifúngicos\*

Paso	Concentración (µg/mL)	Fuente	Volumen del antifúngico (µL)	Volumen del solvente (µL)	Concentración intermedia (µg/mL)	Concentración (µg/mL) después de una dilución 1:100 con RPMI 2X (2 % G)
1	12800	Stock	200	0	12800	128
2	12800	Stock	100	100	6400	64
3	12800	Stock	50	150	3200	32
4	12800	Stock	50	350	1600	16
5	1600	Paso 4	100	100	800	8
6	1600	Paso 4	50	150	400	4
7	1600	Paso 4	50	350	200	2
8	200	Paso 7	100	100	100	1
9	200	Paso 7	50	150	50	0,5
10	200	Paso 7	25	175	25	0,25

\*Tabla tomada del documento EDef.7.3.2 (EUCAST), referencia

Los rangos de concentraciones probados fueron: para el itraconazol y la nistatina de 0,008 – 8 µg/mL, para el clotrimazol de 0,03-16 µg/mL, mientras que para el fluconazol fue de 0,125-128 µg/mL.

Se utilizaron microplacas estériles de 96 celdas, fondo plano (Nunc 167008, Nunc, Naperville, IL, USA). Se dispensaron 50 µL por pocillo de las distintas concentraciones de antifúngicos desde la columna 1 a la 10, la columna 11 se cargó solo con medio de cultivo y se reservó como control de crecimiento (se inocula la levadura en estudio sin antifúngico), la columna 12 se reservó para el medio de cultivo sin inóculo (control de esterilidad y blanco de lectura).

Las placas así preparadas se conservaron a -70 °C durante un tiempo máximo de 2 meses. (**Figura 17**).

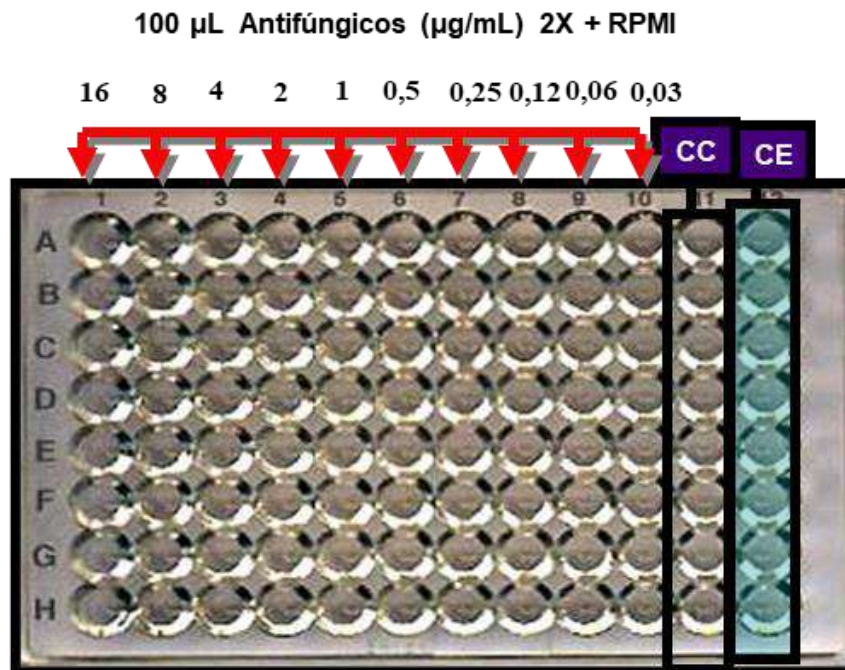


Figura 17. Rango de concentraciones en  $\mu$ g/mL para el itraconazol y el clotrimazol

### 10.1. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Sigma-Aldrich), es un medio sintético de composición conocida y estable, al que se le agregó glucosa hasta alcanzar una concentración final del 2 % y se tamponó a pH 7 con el agregado de 0,165 M del ácido 3-(n-morfolino) propanosulfónico (MOPS) (Sigma-Aldrich).

### 10.2. Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 24 h para *Candida* spp. y 48 h para levaduras del complejo *C. parapsilosis*. Se realizó una suspensión en agua destilada estéril y se ajustó al valor 0,5 de la escala McFarland (0,5 -2,5  $\times 10^5$  UFC/mL) con ayuda de espectrofotómetro a 530 nm.

### 10.3. Preparación de las diluciones del EAHYM

El uso del DMSO como diluyente se desestimó ya que no se logró solubilizar el liofilizado de yerba mate.



## **MATERIALES Y METODOS**

Se prepararon soluciones acuosas del extracto de yerba mate liofilizado. Se probaron distintas concentraciones del EAHYM y se seleccionó para su evaluación la concentración de 20 g del liofilizado de yerba mate en 5 mL de agua (4000 mg/mL), las otras concentraciones se descartaron porque presentaban coloración verde oscuro y además la densidad elevada de las soluciones impedía la lectura con espectrofotómetro.

Con el fin de disminuir el efecto de la coloración y asegurar la esterilidad del EAHYM, se procedió a filtrar la solución madre en dos tiempos. La primera filtración fue clarificante y se utilizó un filtro de poro 0,45  $\mu\text{m}$  (MF-Millipore™, Buenos Aires, Argentina), luego, en la segunda instancia se utilizaron filtros de poro 0,22  $\mu\text{m}$  (MF-Millipore™) para su esterilización.

### **Procedimiento**

A partir de la solución clarificada y esterilizada se procedió a realizar diluciones seriadas al medio partiendo de 400 mg/mL hasta 0,78 mg/mL. Se trabajó con el rango de concentraciones finales entre 400 - 0,78 mg/mL. (Ver Anexo).

En la **Figura 18** se muestra el algoritmo que se siguió para preparar las diluciones del EAHYM.

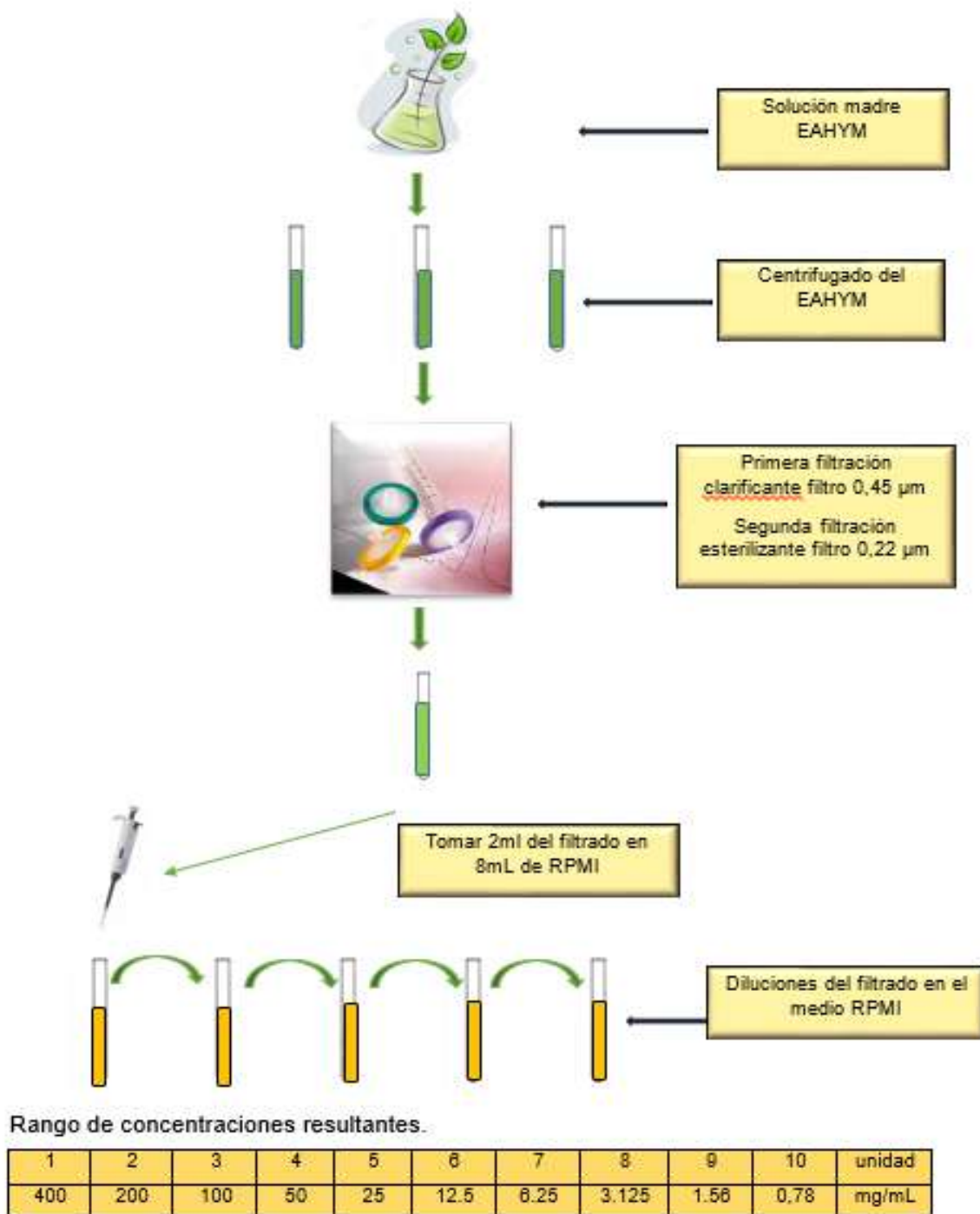


Figura 18. Preparación de las diluciones del EAHYM.

**10.4. Carga de las placas con los antifúngicos y con el EAHYM**

Las concentraciones de antifúngicos y del EAHYM utilizadas se observan en la

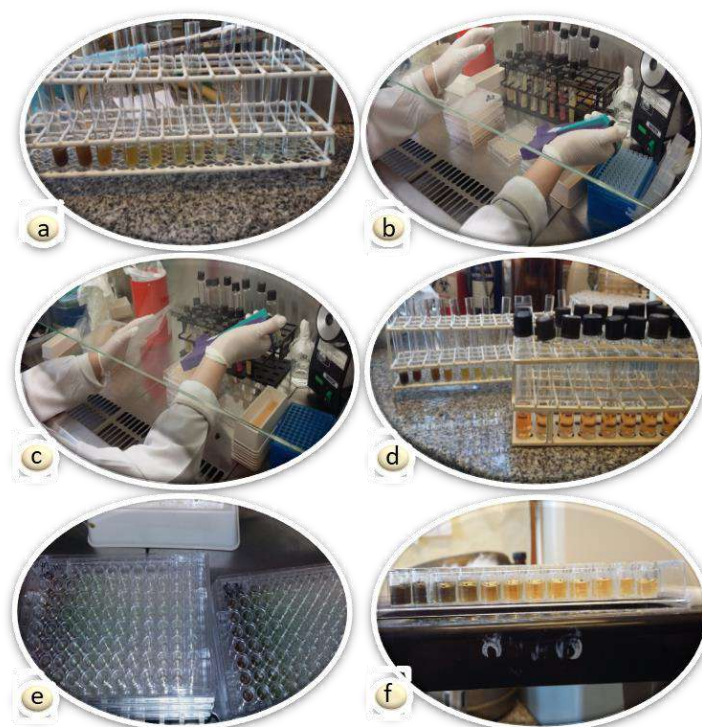
**Tabla 7**

**Tabla 7.** Valores de concentración de antifúngicos y de yerba mate utilizada para la determinación de la CIM

	Concentración de antifúngicos ( $\mu\text{g/mL}$ ) y EAHYM ( $\text{mg/mL}$ ) por columnas									
Drogas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NIS	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015
FLZ	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
ITZ	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015
CLZ	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
EAHYM	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78

Nist: nistatina; FZ: fluconazol; IZ: itraconazol; CLZ: clotrimazol; EAHYM: extracto acuoso de hojas de yerba mate.

En la **Foto 2** se muestra la secuencia de pasos para la carga de placas con EAHYM



**Foto 2.** a-Diluciones de EAHYM; b y c-Carga de las microplacas con medio de cultivo y EAHYM; e-Vista de microplaca cargada con EAHYM; f: Vista lateral de microplaca cargada con EAHYM.



### Cepas control de calidad:

En todos los ensayos se incluyeron las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Estas cepas tienen puntos de corte definidos solo para los antifúngicos itraconazol y fluconazol. Al no contar con valores de referencia para el clotrimazol, la nistatina y los EAHYM, para cada antimicrobiano se determinó la CIM 30 veces con el fin de obtener el rango de trabajo. Las determinaciones se realizaron en diferentes días, se registró la CIM moda de las 30 repeticiones.

67

### 10.5. Incubación

Las placas se incubaron a 37 °C durante 24-48 h. Para minimizar la evaporación del medio de cultivo por efecto de la temperatura, las placas se colocaron dentro de una caja con tapa, y se aseguró una atmósfera húmeda (papel de filtro empapado en agua destilada estéril).

### 10.6 Lectura de CIM automatizada

La lectura de las placas se realizó en un lector de microplacas (Labsystems Multiscan Multisoft Basingstoke, UK) a 450 nm.

Para cada aislado se consideró el 100 % de crecimiento a la absorbancia media de las celdas control sin droga. El valor del pocillo control de esterilidad o blanco se restó a la lectura del resto de los pocillos.

Para la nistatina, la CIM es la CIM 90 (concentración más baja de antifúngico en que la absorbancia es menor o igual al 10 % de la absorbancia del control de crecimiento, es decir 90 % de inhibición comparado con el pocillo control de crecimiento). Para los azoles fluconazol, itraconazol y clotrimazol, se consideró la CIM 50, que es la concentración más baja de antifúngico en que la absorbancia es menor o igual al 50 % de la absorbancia del control de crecimiento. Cuando la densidad óptica de los pocillos a las 24 h fue menor a 0,2, se realizó otra lectura a las 48 h (Arendrup, 2020).



### 10.7. Interpretación de resultados. Puntos de corte

Los resultados obtenidos fueron interpretados teniendo en cuenta los puntos de corte clínicos vigentes para las especies de *Candida* definidos por el EUCAST en el documento Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents. <http://www.eucast.org>.

No obstante, en el documento del EUCAST no se incluyen los puntos de corte para todos los antifúngicos probados en este estudio, por lo tanto, no fue posible realizar la interpretación categórica para todos, y para esos antifúngicos se informó el valor numérico de la CIM. (Tabla 8).

Para cada antifúngico se definieron, además, el rango (intervalo entre el valor CIM mínimo y máximo); la moda (valor que se repitió con mayor frecuencia en cada distribución de datos por antifúngico); la CIM 50 (concentración que inhibe a 50 % de la población evaluada) y la CIM 90 (concentración que inhibe a 90 % de la población evaluada).

Tabla 8. Puntos de corte clínico para *Candida* spp. frente a fluconazol e itraconazol\*

Especies	Drogas	Puntos de corte clínico CIM (µg/mL)		
		S≤	I	R>
<i>C. albicans</i>	Fluconazol	2	4	4
	Itraconazol	0.06	-	0.06
<i>C. glabrata</i>	Fluconazol	0.001	16	16
	Itraconazol	ND	-	ND
<i>C. parapsilosis</i>	Fluconazol	2	4	4
	Itraconazol	0.125	-	0.125
<i>C. tropicalis</i>	Fluconazol	2	4	4
	Itraconazol	0.125	-	0.125
<i>C. kusei</i>	Fluconazol	ND	-	ND
	Itraconazol	ND	-	ND

\*Tabla adaptada de Procedures Version 2.0, valid from 2020-09-24. [www.eucast.org](http://www.eucast.org). ≤S/>R: sensible/resistente I: Intermedio. ND: no demostrado.

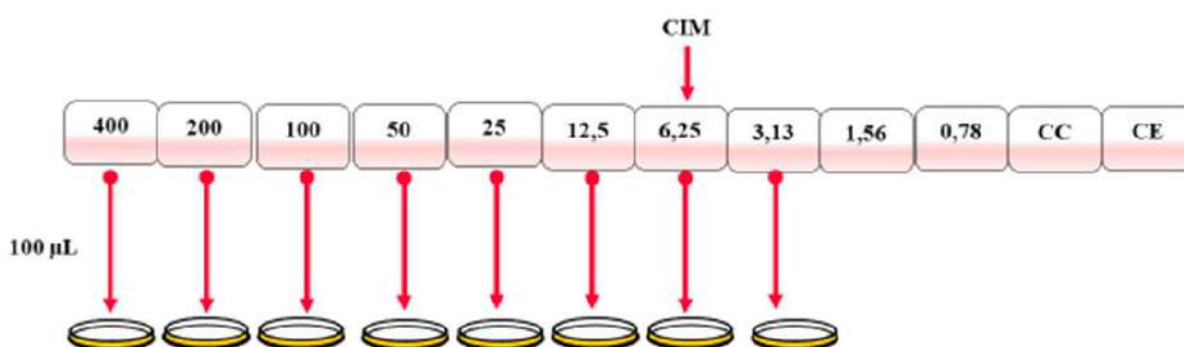
Para los EAHYM no fueron definidos los puntos de corte clínicos, se consideró la lectura de la CIM 50, CIM 90, moda, rango.

### 11. Determinación de la concentración fungicida mínima

Para comprobar la actividad fungicida del EAHYM se determinó la concentración fungicida mínima (CFM) que se define como la menor concentración de un antifúngico capaz de producir la muerte del 99,99 % de los microorganismos en estudio. Su determinación brinda una valiosa información sobre la actividad microbica de un fármaco.

La base de la CFM es la CIM determinada previamente mediante microdilución. Al no existir un estándar para realizar estas determinaciones en levaduras se tomó como base el método que se utiliza en bacterias (CLSI, 1999) y pusimos a punto la técnica que se describe a continuación:

Luego de finalizada la lectura e interpretación de la CIM, se tomó un volumen de 100  $\mu$ L de cada pocillo con inhibición visible del crecimiento incluyendo el pocillo de la CIM y aquel correspondiente a una dilución menor de la CIM y se sembró en placas de Petri con medio YM o Sabouraud (ver Anexo I). **Figura 19.**



**Figura 19.** Esquema que muestra el procedimiento para realizar la determinación de la CFM.

Las placas se incubaron a 35  $^{\circ}$ C durante 48 - 72 h. Se realizó el recuento de UFC/mL.





### 11.1. Interpretación de resultados

Para hongos no existe un método estandarizado para la lectura final de CFM, se consideró la muerte  $>99,9$  % de UFC/mL. La CFM se definió como la menor concentración que produjo una disminución de 1000 veces del número de UFC del inóculo inicial. Se consideró fungicida cuando el cociente CFM:CIM-0 fue  $\leq 4$  y fungistático cuando el cociente fue  $> 4$ . (CLSI, 1999; Pfaller, 2004).

70

### 12. Método de sensibilidad por difusión en agar (Método cualitativo):

Se trabajó según documento estándar M44-A3 del CLSI (CLSI, 2018).

#### 12.1 Medio de cultivo

El medio utilizado fue Müller-Hinton (Difco, Buenos Aires, Argentina) con modificaciones (MHM). Se agregó 2 % de glucosa y azul de metileno, pH entre 7,2 -7,4 a 25 °C, una vez esterilizado fue dispensado en placa de Petri estéril de 90 mm de diámetro, a razón de un volumen de 25 mL aproximadamente en cada una, hasta alcanzar una altura de agar de 4 mm.

#### 12.2 Reactivos utilizados

Se utilizaron discos Malbrán, discos Oxoid y tabletas Neo-Sensitabs™ cargados con concentraciones fijas de antifúngicos.

Para las tabletas Neo-Sensitabs™ la potencia para cada antifúngico cargado y los puntos de corte se muestran en la **Tabla 9**.



Tabla 9. Puntos de corte definidos para las tabletas Neo-Sensitabs™. Rosco

EUCAST-and CLSI potency NEO-SENSITABS™ Interpretation Zones and MIC Breakpoints according to CLSI			- Document: 3.15.0			Break-points MIC µg/ml	
NEO-SENSITABS	POTENCY	CODE	Zone diameter in mm			S	R
			S	I	R	S	R
Amphotericin B	10 µg	AMPHO	≥ 15	14-10	< 10	≤ 1	> 1
Caspofungin *) (24)	5 µg	CASP5	≥ 17	16-15	≤ 14	≤ 0.25	> 0.5
C. albicans, C. tropicalis, C. krusei C. parapsilosis, * C. guilliermondii C. glabrata			≥ 16	≥ 13	≤ 10	≤ 0.12	> 0.25
Fluconazole **) (27)	25 µg	FLUCZ	≥ 17	16-14	≤ 13	≤ 2	> 4
C. albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis C. glabrata			-	≥ 15 (SDD)	≤ 14	≤ 32 (SDD)	> 32
Itraconazole (11)	10 µg	ITRAC	≥ 23	22-14 (SDD)	≤ 13	≤ 0.12	> 0.5
Ketoconazole	15 µg	KETOC	≥ 28	27-21	≤ 20	≤ 0.12	> 0.25
Posaconazole (9,12)	5 µg	POSAC	≥ 17	16-14 (SDD)	≤ 13	≤ 1	> 2
Voriconazole (23)	1 µg	VOR.1	≥ 17	16-15	≤ 14	≤ 0.12	> 0.5
C. albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis C. krusei			≥ 15	14-13	≤ 12	≤ 0.5	> 1
C. glabrata			≥ 16	-	≤ 15	≤ 0.5	> 0.5

71

\*Tabla tomada de www.rosco.dk. S: sensible; I: intermedio; R: resistente.

Los discos Malbrán y los discos Oxoid tienen una carga fija de 25 µg de fluconazol.

### 12.3. Cepas Control de calidad

En todos los ensayos se incluyeron las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Estas cepas tienen puntos de corte definidos solo para los antifúngicos itraconazol y fluconazol. Al no contar con valores de referencia para el clotrimazol, la nistatina y los EAHYM, para cada antimicrobiano se determinó la sensibilidad por difusión en medio sólido 30 veces con el fin de obtener el rango de trabajo. Las determinaciones se realizaron en diferentes días, se registró el rango del valor de halo inhibición para cada agente obtenido a partir de las 30 repeticiones.

### 12.4. Preparación y siembra del inóculo

Las levaduras en estudio fueron reaisladas en placas de Petri con agar YM. Luego de 24 h de incubación a 35 ± 2 °C se tomaron 5 colonias de alrededor



## MATERIALES Y METODOS

de 1 mm de diámetro y se preparó un inóculo de turbidez 0,5 McFarland (aproximadamente  $1-5 \times 10^6$  UCF/mL) en solución 0,145 mol/L de cloruro de sodio estéril (solución salina 0,85 %).

La siembra del inóculo se realizó dentro de los 30 min de preparado mediante hisopado de la placa con agar MHM en tres direcciones. **Foto 3.**

72

### 12.5 Colocación de los discos/tabletas, incubación y lectura

Los procedimientos se realizaron en cabina de seguridad biológica IIB.

Los discos/tabletas se tomaron con ayuda de pinza estéril, de punta fina y se procedió a colocar los discos/tabletas cargados con antifúngicos respetando los márgenes de +/- 20 mm desde el borde y cuando se evaluó más de un antifúngico se consideró la distancia de 40 mm entre cada tableta.

Las placas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C, durante 24 y 48 h, la lectura fue visual y se midió el diámetro del halo de inhibición con regla milimetrada, el valor numérico obtenido se expresó en mm.

Para los azoles se tomó en cuenta el halo más externo; las colonias más pequeñas que desarrollaron dentro de la zona de inhibición fueron por crecimiento residual o de arrastre, conocido como “trailing”, no se las consideró como mutantes resistentes.

Para la nistatina, por ser una droga fungicida, la presencia de colonias dentro del halo de inhibición fue considerada como no sensible.



**Foto 3.** Medida de la densidad óptica de los inóculos y colocación de los discos de antifúngicos.



### 12.6. Interpretación de los resultados

Para las tabletas Neo-Sensitabs™ se tuvieron en cuenta los puntos de corte propuestos por Rosco en el Documento 3.15.0 para *Candida* spp. ([www.rosco.dk](http://www.rosco.dk)) (**Tabla N° A**), para los discos Malbrán se usaron los puntos de corte definidos por Rodero y col, 2006 y para los discos Oxoid se usaron los puntos de corte definidos en el documento M60 2nd ed. del CLSI (CLSI, 2020).

73

### 13. Análisis estadístico combinación antifúngicos/especie

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el software Stagraphics Centurion XV (2009) y el MS Excel software.

Se realizó un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados (coeficiente de correlación de Pearson), mediante el registro de los diámetros de la zona de inhibición versus sus respectivos valores de CIM (después de la transformación logarítmica). El valor de la CIM para cada combinación antifúngico/especie se correlacionó con el diámetro de la zona de inhibición (en milímetros).

La asociación entre ambos métodos se representó en gráficos de dispersión, en el eje X se representó el Log<sub>2</sub> del valor de la CIM y en el eje Y se registraron los valores del halo de inhibición (en mm).

Las discrepancias entre el método de referencia y el método por difusión en agar se clasificaron como:

- **Discrepancia muy mayor:** (DMM) cuando la levadura fue categorizada como resistente por método de dilución y como sensible por el método de difusión.
- **Discrepancia mayor** (DM) cuando la levadura fue categorizada como sensible por método de dilución y como resistente por el método de difusión.
- **Discrepancia menor** (Dm) cuando la levadura fue categorizada como sensible o resistente por el método de dilución y como sensible dependiente de dosis o viceversa, por el método de difusión.



### 14- Determinación de la sensibilidad por difusión en agar con discos de papel cargados con EAHYM

Se utilizó la técnica descrita en el documento M44 3rd ed. del CLSI según se describió en el punto 14 de esta sección. Como agente antifúngico se utilizó el EAHYM preparado como se describe en el punto 12.3. Como reservorio se utilizaron discos de papel Whatman N°1 de 9 mm de diámetro.

74

#### 14.1. Preparación y carga de los discos con EAHYM

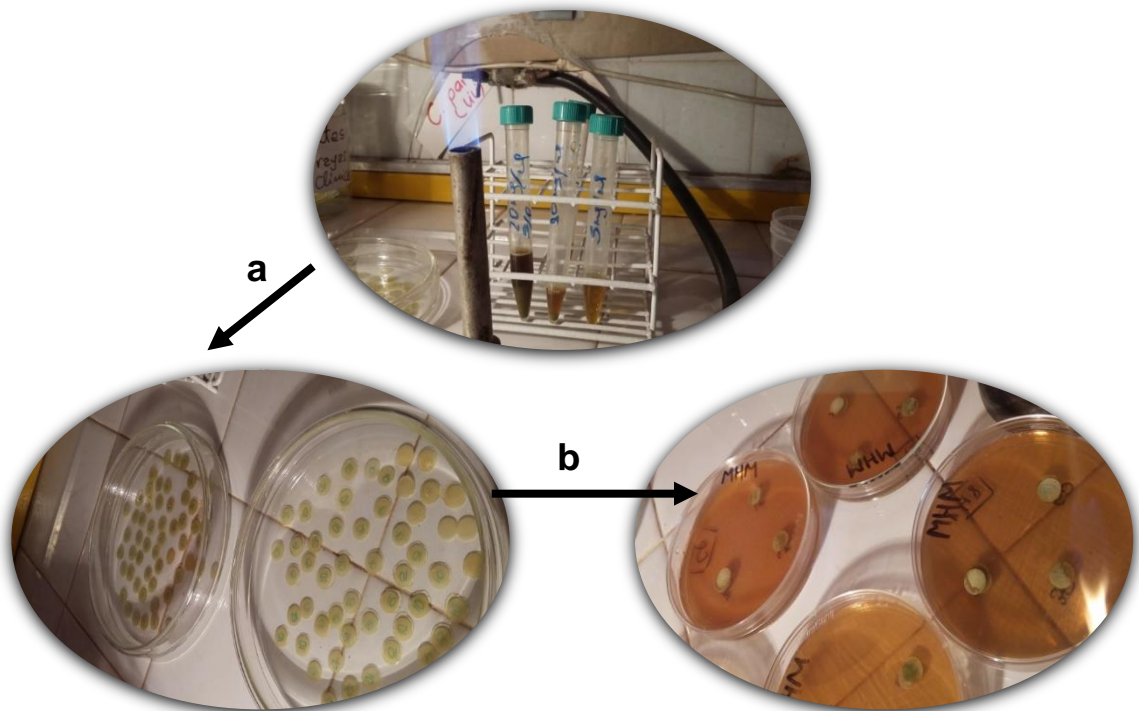
Los discos de papel Whatman Nro 1 se separaron en 3 lotes y se rotularon con el valor de la concentración con la que se iban a cargar, se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 15 min. Se los dejó secar en estufa a 37 °C.

Cada disco recibió 20 µL de las concentraciones del EAHYM a ensayar: 20 mg/mL, 10 mg/mL y 5 mg/mL. La elección de las concentraciones se basó en el rango de acción y los datos obtenidos previamente a partir de la CIM realizada con los EAHYM. Los discos cargados se resguardaron en desecador en estufa a 37 °C durante 48 h.

**Control de esterilidad:** se tomaron 5 discos de cada concentración del EAHYM y se colocaron sobre placas cargadas con medio sólido Mueller-Hinton, se incubaron a 35 ±2°C, durante 48 h. Al cabo de ese tiempo se verificó la esterilidad de cada lote de reactivos al no evidenciar desarrollo de microorganismos contaminantes alrededor de los discos.

Una vez que se comprobó la esterilidad, los lotes de discos se conservaron en cámara fría (4 °C), en oscuridad.

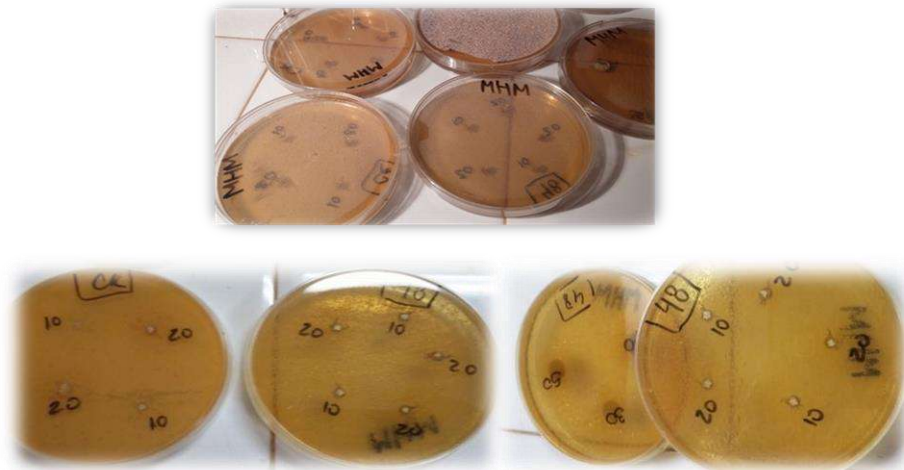
En la **Foto 4** se muestra el algoritmo de trabajo para cargar los discos y para el control de esterilidad.



**Foto 4.** a-Carga de discos con distintas concentraciones de EAHYM; b-Control de esterilidad, se colocan los discos sobre medio Mueller Hinton, se incuban y se verifica la esterilidad del reactivo al no evidenciar desarrollo de microorganismos contaminantes alrededor de los discos.

Además de la carga de discos con EAHYM se ensayó la técnica de difusión realizando hoyos de 7 mm de diámetro en la superficie del agar Mueller Hinton previamente hisopado con el inóculo de la levadura en estudio.

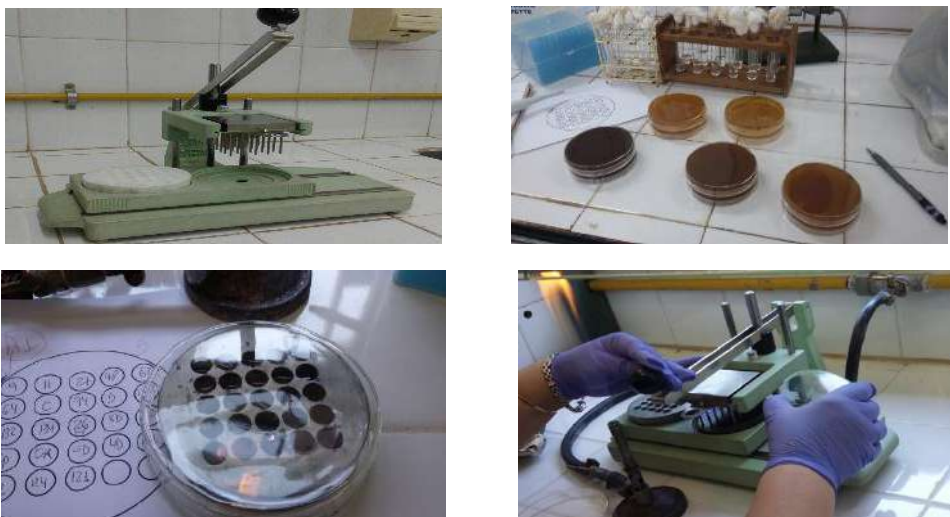
Los hoyos se cargaron con las distintas concentraciones del EAHYM preparadas. **Foto 5.**



**Foto 5.** Difusión en agar de extractos de yerba mate en hoyos.

#### 14.2. Técnica por multi inoculación

Se prepararon placas con 25 mL de agar MHM + concentración final de EAHYM de 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL y 2,5 mg/mL. La siembra del inóculo de las levaduras se realizó con micro inoculador (Cetin), gentilmente cedido por la Cátedra de Bacteriología. FCEQyN. UNaM. Los ensayos se realizaron por duplicado. **Foto 6.**



**Foto 6.** Multi inoculador, cajas de Petri con las distintas diluciones del EAHYM, plantilla de siembra, siembra por multi inoculación.



## **MATERIALES Y METODOS**

### **15- Resguardo de cepas**

Las cepas estudiadas se resguardaron por duplicado en medio Castellani y agar agua a temperatura ambiente y a 4°C

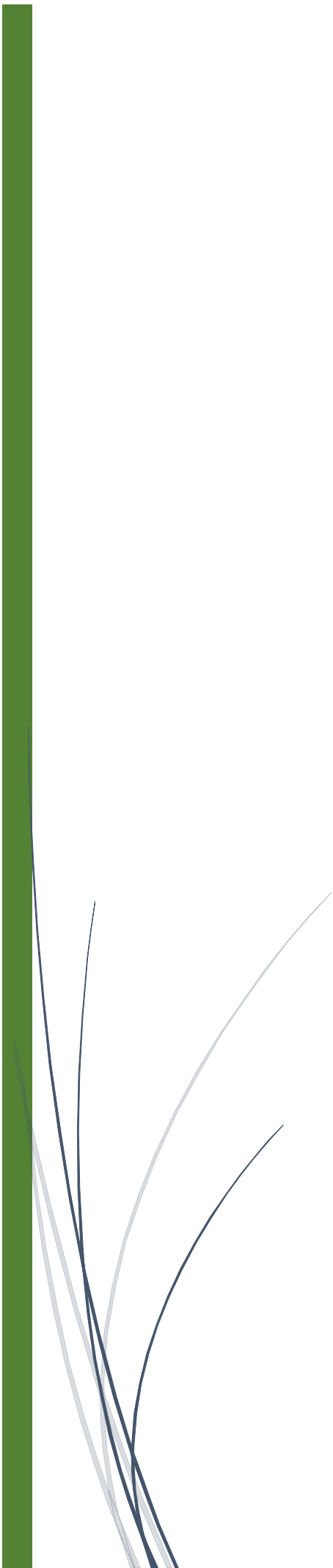
### **16- Análisis estadístico antifúngicos convencionales – extractos vegetales**

Para comparar los porcentajes de inhibición de desarrollo levaduriforme obtenidos con los antifúngicos convencionales y los extractos vegetales ensayados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y un test a posteriori de comparación de medias (diseño factorial de una variable) utilizando el software Stagraphics Centurion XV (2009) (STATGRAPHIC, 2009).



# RESULTADOS

## CAPITULO 3





## **RESULTADOS**

Durante el periodo enero /2015 - diciembre/2017 se aislaron y recuperaron 139 cepas de hongos levaduriformes a partir de exudados vaginales de 133 mujeres con manifestación clínica de ardor, dolor, flujo vaginal y prurito vulvar. El rango etario de las pacientes era de 15 a 50 años, el 33 % se encontraba entre las 30 y 35 semanas de gestación, lo que indica que es un estado fisiológico que predispone a padecer episodios de CVV.

En las instituciones de origen se realizó el examen microscópico del flujo vaginal. Los resultados de la observación microscópica se volcaron en registros con los datos filiatorios encriptados para evitar la trazabilidad.

Cada levadura derivada para su estudio estuvo acompañada con su respectivo registro y allí se detallaron las características del flujo vaginal de cada paciente.

De acuerdo a los registros, en general se observó disminución o ausencia de lactobacilos, presencia de abundantes polimorfonucleares neutrófilos, blastoconidios y/o pseudomicelios y predominio de biota bacteriana Gram negativa.

- ***Pruebas para la identificación fenotípica de las levaduras***

La identificación fenotípica se realizó mediante el estudio de las características fisiológicas, culturales y microscópicas. **(Foto 7)**.

### **-Crecimiento a 28 °C y 37 °C**

El primo aislamiento se realizó en agar YM, todos los aislados desarrollaron tanto a 28 °C como a 37 °C, 138/139 formaron colonias cremosas, color blanco, crema, sin producción de pigmentos, aspecto húmedo, brillantes, bordes lisos y enteros, en general de forma circular, de aproximadamente 4-6 mm al cabo de 7 días de incubación.

Solo 1/139 aislado formó una colonia color crema, con textura rugosa, seca, opaca, con tamaño de 8-10 mm al cabo de 7 días de incubación.

### **-Crecimiento en medio cromógeno**

Todas las levaduras desarrollaron en agar cromógeno y mostraron distintos colores: verde, azul-violáceo, crema, blanco, todas de aspecto cremoso, húmedo, mientras que la colonia de color rosa con centro púrpura mostro textura rugosa, seca.



## RESULTADOS

Las levaduras que presentaron color verde (111/139) fueron identificadas presuntivamente como complejo *C. albicans*, las que presentaron color azul-violáceo (6/139) como *C. tropicalis*, la color rosa-púrpura (1/139) como *C. krusei*, mientras que a las levaduras que presentaron color crema o púrpura (21/139) no fue posible asignarles una identificación presuntiva. Con el medio cromogénico fue posible detectar asociación en cuatro pacientes entre *C. albicans* y *C. glabrata* y entre *C. albicans* y complejo *C. parapsilosis*; y en dos pacientes con recidiva se presentó asociación entre *C. albicans* y *C. glabrata*.

### -Prueba de Reynolds-Braude

La formación de los tubos germinativos en suero bovino se observó en 111/139 aislados, se manifestó como una prolongación digitiforme a partir de la célula levaduriforme y permitió identificar a estas levaduras, en forma presuntiva, como complejo *C. albicans* (**Foto 7 a**).

### -Cultivos

Para los 111/139 aislados que resultaron positivos para la formación de tubo germinativo y dieron color verde en el medio CHROMagar se ensayaron las siguientes pruebas con el fin de diferenciar presuntivamente a *C. albicans* de *C. dubliniensis*:

**Medio Pal:** se observó el desarrollo de colonias cremosas, de tonalidad gris verdosa y bordes lisos, presuntivamente correspondientes a *C. albicans*. (**Foto 7 b**).

**Formación de clamidoconidios:** se usaron los medios de cultivo ATZ, medio AL y el medio ATM.

En los medios de cultivo ATM y ATZ no se obtuvo formación de clamidoconidios, corresponde presuntivamente a *C. albicans*.

En el medio AL el 20 % (22/111) de las levaduras ensayadas no formó clamidoconidios. Si bien la mayoría de los aislados formó clamidoconidios (80 %), se observaron diferencias en la presentación y agrupación en el pseudomicelio, en el 72,5 % los clamidoconidios fueron terminales y únicos, mientras que en el 7,2 % fueron terminales y múltiples. **Tabla 11**.

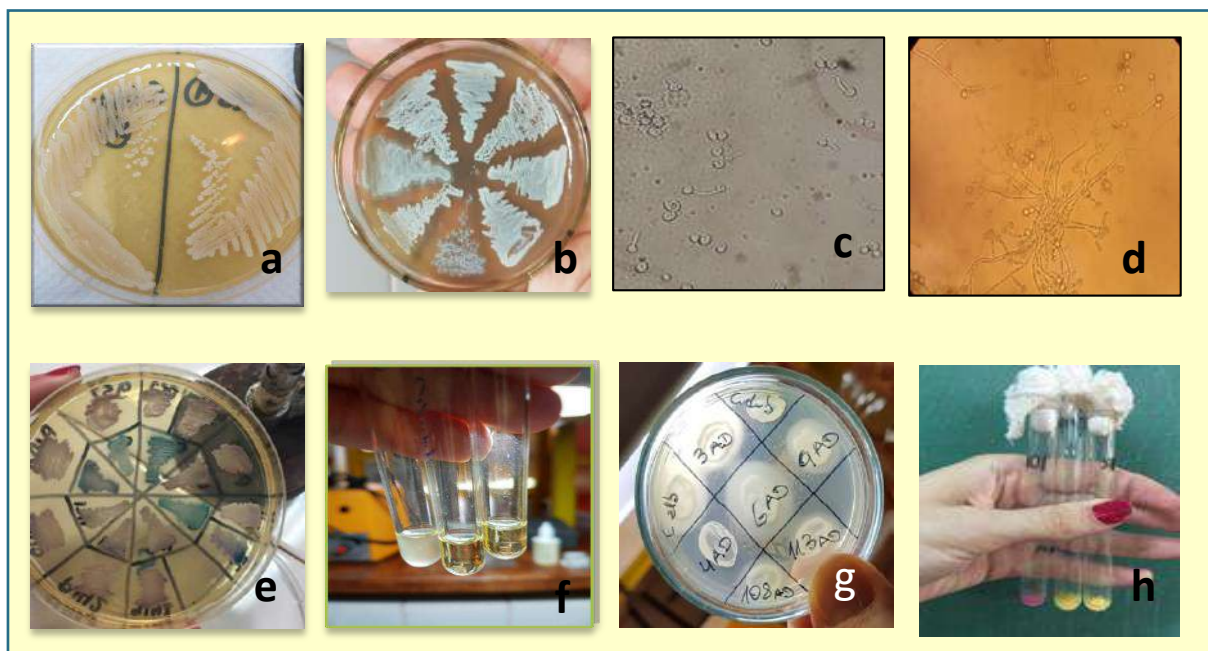
Con respecto a las pruebas fisiológicas, el 100 % de las levaduras identificadas presuntivamente como *C. albicans* formaron halo de opacidad alrededor de la colonia en el medio opacidad, no produjeron fenoloxidasa, formaron

## RESULTADOS

colonias blancas lisas y brillantes en medio ATM, mientras que solo un 42 % desarrolló turbidez en el caldo hipertónico. **Tabla 11.**

**Prueba de trehalosa:** 12/139 (8,63 %) aislados dieron prueba positiva y se las identificó presuntivamente como pertenecientes al complejo *C. glabrata*. **Tabla 10.**

En la **Foto 7** se muestran imágenes de la macro-micromorfología y pruebas fisiológicas.



**Foto 7.** a-Colonias cremosas, cultivo en agar YM a 28 °C; b- Macromorfología en agar Pal, colonias lisas; c-Formación del tubo germinal en suero bovino; d-Formación de clamidoconidios en agar tomate zanahoria; e- Cultivo en agar cromogénico; f- Presencia de turbidez en caldo hipertónico; g- Detección de actividad lipasa; h-Prueba de trehalosa.



## RESULTADOS

**Tabla 10.** Identificación presuntiva de levaduras aisladas de flujo vaginal, características morfológicas y fisiológicas

Especies	n	28 y 37 °C	Textura	CHROM	T. G	PSM	Tre
Complejo <i>C. albicans</i>	111	SI	Cremosa	Verde claro/verde oscuro	SI	SI	NO
Complejo <i>C. glabrata</i>	12	SI	Cremosa	Lila-blanca	NO	NO	SI
<i>C. tropicalis</i>	6	SI	Cremosa	Azul	NO	SI	NO
<i>S. cerevisiae</i>	5	SI	Cremosa	Violeta- púrpura	NO	NO	NO
Complejo <i>C. parapsilosis</i>	4	SI	Cremosa	Rosa- crema	NO	SI	NO
<i>C. krusei</i>	1	SI	Seca- rugosa	Rosa/púrp ura	NO	SI	NO

TG: tubo germinativo; CHROM: Cultivo en CHROMagar; PSM: pseudomicelio; Tre: asimilación de trehalosa.



## RESULTADOS

**Tabla 11** Pruebas diferenciales para identificación fenotípica *C. albicans* - *C. dubliniensis*

Especies	TG	CHROMagar	CLAM (AL)	CLAM (ATM)	CLAM (ATZ)	Lipasa (MO)	ATM-FO	Caldo hipertónico	Agar Pal
<i>Candida albicans</i> (DMic 982873)	SI	Verde esmeralda	Terminales	No forma	No forma	Halo	B/L/B	Turbidez	Colonias gris verdoso/ bordes regulares
<i>Candida dubliniensis</i> (DMic 93695)	SI	Verde oscuro	Agrupadas	Abundantes	Escasos	No-halo	D/R/O	No turbidez	Colonias gris verdoso/bordes festoneados - filamentosos
Complejo <i>C. albicans</i> n=111	SI	108 (97 %) verde esmeralda, 3 (3 %) verde claro	81 (72,5 %) clamidoconidios terminales únicos	100 % no formó clamidoconidios	100 % no formó clamidoconidios	100 % halo alrededor de la colonia	100 % colonias color blanco, liso y brillante	47 (42 %) desarrolló turbidez en el caldo	100 % Colonias gris verdoso, de bordes regulares
			8 (7,2 %) clamidoconidios terminales múltiples					64 (58 %) no desarrolló turbidez	
			22 (20 %) no desarrolló clamidoconidios						

TG: tubo germinativo; CLAM (AL): formación de clamidoconidios en agar leche; CLAM (ATM): formación de clamidoconidios en agar tabaco modificado; CLAM (ATZ): formación de clamidoconidios en agar tomate zanahoria; Lipasa (MO): actividad lipasa en medio opacidad; ATM-FO: agar tabaco modificado para evaluar producción de fenoloxidasas; B/L/B: blanca/lisa/brillante; D/R/O: dorada/rugosa/opaca.

Del total de muestras evaluadas, 134/139 (96 %) cepas correspondieron a hongos levaduriformes del género *Candida* y 5/139 (4 %) al género *Saccharomyces*.

El mayor número correspondió al complejo *C. albicans* 82,8 % (111/134), seguido por el complejo *C. glabrata* 8,9 % (12/134), *C. tropicalis* 4,4 % (6/134), complejo *C. parapsilosis* 2,9 % (4/134) y *C. krusei* 0,7 % (1/134). **(Gráfico1)**



## RESULTADOS

En cuatro pacientes se observó infección mixta entre los complejos *C. albicans* y *C. glabrata*, y entre los complejos *C. albicans* y *C. parapsilosis*; y en dos pacientes con recidiva se presentó asociación entre los complejos *C. albicans* y *C. glabrata*.

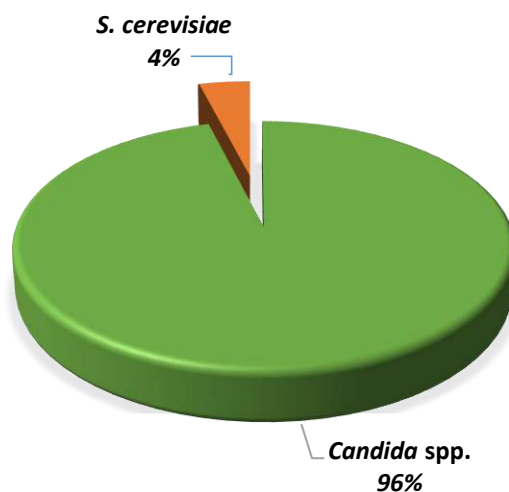


Gráfico 1. Total de aislados levaduriformes identificados en forma presuntiva

Las cepas identificadas fueron resguardadas por duplicado en medio Castellani a temperatura ambiente y a 4 °C.

- **Identificación con técnicas de proteómica:**

### Validación de la identificación fenotípica de las levaduras

En el Laboratorio de Referencia del INEIA “Dr. C. G. Malbran”, se validó la identificación fenotípica de las 139 levaduras por el método de espectrometría de masas, MALDI-TOF-MS.

Del total de cepas evaluadas hubo una coincidencia del 97 % (135/139) entre la identificación fenotípica y la validación por Maldi-Tof (ver anexo).

La discrepancia entre ambos métodos se observó en los complejos de especies de *C. albicans* (3/111), *C. glabrata* (1/12) y *C. parapsilosis* (1/4).

Con las pruebas fenotípicas no fue posible identificar a las especies crípticas *C. nivariensis* ni a *C. metapsilosis*. (ANEXO). Los resultados se muestran en la **Tabla 12**.



## RESULTADOS

**Tabla 12.** Identificación de levaduras por métodos fenotípicos y por espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Género y especie	Nro de cepas	Identificación fenotípica*	Maldi-Tof
<i>Candida albicans</i>	111	108 (97 %)	111 (100 %)
<i>Candida glabrata</i>	11	11 (100 %)	11 (100 %)
<i>Candida nivariensis</i>	1	0	1 (100 %)
<i>Candida tropicalis</i>	6	6 (100 %)	6 (100 %)
<i>Candida parapsilosis</i>	3	3 (100 %)	3 (100 %)
<i>Candida metapsilosis</i>	1	0	1 (100 %)
<i>Candida krusei</i>	1	1 (100 %)	1 (100 %)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5	5 (100 %)	5 (100 %)

\* Porcentaje de identificación correcta entre paréntesis

- **Identificación molecular**

Por este método fueron identificadas 2 especies crípticas: 1/12 cepas como *C. nivariensis* perteneciente al complejo *C. glabrata* y 1/4 cepas como *C. metapsilosis* perteneciente al complejo *C. parapsilosis*.

Los productos de amplificación por PCR fueron enviados a purificar y secuenciar a MacroGen Korea. Luego de su procesamiento y evaluación, las secuencias obtenidas concuerdan con las descriptas en las bases de datos para diferentes aislados del género *Candida*.

La cepa codificada como 26 presentó índices de identidad y similitud del 100 % con la especie *C. metapsilosis* en ambas bases de datos (**Figura 20 y Figura 21**)





## RESULTADOS

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI Sign In Register

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Candida metapsilosis culture-collection CBS:10907 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequen</a>	959	959	100%	0.0	100%	<a href="#">KY102203.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Candida metapsilosis strain TN571D13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib</a>	959	959	100%	0.0	100%	<a href="#">KX421284.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Candida metapsilosis strain TN172U12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib</a>	959	959	100%	0.0	100%	<a href="#">KU665251.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Candida metapsilosis strain TN483HC13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcri</a>	959	959	100%	0.0	100%	<a href="#">KU665250.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Candida metapsilosis strain ATCC 96144 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcri</a>	959	959	100%	0.0	100%	<a href="#">KC777380.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Candida metapsilosis strain Meta/M-18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib</a>	959	959	100%	0.0	100%	<a href="#">KC777375.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Candida metapsilosis strain LEM18448 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib</a>	959	959	100%	0.0	100%	<a href="#">JQ585714.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Candida metapsilosis strain IPO911012 isolate ISHAM-ITS ID MITS869 18S ribosomal RNA gene, pa</a>	959	959	100%	0.0	100%	<a href="#">GQ152297.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Candida metapsilosis strain CBS 10907 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib</a>	959	959	100%	0.0	100%	<a href="#">FJ872019.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Candida metapsilosis strain UM6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spa</a>	959	959	100%	0.0	100%	<a href="#">FJ515200.1</a>

**Figura 20.** Cepa 26, resultado del análisis de identidad y similitud realizado con la herramienta BLASTn del NCBI.

Fungal Barcoding International Fungal Working Group

Pairwise Results Clustering results

#	Reference description	Score	Probability	Similarity	Fragment	Overlap%	Direction	Rating
1	WM 01.56 WM 01.56 Candida metapsilosis, NLink390: ITS FunBOLD	824.181	0	100	1	100	+/-	*****
2	FJ872019 FJ872019 Candida metapsilosis, NLink390: ITS FunBOLD	824.181	0	100	1	100	+/-	*****
3	KC777380 KC777380 Candida metapsilosis, NLink390: ITS FunBOLD	824.181	0	100	1	100	+/-	*****

**Figura 21.:** Cepa 26. Resultado obtenido del análisis realizado mediante la base de datos *Fungal barcoding*

La cepa codificada como 11B presentó índices de identidad y similitud del 100 % con la especie *Candida caseinolytica* en ambas bases de datos; y del 99 %



## RESULTADOS

y 98,5 % con la especie *C. nivariensis* en la base de datos del NCBI y del *Fungal barcoding* respectivamente (**Figura 22 y Figura 23**).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Tortispora caseinolytica culture-collection CBS:7781 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequen</a>	1234	1234	100%	0.0	100%	<a href="#">KY105610.1</a>
<a href="#">Candida nivariensis strain DMic962066 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal</a>	1229	1229	100%	0.0	99%	<a href="#">KP050607.1</a>
<a href="#">Candida nivariensis strain 8Q3301/INCA 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribe</a>	1229	1229	100%	0.0	99%	<a href="#">KJ957824.1</a>
<a href="#">Candida nivariensis strain IDR1100006010 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso</a>	1229	1229	100%	0.0	99%	<a href="#">JN675320.1</a>
<a href="#">Candida nivariensis strain IDR1100004444 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso</a>	1229	1229	100%	0.0	99%	<a href="#">JN675319.1</a>
<a href="#">Candida nivariensis strain IDR1100004443 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso</a>	1229	1229	100%	0.0	99%	<a href="#">JN675318.1</a>
<a href="#">Candida nivariensis strain NRRL Y-40269 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrip</a>	1229	1229	100%	0.0	99%	<a href="#">JN802341.1</a>

**Figura 22.** Cepa 11B. Resultado del análisis de identidad y similitud realizado con la herramienta BLASTn del NCBI.

#	Reference description	Score	Probability	Similarity	Fragment	Overlap%	Direction	Rating
1	CBS 7781 Candida nivariensis, NLink390: ITS FunBOLD	1060.34	0	100	1	100	+/-	*****
2	JN882341 Candida nivariensis, NLink390: ITS FunBOLD	1044.49	0	100	1	98.503	+/-	*****
3	CBS 9985 ex 12189 its Candida nivariensis, NLink390: ITS FunBOLD	1044.49	0	100	1	98.503	+/-	*****

**Figura 23.** Cepa 11B. Resultado obtenido del análisis realizado mediante la base de datos *Fungal barcoding*.

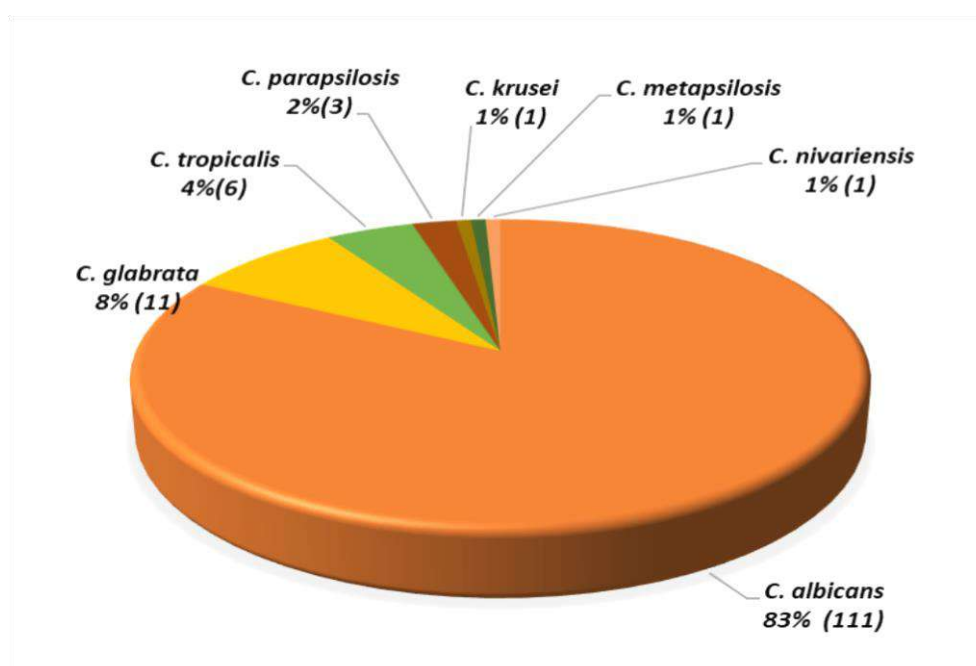
La confirmación de *C. nivariensis* y *C. metapsilosis*, se realizó por secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosomal, en el Laboratorio de Referencia, que informó: (ver Anexo).



## RESULTADOS

- cepa 11B: *Candida nivariensis*. Sec regiones ITS: L16-814 (ITS1, primer forward) y L16-820 (ITS4, primer reverse).
- cepa 26: *Candida metapsilosis*. Sec regiones ITS: L16-848 (ITS1, primer forward) y L16-858 (ITS4, primer reverse)

El número y porcentaje de especies identificadas fenotípica y molecularmente se muestran en el **Gráfico 2**.



**Gráfico 2.** Identificación definitiva de levaduras del género *Candida*.  
Distribución de las especies

- **Obtención de extractos de hojas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Yerba mate)**

Se utilizó un total de 25 g de las hojas de yerba mate trituradas para realizar la decocción, y se obtuvieron 500 mL del extracto acuoso al 5 %. El recuperó se liofilizó y se obtuvieron 30,87 g. Todo el trabajo experimental se llevó a cabo con el mismo lote de producto liofilizado.

## RESULTADOS

El liofilizado presentó características organolépticas tales como: aspecto de polvo fino, de color verde claro, olor característico y poco higroscópico, de buena solubilidad en solvente agua destilada. **Foto 8.**



Foto 8. EAHYM liofilizado. Fuente propia

- **Determinación del contenido de polifenoles totales**

Las determinaciones fisicoquímicas se realizaron en base a las normas ISO/FDIS 14502- 1:2004 (E), y evidenciaron un contenido de **polifenoles totales de 243, 7 mg/g bh EAG** (bh: base húmeda EAG: Equivalente a ácido gálico). (Informe en Anexo). En el **Gráfico 3** se observa la curva de calibración obtenida en función de ácido gálico.

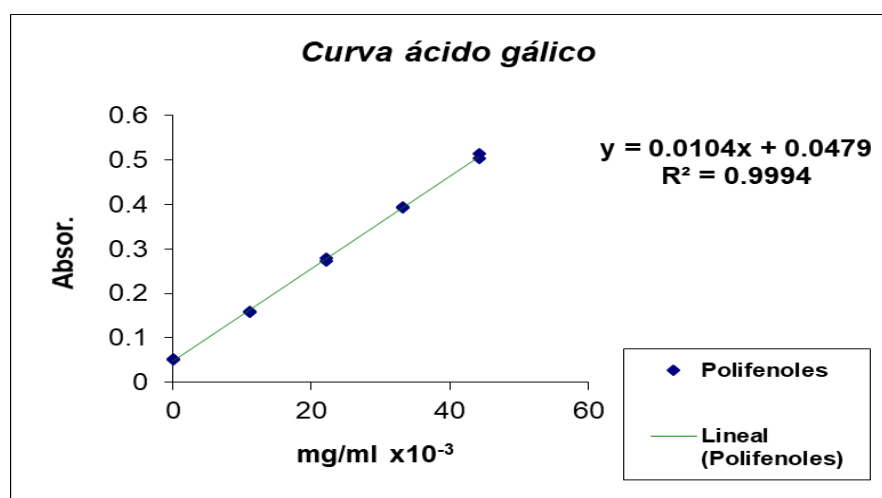


Gráfico 3. Curva de absorbancia del ácido gálico



- **Determinación de la concentración inhibitoria mínima por dilución de agentes antifúngicos y EAHYM frente a levaduras**

La determinación de la CIM se realizó de acuerdo al documento EDEF 7.3.2 del EUCAST, detallado en material y métodos.

Se evaluó la actividad *in vitro* de fluconazol, itraconazol, clotrimazol, nistatina y yerba mate frente a 139 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal.

Para los antifúngicos itraconazol y fluconazol se asignaron las categorías definidas en el documento Breakpoint versión 2.0 del EUCAST.

**Cepas control:**

Los valores de la CIM de las cepas de referencia *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 frente a los antifúngicos fluconazol y para el itraconazol se encontraron dentro de los valores esperados. Para el clotrimazol, la nistatina y el EAHYM se registraron la CIM moda de 30 repeticiones. **Tabla 13.**

**Tabla 13.** Valores de CIM de las cepas de referencia frente a los antifúngicos y EAHYM

Cepas control	Valor del de CIM para las cepas de referencia µg/mL				
	FLZ	CLZ*	ITZ	NIS*	EAHMY* 3
<i>C. krusei</i> <sup>1</sup>	32	0,03	0,06	1	100
<i>C. krusei</i> <sup>1</sup> #	16 - 64	ND	0,03 - 0,125	ND	ND
<i>C. parapsilosis</i> <sup>2</sup>	1	0,03	0,06	1	200
<i>C. parapsilosis</i> <sup>2</sup> #	0,5 – 2	ND	0,03 – 0,125	ND	ND

1- ATCC 6258; 2- ATCC 22019; 3-valor expresado en **mg/mL**; FLZ: fluconazol; CLZ: clotrimazol; ITZ: itraconazol; NIS: nistatina; EAHYM: extracto acuoso de hojas de yerba mate; CIM: concentración inhibitoria mínima; ND: no definido.

\*La determinación de la CIM se realizó 30 veces, se registró la CIM moda.

# Rango establecido en el Documento EUCAST AFST QC Tables v. 4.0, valid from 2020-02-04 para las cepas de referencia.



## RESULTADOS

### • **Determinación de la CIM de itraconazol y fluconazol**

Al realizar el análisis para cada combinación antifúngico/microorganismo, observamos que para el itraconazol, el 89,1 % de los aislados de *C. albicans* mostraron una CIM  $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$  (sensible), y el 10,8 %  $> 0,06 \mu\text{g/mL}$  (resistente) y para el fluconazol el 94,6 % de los aislados mostró una CIM  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  (sensible), el 2,7 % una CIM de  $4 \mu\text{g/mL}$  (intermedio) y 2,7 %  $> 4 \mu\text{g/mL}$  (resistente).

Por su parte, para *C. glabrata* no hay puntos de corte clínicos definidos frente al itraconazol, por lo tanto, no fue posible asignar las categorías de sensible/resistente. Observamos que 9 cepas (81,8 %) mostraron una CIM de  $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$  y 2 cepas (1,8 %) una CIM de 0,25 y  $0,5 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Mientras que la especie críptica *C. nivariensis* tuvo una CIM de  $0,5 \mu\text{g/mL}$ .

En cuanto al fluconazol frente a *C. glabrata*, el 72,7 % de los aislados mostró una CIM entre  $0,25 - 16 \mu\text{g/mL}$  (intermedio) y el 27,3 % manifestó una CIM  $> 16 \mu\text{g/mL}$  (resistente).

La cepa de *C. nivariensis* tuvo una CIM  $> 16 \mu\text{g/mL}$ , para esta especie no se definieron los puntos de corte clínicos frente al fluconazol, no obstante, se considera resistente por pertenecer al complejo *C. glabrata*.

El 83,3 % de las *C. tropicalis* mostraron una CIM  $\leq 0,125 \mu\text{g/mL}$  (sensible), y el 16,6 %  $> 0,125 \mu\text{g/mL}$  (resistente) frente al itraconazol. Para el fluconazol el 83,3 % de las cepas mostró una CIM  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  (sensible) y el 16,6 %  $> 4 \mu\text{g/mL}$  (resistente).

Para el itraconazol, el 100 % de los aislados de *C. parapsilosis* mostraron un valor de CIM  $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$  (sensible). Del mismo modo, la cepa críptica *C. metapsilosis* tuvo una CIM de  $0,06 \mu\text{g/mL}$ , para esta especie no se definieron los puntos de corte clínicos frente al itraconazol, no obstante, se considera sensible por pertenecer al complejo *C. parapsilosis*.

Para el fluconazol el 66,7 % de *C. parapsilosis* mostró una CIM  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  (sensible) y el 33,3 %  $> 4 \mu\text{g/mL}$  (resistente) y para *C. metapsilosis* la CIM fue de  $1 \mu\text{g/mL}$  (sensible), para esta especie no se definieron los puntos de corte clínicos frente al fluconazol, no obstante, se considera sensible por pertenecer al complejo *C. parapsilosis*. **Tabla 14 y Tabla 15.**



## RESULTADOS

**Tabla 14.** Distribución de valores de CIM y porcentaje acumulado de inhibición de itraconazol y fluconazol para las levaduras aisladas de flujo vaginal.

Antifúngicos	Especies	Distribución de valores de CIM $\mu\text{g/mL}$ . Número de aislados (porcentaje acumulado de inhibición)														n
		0,008	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	64	256	
Itraconazol	<i>C. albicans</i>	7 (6,3)	34 (36,9)	48 (80,1)	10 (89,1)	9 (97,2)	2 (99)	1 (100)								111
	<i>C. glabrata</i>		2 (18,2)	4 (54,5)	3 (81,8)		1 (90,9)	1 (100)								11
	<i>C. tropicalis</i>			1 (16,6)	3 (66,6)	1 (83,3)		1 (100)								6
	<i>S. cerevisiae</i>		1 (20)	1 (40)			3 (100)									5
	<i>C. parapsilosis</i>		1 (33,3)		2 (100)											3
	<i>C. nivariensis</i>							1								1
	<i>C. metapsilosis</i>				1											1
	<i>C. krusei</i>					1										1
Fluconazol	<i>C. albicans</i>					27 (24,3)	33 (54)	22 (74,6)	10 (83,6)	13 (94,6)	3 (97,3)	1 (98,2)	2 (100)			111
	<i>C. glabrata</i>						2 (18,2)		2 (36,4)	2 (54,5)	1 (63,6)	1 (72,7)	1 (81,8)	2 (100)		11
	<i>C. tropicalis</i>						3 (50)	1 (66,6)	1 (83,3)				1 (100)			6
	<i>S. cerevisiae</i>					2 (40)			1 (60)	1 (80)	1 (100)					5
	<i>C. parapsilosis</i>							1 (33,3)	1 (66,6)			1 (100)				3
	<i>C. nivariensis</i>													1		1
	<i>C. metapsilosis</i>								1							1
	<i>C. krusei</i>												1			1

Las columnas correspondientes a las concentraciones 32  $\mu\text{g/mL}$  y 128  $\mu\text{g/mL}$  fueron eliminadas de la tabla porque ningún aislado fue inhibido en esos valores.



## RESULTADOS

**Tabla 15.** Interpretación categórica para las combinaciones antifúngico/microorganismo que cuentan con puntos de corte definido

Especies	Categoría	Antifúngicos. N (%)	
		Itraconazol	Fluconazol
<i>C. albicans</i> n=111	Sensible	99 (89,1 %)	105 (94,6 %)
	Resistente	1 (10,8 %)	3 (2,7 %)
	SDD	0	3 (2,7 %)
<i>C. glabrata</i> n=11	Sensible	ND	0
	Resistente	ND	4 (36,4 %)
	SDD	ND	7 (63,6 %)
<i>C. nivariensis</i> n=1*	Sensible	ND	0
	Resistente	ND	1
	SDD	ND	0
<i>C. tropicalis</i> n=6	Sensible	4 (83,3 %)	4 (83,3 %)
	Resistente	1 (16,6 %)	1 (16,6 %)
	SDD	0	0
<i>C. parapsilosis</i> n=3	Sensible	3 (100 %)	2 (66,7 %)
	Resistente	0	1 (33,3 %)
	SDD	0	0
<i>C. metapsilosis</i> n=1*	Sensible	1	1
	Resistente	0	0

\*Especies crípticas que asumen el punto de corte definido para la especie tipo del complejo. N (%): número y porcentaje de cepas; SDD: sensible dependiente de dosis; ND: no definido.

Para *C. krusei* no se definieron los puntos de corte clínicos frente al itraconazol, el valor de la CIM fue de 0,125 µg/mL. Esta especie es intrínsecamente resistente al fluconazol, obtuvimos una CIM de 16 µg/mL.

En cuanto a las cepas de *S. cerevisiae*, el 100 % mostró una CIM ≤ 0,125 µg/mL para el itraconazol y una CIM entre 0,125 – 4 µg/mL para el fluconazol.

A la fecha no se definieron puntos de corte clínicos para las combinaciones de *S. cerevisiae*/antifúngicos.





### ● **Determinación de la CIM de clotrimazol y nistatina**

Para los antifúngicos clotrimazol y nistatina no han sido definidos puntos de corte, por lo tanto, no se asignaron categorías de sensible/resistente.

En general, el clotrimazol inhibió el desarrollo del 92,8 % de las cepas en estudio con un valor de CIM  $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$ , mientras que la nistatina inhibió al 100 % de las cepas con un valor de CIM  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ .

Para el clotrimazol, el 97,3 % de *C. albicans* mostraron una CIM  $\leq 0,125 \mu\text{g/mL}$ , y el 2,7 % entre  $0,25 - 1 \mu\text{g/mL}$ ; mientras que para la nistatina 100 % de los aislados mostró una CIM entre  $0,25 - 2 \mu\text{g/mL}$ .

A su vez, para el 91 % de las cepas de *C. glabrata* el clotrimazol mostró una CIM  $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$  y para el 9 %, una CIM de  $0,5 \mu\text{g/mL}$ , al igual que la especie críptica *C. nivariensis* con una CIM de  $0,5 \mu\text{g/mL}$ .

En cuanto a la nistatina, el 91 % de *C. glabrata* mostró una CIM entre  $0,5 - 2 \mu\text{g/mL}$  y el 9 % una CIM de  $0,125 \mu\text{g/mL}$ ; *C. nivariensis* tuvo una CIM de  $2 \mu\text{g/mL}$ .

Para el clotrimazol, el total (100%) de los aislados de *C. tropicalis* mostraron una CIM  $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$ . Con la nistatina el total de los aislados (100%) mostró una CIM entre  $0,5 - 2 \mu\text{g/mL}$ .

El 100 % de las *C. parapsilosis* fueron inhibidas por el clotrimazol con un valor de CIM de  $0,015 \mu\text{g/mL}$ , mientras que para *C. metapsilosis* la CIM fue de  $0,03 \mu\text{g/mL}$ . Con la nistatina el 100 % de *C. parapsilosis* mostró una CIM entre  $1 - 2 \mu\text{g/mL}$  y *C. metapsilosis* una CIM de  $1 \mu\text{g/mL}$ .

Para *C. krusei* el valor de CIM del clotrimazol fue de  $0,06 \mu\text{g/mL}$  y con la nistatina fue de  $0,5 \mu\text{g/mL}$ .

Finalmente, para el 100 % de *S. cerevisiae* el valor de la CIM del clotrimazol fue  $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$ ; mientras que con la nistatina se obtuvo una CIM entre  $0,5 - 1 \mu\text{g/mL}$  para el 80 % de los aislados y para el 20 % restante, una CIM de  $0,125 \mu\text{g/mL}$ .

El análisis general de los valores de CIM para las 139 cepas estudiadas mostró que el clotrimazol fue el antifúngico que mostró mayor actividad antifúngica (CIM  $90 \leq 0,06 \mu\text{g/mL}$ ), mientras que la nistatina fue el antifúngico con menor actividad.

En la **Tabla 16** se muestran los resultados.



## RESULTADOS

**Tabla 16.** Distribución de valores de CIM y porcentaje acumulado de inhibición de clotrimazol y nistatina para las levaduras aisladas de flujo vaginal.

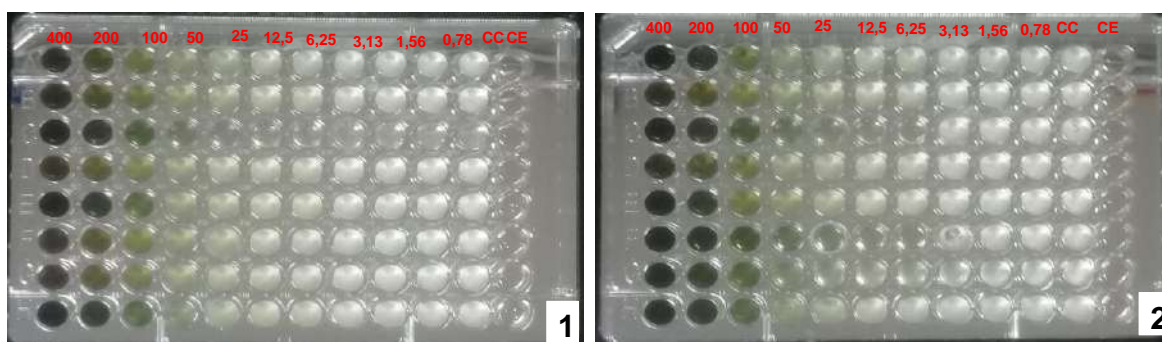
Antifúngicos	Especies	Distribución de valores de CIM $\mu\text{g/mL}$ Número de aislados (porcentaje acumulado de inhibición)									n
		0,008	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	
Clotrimazol	<i>C. albicans</i>		33 (29,7)	56 (80,2)	14 (92,8)	5 (97,3)	1 (98,2)	1 (99,1)	1 (100)		111
	<i>C. glabrata</i>		2 (18,2)	5 (63,6)	3 (91)			1 (100)			11
	<i>C. tropicalis</i>		1 (16,6)	3 (66,6)	2 (100)						6
	<i>S. cerevisiae</i>			2 (40)	3 (100)						5
	<i>C. parapsilosis</i>		3 (100)								3
	<i>C. nivariensis</i>							1			1
	<i>C. metapsilosis</i>			1							1
	<i>C. krusei</i>					1					1
Nistatina	<i>C. albicans</i>						12 (10,8)	28 (36)	52 (82,8)	19 (100)	111
	<i>C. glabrata</i>					1 (9,1)		3 (36,3)	5 (81,8)	2 (100)	11
	<i>C. tropicalis</i>							2 (33,3)	3 (83,3)	1 (100)	6
	<i>S. cerevisiae</i>					1 (20)		1 (40)	3 (100)		5
	<i>C. parapsilosis</i>								1 (33,3)	2 (100)	3
	<i>C. nivariensis</i>									1	1
	<i>C. metapsilosis</i>								1		1
	<i>C. krusei</i>								1		1

Las columnas correspondientes a las concentraciones 8, 16, 32, 128 y 256  $\mu\text{g/mL}$  fueron eliminadas de la tabla porque ningún aislado fue inhibido en esos valores

● **Determinación de la CIM para los EAHYM**

Con respecto a los EAHYM, si bien la lectura de la microplaca se realizó en espectrofotómetro, según indica el documento de referencia, la inhibición de desarrollo se puede observar a simple vista con la ayuda de un espejo de aumento.

**(Foto 9)**



**Foto 9.** 1-No se obtuvo desarrollo de la levadura en la fila C; 2-Se observa claramente la inhibición en las filas C y F en el pocillo correspondiente a 6,25 mg/mL.

Con el EAHYM el 69 % (96/139) de las levaduras estudiadas mostró valores de CIM entre 0,78 – 6,25 mg/mL, el 30 % (42/139) una CIM entre 25 – 400 mg/mL, y solo una cepa mostró una CIM de 12,5 mg/mL.

En general, cuando el número de cepas de cada especie estudiada fue mayor a 2 se observó un amplio rango en los valores de CIM obtenidos.

Para *C. albicans* el rango de CIM fue 0,78-400 mg/mL; para *C. glabrata* fue de 0,78-200 mg/mL; para *C. tropicalis* fue de 6,25-400 mg/mL, para *C. parapsilosis* fue de 1,56-200 mg/mL y para *S. cerevisiae* fue de 0,78-6,25 mg/mL. (**Gráficos 4 a 8**).

Los resultados de la CIM de EAHYM se muestran en la **Tabla 17**



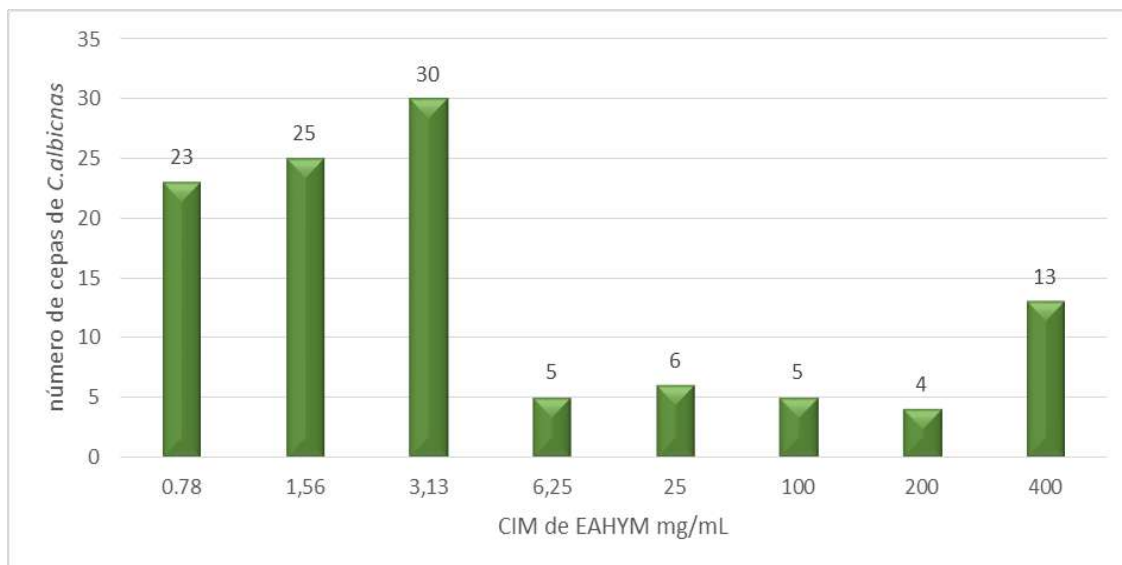
**RESULTADOS**

**Tabla 17.** Distribución de valores de CIM y porcentaje acumulado de inhibición de EAHYM para las levaduras aisladas de flujo vaginal

Especies	Distribución de valores de CIM mg/mL. Número de aislados (porcentaje acumulado de inhibición)									n
	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	100	200	400	
<i>C. albicans</i>	23 (20,7)	25 (43,2)	30 (70,2)	5 (74,8)		6 (80,2)	5 (83,7)	4 (88,3)	13 (100)	111
<i>C. glabrata</i>	3 (27,3)			1 (36,4)				7 (100)		11
<i>C. tropicalis</i>				1 (16,6)	1 (33,3)			1 (50)	3 (100)	6
<i>S. cerevisiae</i>	2 (40)			3 (100)						5
<i>C. parapsilosis</i>		2 (66,6)						1 (100)		3
<i>C. nivariensis</i>								1		1
<i>C. metapsilosis</i>		1								1
<i>C. krusei</i>						1				1

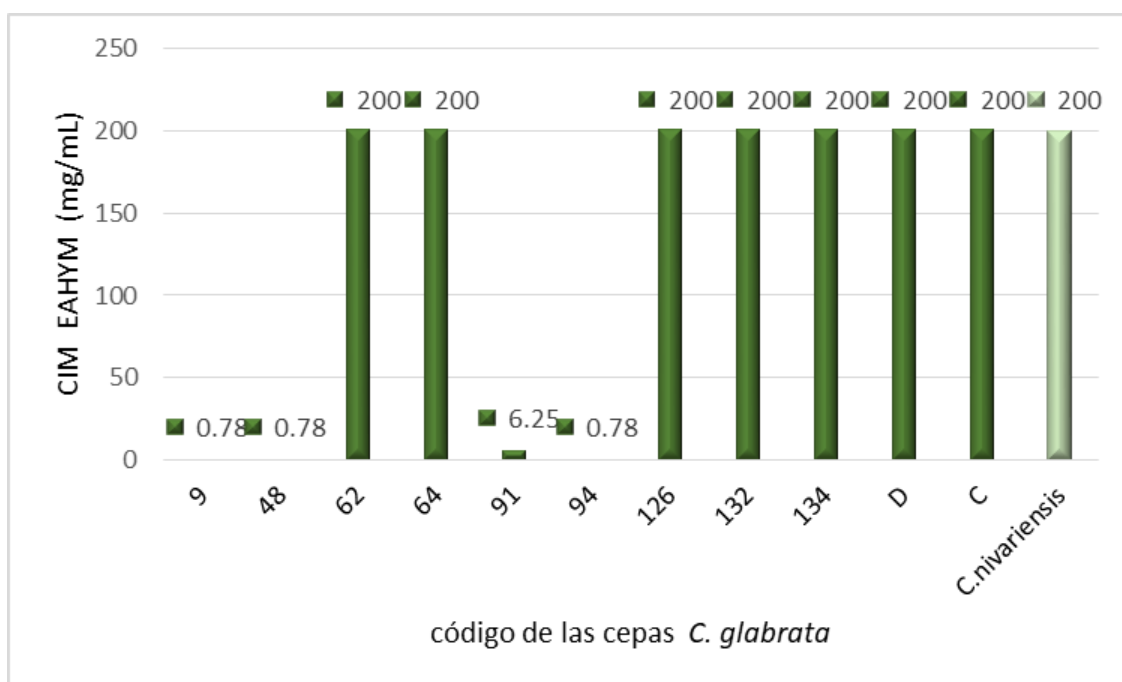
La columna correspondiente a la concentración 50 mg/mL fue eliminada de la tabla porque ningún aislado fue inhibido en ese valor.

En el **Gráfico 4** se observan los valores de CIM de *C. albicans* frente a EAHYM.



**Gráfico 4.** Distribución de valores de CIM de EAHYM frente a *C. albicans*

En el **Gráfico 5** se observan que los valores de CIM de las cepas del complejo *C. glabrata* (nombradas según su código de ingreso), frente al EAHYM presentan un amplio rango 0,78-200 mg/mL.

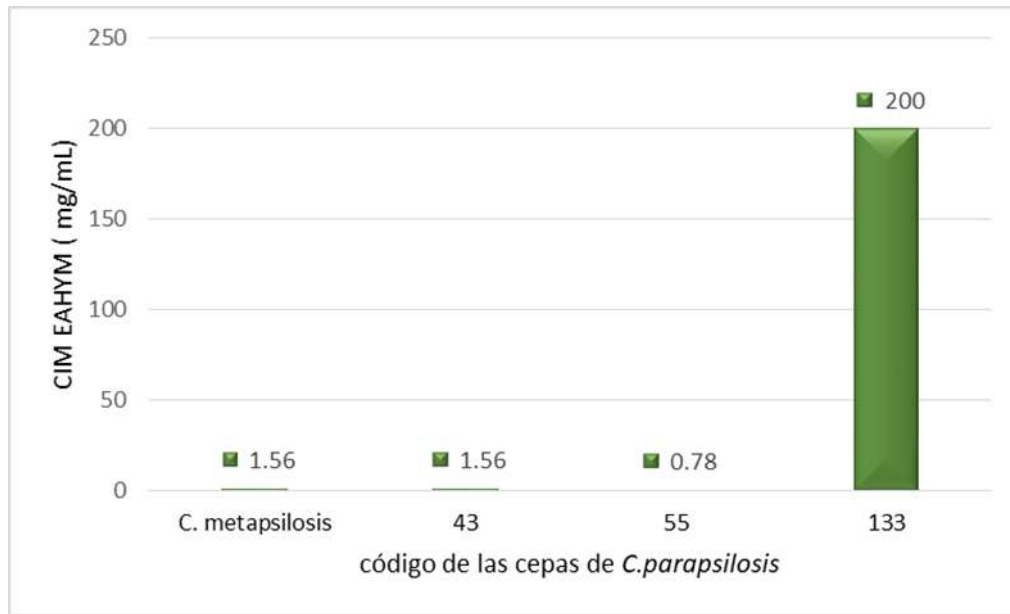


**Gráfico 5.** Distribución de valores de CIM de EAHYM frente a *C. glabrata* s. s y *C. nivariensis*



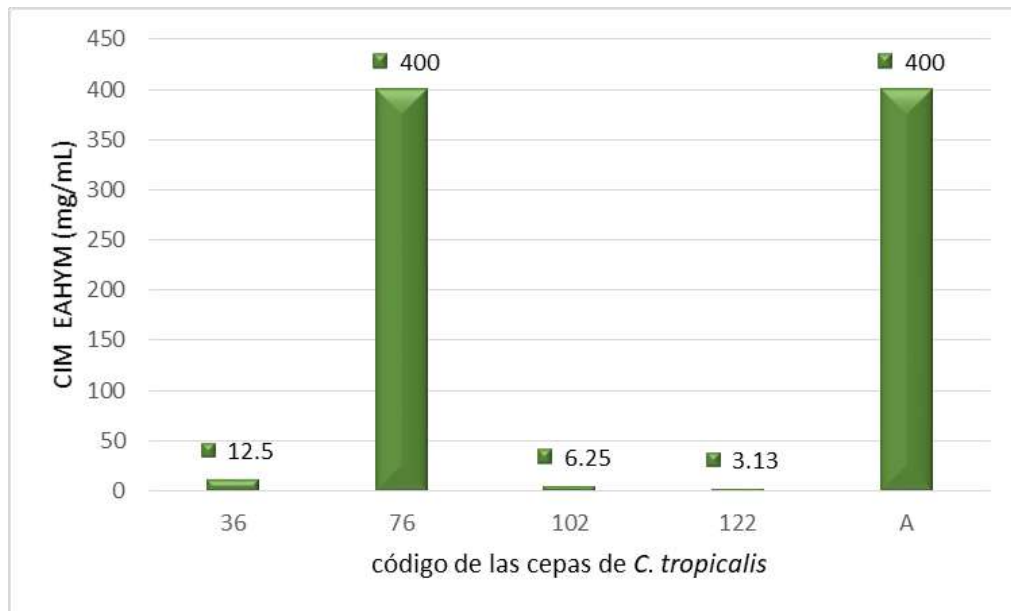
## RESULTADOS

En el **Gráfico 6** se observa que solo una cepa del complejo *C. parapsilosis* (nombradas según su código de ingreso), presenta un valor de CIM de 200 mg/mL, mientras que, para el resto, el rango de CIM fue 0,78-1,56 mg/mL frente al EAHYM.



**Gráfico 6.** Distribución de valores de CIM de EAHYM frente a *C. parapsilosis* s. s y *C. metapsilosis*.

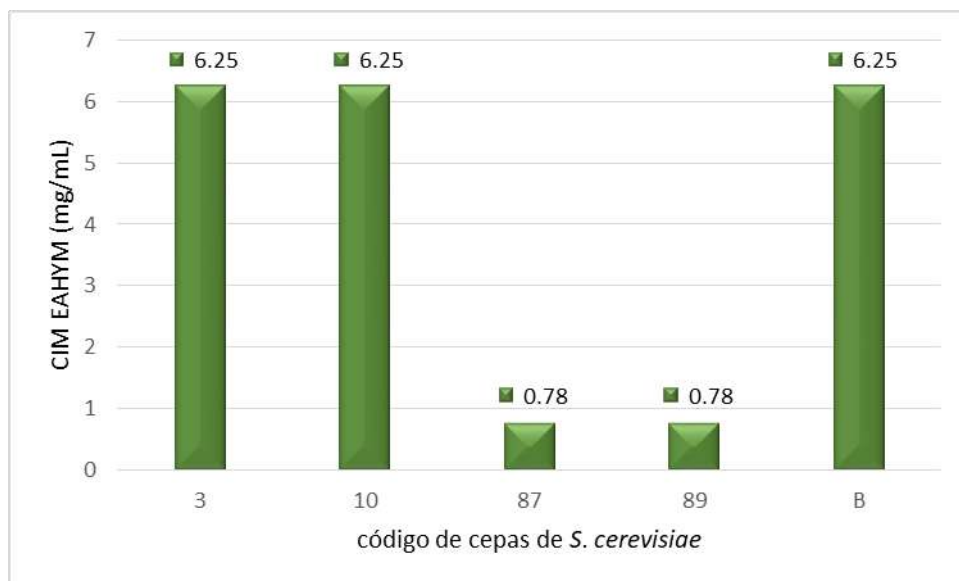
En el **Gráfico 7** se observa que el rango de los valores de CIM fue amplio para *C. tropicalis* (nombradas según su código de ingreso), frente al EAHYM (3,13-400 mg/mL).



**Gráfico 7.** Distribución de valores de CIM del EAHYM frente a *C. tropicalis*

Para *C. krusei* el valor de la CIM frente al EAHYM fue de 3,13 mg/mL.

Con respecto a *S. cerevisiae* (nombradas según su código de ingreso), en el **Gráfico 8** se observan que los valores de CIM frente al EAHYM tienen un margen de dos diluciones.



**Gráfico 8.** Distribución de valores de CIM de EAHYM frente a *S. cerevisiae*



## RESULTADOS

- **Cálculo de CIM50, CIM90, moda, media geométrica y rango para los antifúngicos evaluados y para el EAHYM**

En general, para las levaduras del género *Candida*, tanto para los antifúngicos como para el EAHYM se observó un amplio rango en los valores de la CIM, lo que indica que la actividad de los agentes antimicrobianos ensayados es especie dependiente.

El itraconazol y el clotrimazol mostraron actividad inhibitoria en rangos de CIM aceptablemente bajos 0,008-1 µg/mL y 0,015-1 µg/mL respectivamente.

Por otra parte, para las especies de *Candida* el fluconazol y la nistatina, en general mostraron valores más altos de CIM 0,125-256 µg/mL y 0,125-2 µg/mL, respectivamente.

Un comportamiento similar se observó con *S. cerevisiae*, que mostró valores bajos de CIM para el itraconazol y el clotrimazol con un rango de 0,015-0,25 µg/mL y 0,015-0,06 µg/mL, respectivamente. Mientras que para el fluconazol y la nistatina los valores de CIM fueron 0,125-4 µg/mL y 0,125-2 µg/mL, respectivamente.

Con respecto a los valores de CIM obtenidos al evaluar la actividad del EAHYM se observó un amplio rango de valores para las especies de *Candida* 0,78-400 mg/mL, mientras que para *S. cerevisiae* los valores fueron considerablemente más bajos, 0,78-6,25 µg/mL. **(Tabla 18)**

**Tabla 18.** Valores de CIM de los antifúngicos y del EAHYM para las levaduras aisladas de flujo vaginal



Especies	CIM	Antifúngicos $\mu\text{g/mL}$				mg/mL
		Clotrimazol	Itraconazol	Fluconazol	Nistatina	EAHYM
<i>Candida</i> sp. n=134	Moda	0,03	0,03	0,25	1	3,13
	MG	0,03	0,04	0,59	0,83	7,24
	CIM 50	0,03	0,03	0,5	1	3,13
	CIM 90	0,06	0,125	4	2	400
	Rango	0,015-1	0,008-1	0,125-256	0,125-2	0,78-400
<i>Candida albicans</i> n=111	Moda	0,03	0,03	0,25	1	3,13
	MG	0,03	0,03	0,5	0,81	5,55
	CIM 50	0,03	0,03	0,25	1	3,13
	CIM 90	0,06	0,125	2	2	400
	Rango	0,015-1	0,008-1	0,125-16	0,25-2	0,78-400
no- <i>C. albicans</i> n=23	Moda	0,03	0,06	0,25	1	200
	MG	0,04	0,07	3,14	0,83	26,04
	CIM 50	0,03	0,06	1	1	200
	CIM 90	0,06	0,5	256	2	400
	Rango	0,015-0,5	0,015-0,5	0,25-256	0,125-2	0,78-400
<i>S. cerevisiae</i> n=5	Rango	0,015-0,06	0,015-0,25	0,125-4	0,125-2	0,78-6,25

CIM: concentración inhibitoria mínima; MG: media geométrica; CIM 50: concentración que inhibe a 50 % de la población evaluada; CIM 90: concentración que inhibe a 90 % de la población evaluada \*No-*C. albicans*: *C. glabrata* n=11; *C. nivariensis* n=1; *C. tropicalis* n=5; *C. parapsilosis* n=3; *C. metapsilosis* n=1; *C. krusei* n=1.

- **Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM)**

Luego de realizada la determinación de la CIM de los EAHYM, se procedió a realizar la determinación de la CFM tomando una alícuota de cada pocillo de la placa de microdilución, según se describió en materiales y métodos.

No se observó actividad fungicida (CFM > 4) de los EAHYM para este panel de cepas estudiadas. Luego de 24-48 h de incubación se observó desarrollo de las levaduras en todas las concentraciones sembradas en la placa. **(Foto 10).**



**Foto 10.** Determinación de CFM. No se observa actividad fungicida luego de 24-48 h de incubación.



● **Determinación de la sensibilidad frente a los antifúngicos por difusión en medio sólido**

Se evaluó la actividad *in vitro* por difusión en medio sólido de concentraciones fijas de fluconazol, itraconazol, nistatina y clotrimazol, en soporte de disco de papel y tabletas.

La lectura de los halos de inhibición se realizó en forma visual.

**Cepas control**

Los valores de los halos de inhibición de las cepas de referencia *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 frente a los antifúngicos se encontraron dentro de los esperados para el fluconazol y para el itraconazol.

Al no contar con valores de referencia para el clotrimazol, la nistatina y los EAHYM se registró el rango del halo de inhibición de 30 repeticiones realizadas en distintos días. **(Tabla 19).**

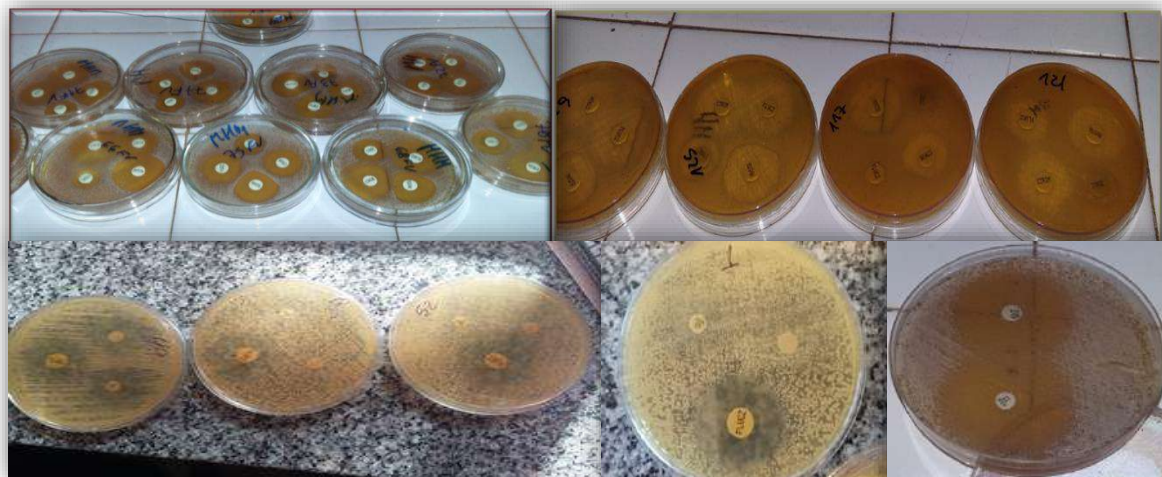
**Tabla 19.** Rango del halo de inhibición en mm de las cepas de referencia frente a cuatro antifúngicos

Cepas control	Valor del halo de inhibición en mm					
	FLZ (T)	FLZ (DM)	FLZ (DO)	CLZ (T)*	ITZ (T)	NIS (T)*
<i>C. krusei</i> <sup>1</sup>	9	7	7	20-22	21-22	23-28
<i>C. parapsilosis</i> <sup>2</sup>	22-23	24-29	23-25	22-25	22-24	24-27

1- ATCC 6258; 2- ATCC 22019; FLZ: fluconazol; CLZ: clotrimazol; ITZ: itraconazol; NIS: nistatina; T: tableta Rosco; DM: disco Malbrán; DO: disco Oxoid.

\*Rango obtenido luego de realizar 30 repeticiones en distintos días.

Los halos fueron bien definidos y se leyeron sin inconvenientes, salvo para el fluconazol, que con algunas cepas mostraron efecto de arrastre, principalmente cuando se evaluaron con los discos fluconazol Malbrán o con los discos Oxoid y se muestran en la **Foto 11.**



**Foto 11.** Halos de inhibición generados en agar MHM por la actividad de los antifúngicos frente a las levaduras en estudio (vista del anverso y reverso de la placa)

Para las especies de *Candida*, los rangos de los halos de inhibición fueron amplios para el itraconazol (6-32 mm) y el fluconazol (6-36 mm, 7-36 mm y 9-40 mm, con disco Oxoid disco Malbrán y con tableta, respectivamente). **Tabla 19.**

Con *S. cerevisiae* el itraconazol fue el antifúngico con menor actividad y generó halos de inhibición con un rango de 9-10 mm. Para el fluconazol el rango fue 9-20 mm, 17-25 mm y 14-27 mm con tableta, disco Oxoid y disco Malbrán respectivamente). **Tabla 19.**

Para la nistatina y el clotrimazol no fue posible realizar la interpretación categórica y solo se consignó el valor del halo de inhibición, se calculó la moda, media geométrica y rango. **Tabla 20.**



## RESULTADOS

**Tabla 20.** Valores de moda, media geométrica y rango de los antifúngicos frente a las levaduras

Especies	Parámetros	Tableta mm				Discos mm	
		Itraconazol	Clotrimazol	Nistatina	Fluconazol	Malbrán	Oxoid
<i>Candida</i> sp. n=134	Moda	24	31	31	31	31	31
	MG	21,4	28,3	30,2	27,8	23,6	23
	Rango	6-32	20-36	25-35	9-40	7-36	6-36
<i>C. albicans</i> n=111	Moda	24	31	31	31	31	31
	MG	22,3	28,8	30	29,1	24,3	23,9
	Rango	6-32	20-36	25-33	11-40	7-36	6-36
no- <i>C. albicans</i> n=23	Moda	19	24	30	31	20	20
	MG	17,6	25,8	30,7	22,4	20,5	19,7
	Rango	7-26	20-35	27-35	9-31	7-31	6-31
<i>S. cerevisiae</i> n=5	Rango	9-10	31	31	9-20	17-25	14-27

105

\*No-*C. albicans*: *C. glabrata* n=11; *C. nivariensis* n=1; *C. tropicalis* n=6; *C. parapsilosis* n=3; *C. metapsilosis* n=1; *C. krusei* n=1. MG: media geométrica.

La interpretación de los resultados y la categorización de las cepas se realizó teniendo en cuenta los puntos de corte definidos por el CLSI en su documento M60 2nd ed.

En el presente estudio utilizamos los puntos de corte del CLSI para el fluconazol, mientras que para el itraconazol se usaron los puntos de corte que indica el fabricante en el inserto de las tabletas Neo-Sensitabs™ Rosco. **Tabla 21.**

Con el fluconazol, el porcentaje de S/SDD/R mostró diferencias según el reservorio que se usó en el ensayo. Así, para *C. albicans* se observó resistencia al fluconazol en el 0,9 %, 9 % y 8,1 % con las tabletas, disco Malbrán o disco Oxoid, respectivamente. **Tabla 21.**

Para *C. glabrata* solo el disco Oxoid detectó un 9,1 % de resistencia al fluconazol.

Para las cepas crípticas a la fecha no se definieron puntos de corte frente a los antifúngicos, por tal motivo y con fines analíticos para nuestro estudio se utilizaron los puntos de corte definidos para la especie *sensu stricto* del complejo.



## RESULTADOS

Así, *C. nivariensis* mostró un diámetro del halo de 23 mm y 20 mm (SDD) con tableta y disco Oxoid, respectivamente, mientras que con el disco Malbrán el halo fue de 17 mm (sensible), y 19 mm para el itraconazol (SDD).

De las cepas de *C. parapsilosis* s. s, solo 1/3 presentó SDD frente al itraconazol.

Con respecto a la cepa críptica *C. metapsilosis*, a la fecha no se definieron puntos de corte clínicos frente a los antifúngicos, a los fines analíticos se utilizaron los puntos de corte definidos para la especie *sensu stricto* del complejo. *C. metapsilosis* manifestó los siguientes halos de inhibición: itraconazol 24 mm, clotrimazol 29 mm, nistatina 29 mm, mientras que para fluconazol los halos fueron 18 mm, 7 mm y 6 mm, con tableta, disco Malbrán y disco Oxoid, respectivamente. **Tabla 21.**

Con respecto a *C. tropicalis*, el 100 % expresó SDD frente al itraconazol, y se observaron diferencias en los resultados obtenidos frente al fluconazol según el reactivo utilizado para determinar la sensibilidad *in vitro*.

Así, con el disco Malbrán y el disco Oxoid todas las cepas de *C. tropicalis* se categorizaron como sensibles, mientras que, con las tabletas, el 33,3 % fue resistente al fluconazol.

Con respecto al itraconazol, el 30 % de las *Candida* spp., evaluadas presentó SDD. **Tabla 21**



## RESULTADOS

**Tabla 21.** Interpretación categórica para las combinaciones antifúngico / microorganismo que cuentan con puntos de corte definido

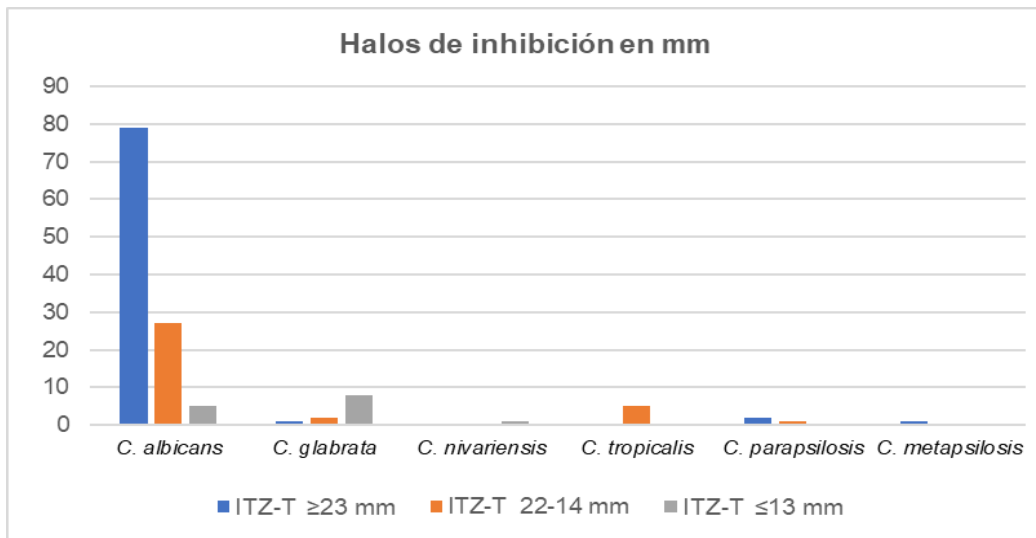
Especies	Categoría	Difusión T (mm) n(%)		DM (mm) n(%)	DO (mm) n(%)
		Itraconazol	Fluconazol	Fluconazol	Fluconazol
<b><i>C. albicans</i> n=111</b>	Sensible	79 (71,2 %)	110 (99,1 %)	99 (89,2 %)	100 (90 %)
	Resistente	5 (4,5 %)	1 (0,9 %)	10 (9 %)	9 (8,1 %)
	SDD	27 (24,3 %)	0	2 (1,8 %)	2 (1,8 %)
<b><i>C. glabrata</i> n=11</b>	Sensible	1 (9,1 %)	11 (100 %)	8 (72,72 %)	0
	Resistente	2 (18,2 %)	0	0	1 (9,1 %)
	SDD	8 (72,7 %)	0	3 (27,27 %)	10 (90,9 %)
<b><i>C. nivariensis</i> n=1*</b>	Sensible	0	0	1	0
	Resistente	0	0	0	0
	SDD	1	1	0	1
<b><i>C. tropicalis</i> n=6</b>	Sensible	0	4 (66,6 %)	6 (100 %)	6 (100 %)
	Resistente	0	2 (33,3 %)	0	0
	SDD	6 (100 %)	0	0	0
<b><i>C. parapsilosis</i> n=3</b>	Sensible	2 (66,7 %)	3 (100 %)	3 (100 %)	3 (100 %)
	Resistente	0	0	0	0
	SDD	1 (33,3 %)	0	0	0
<b><i>C. metapsilosis</i> n=1*</b>	Sensible	1	1	0	0
	Resistente	0	0	1	1

\*\*Especies crípticas que asumen el punto de corte definido para la especie tipo del complejo; SDD: sensible dependiente de dosis; T: tableta; DM: disco Malbrán; DO: disco Oxoid.

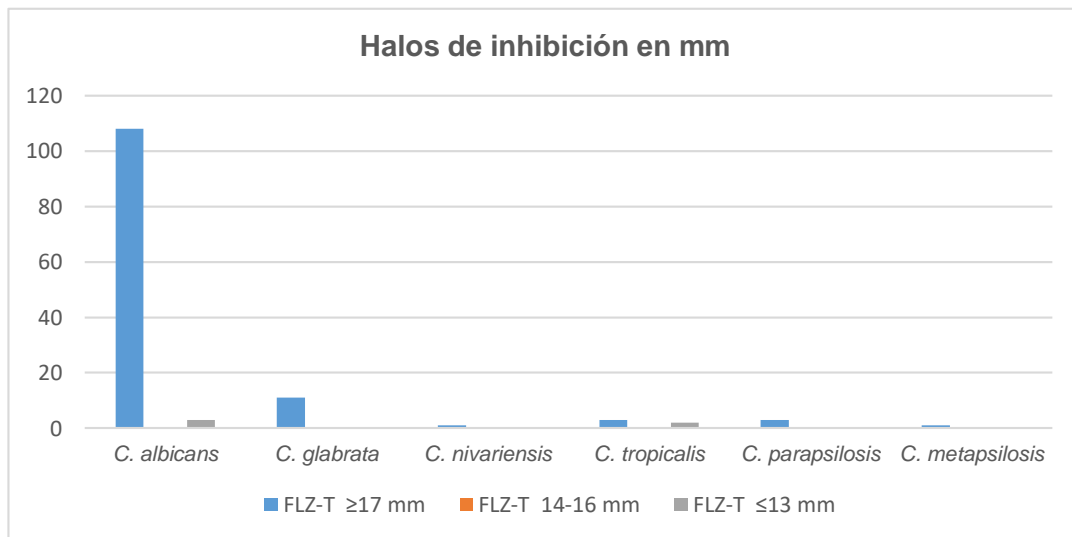
Con respecto a *C. krusei*, los documentos de referencia del CLSI y del EUCAST no incluyen la determinación de sensibilidad ni puntos de corte clínicos para esta especie frente al fluconazol ni al itraconazol.

En nuestro estudio, los valores del halo de inhibición de *C. krusei* fueron 13 mm, para el itraconazol (tableta), 21 mm para el clotrimazol (tableta), 20 mm para la nistatina (tableta), 9 mm, 7 mm, y 6 mm, para el fluconazol (tableta, disco Malbrán y disco Oxoid), respectivamente.

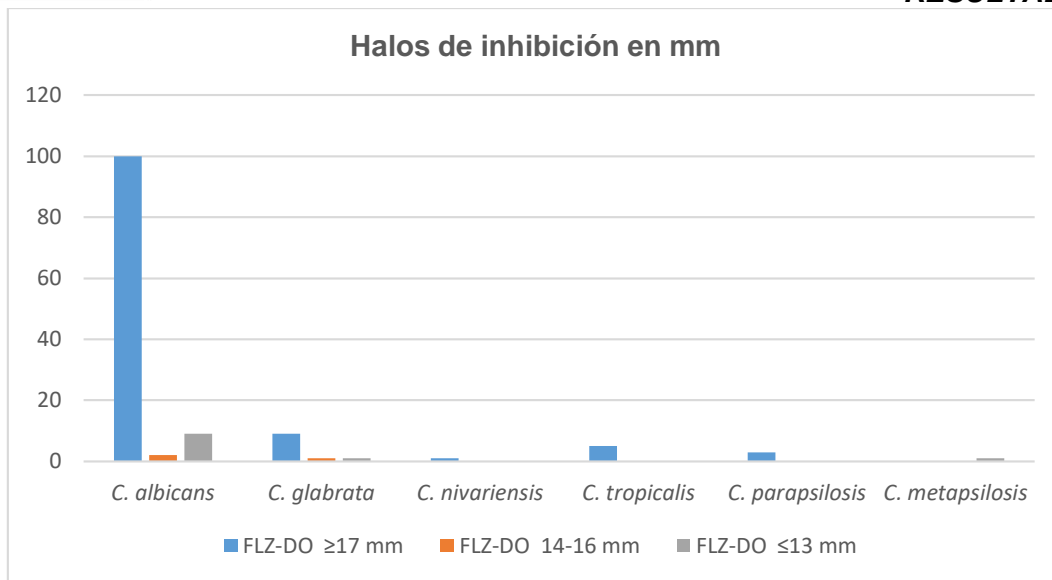
En los **Gráficos 9** al **12** se representa la frecuencia de cepas de levaduras frente a los rangos obtenidos para la combinación antifúngico/*Candida*.



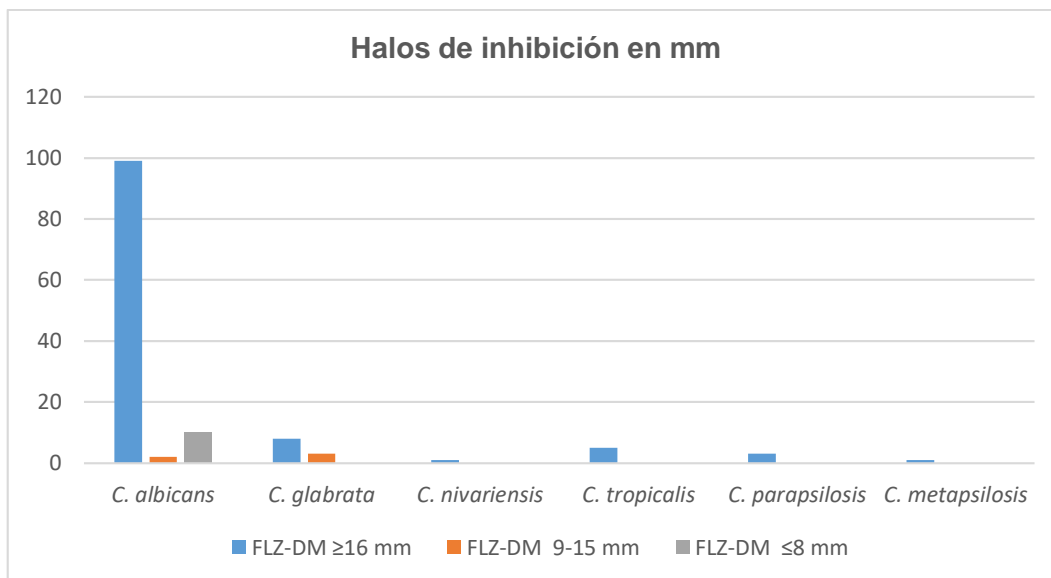
**Gráfico 9.** Frecuencia de cepas de levaduras frente a los rangos definidos por el CLSI para categorizar a las cepas de *Candida* de acuerdo al valor del halo de inhibición en mm. ITZ-T: itraconazol; T: tableta.



**Gráfico 10.** Frecuencia de cepas de levaduras frente a los rangos definidos por el CLSI para categorizar a las cepas de *Candida* de acuerdo al valor del halo de inhibición. FLZ-T: fluconazol; T: tableta.



**Gráfico 11.** Frecuencia de cepas de levaduras frente a los rangos definidos por el CLSI para categorizar a las cepas de *Candida* de acuerdo al valor del halo de inhibición. FLZ-DO: fluconazol; DO: disco Oxoid.



**Gráfico 12.** Frecuencia de cepas de levaduras frente a los rangos definidos por el CLSI para categorizar a las cepas de *Candida* de acuerdo al valor del halo de inhibición. FLZ-DM: fluconazol; DM: disco Malbrán.

En nuestro trabajo utilizamos tres reservorios cargados con 25  $\mu\text{g}$  de fluconazol (tabletas, discos Malbrán, discos Oxoid), para determinar la sensibilidad frente al fluconazol por difusión en medio sólido.





## RESULTADOS

Utilizamos el test estadístico de las proporciones con el objeto de determinar si existen diferencias significativas entre los reservorios.

Se realizó el análisis teniendo en cuenta las especies de *Candida* y la interpretación categórica sensible, sensible dosis dependiente y resistente.

Si el valor de  $p$  (probabilidad) es mayor a 0,05, entonces no existen diferencias significativas entre los antifúngicos y sus respectivos reservorios.

### *Candida albicans* (n=111)

#### Sensibles

Método	Tableta	Disco Malbrán	Disco Oxoid
Tableta	----	$p < 0,005$	$p < 0,012$
Disco Malbrán	$p < 0,005$	----	$p < 0,425$
Disco Oxoid	$p < 0,012$	$p < 0,425$	----

#### Resistentes

Método	Tableta	Disco Malbrán	Disco Oxoid
Tableta	----	$p < 0,023$	$p < 0,045$
Disco Malbrán	$p < 0,023$	----	$p < 0,05$
Disco Oxoid	$p < 0,045$	$p < 0,05$	----

#### Sensible dosis dependiente

Método	Tableta	Disco Malbrán	Disco Oxoid
Tableta	----	$p < 0,0795$	$p < 0,0795$
Disco Malbrán	$p < 0,0795$	----	$p < 1$
Disco Oxoid	$p < 0,0795$	$p < 1$	----

### No-*Candida albicans* (n=23)\*

#### Sensibles

Método	Tableta	Disco Malbrán	Disco Oxoid
Tableta	----	$p > 0,05$	$p < 0,002$
Disco Malbrán	$p > 0,05$	----	$p < 0,0011$
Disco Oxoid	$p < 0,002$	$p < 0,0011$	----



## RESULTADOS

### Resistentes

Método	Tableta	Disco Malbrán	Disco Oxoid
Tableta	----	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Disco Malbrán	$p > 0,05$	----	$p > 0,05$
Disco Oxoid	$p > 0,05$	$p > 0,05$	----

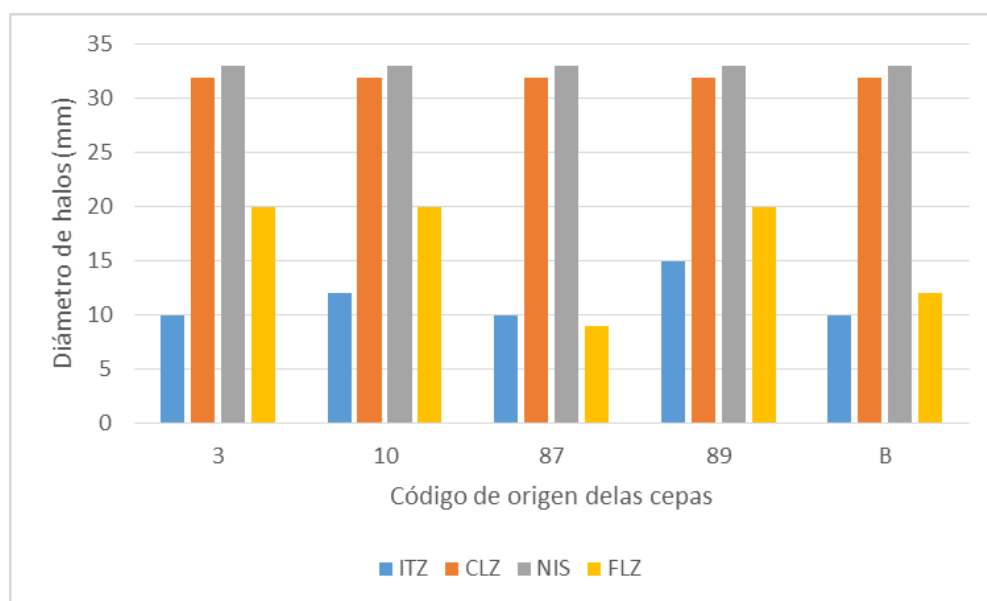
### Sensible dosis dependiente

Método	Tableta	Disco Malbrán	Disco Oxoid
Tableta	----	$p > 0,05$	$p < 0,0001$
Disco Malbrán	$p > 0,05$	----	$p < 0,0026$
Disco Oxoid	$p < 0,0001$	$p < 0,0026$	----

111

\*No-*C. albicans*: *C. glabrata*, n=11; *C. tropicalis*, n=6; *C. parapsilosis*, n=3; *C. nivariensis*, n=1; *C. metapsilosis*, n=1; *C. krusei*, n=1.

En este estudio el 3,6 % de los aislamientos fueron *S. cerevisiae*. Si bien para esta especie no se definieron puntos de corte clínicos para los antifúngicos, para el fluconazol, se observó una sensibilidad reducida a la mayoría de los agentes azólicos evaluados, sin embargo, las cepas mostraron halos de inhibición con nistatina y clotrimazol de 31 mm (**Gráfico 13**).



**Gráfico 13.** Diámetro en mm de los halos de inhibición de las cepas de *S. cerevisiae* Nistatina (NIS), fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ) y clotrimazol (CLZ).



## RESULTADOS

Las técnicas comerciales en general son accesibles y de simple realización, no obstante, antes de implementar su uso en la rutina diaria es necesario conocer si los resultados que brindan son confiables.

En este trabajo calculamos el porcentaje de concordancia categórica entre los resultados obtenidos por la determinación de la CIM, y los resultados obtenidos con las tabletas y los discos cargados con itraconazol y fluconazol.

Al no existir puntos de corte para la nistatina ni para el clotrimazol, no fue posible calcular el porcentaje de concordancia categórica.

En cuanto a *C. krusei*, los resultados que se obtuvieron para esta especie no se incluyeron en el análisis debido a que es intrínsecamente resistente al fluconazol, por tanto, no es posible determinar la concordancia categórica y no hay puntos de corte clínicos para el itraconazol.

Para *S. cerevisiae* no hay puntos de corte definidos, no se evalúa la concordancia.

Al evaluar el fluconazol observamos que los porcentajes de concordancia más elevados fueron con *C. albicans* y *C. tropicalis*, tanto con los discos, como con las tabletas, en promedio un 86,1 % para los tres reactivos. El menor porcentaje de concordancia fue para las especies del complejo *C. glabrata* con un 67 %, 33,3 % y 75 % para las tabletas, disco Malbrán y disco Oxoid, respectivamente.

Con las especies del complejo *C. parapsilosis* el porcentaje de concordancia fue relativamente bajo, 75 %, 50 % y 50 %, para las tabletas, disco Malbrán y disco Oxoid, respectivamente.

El mayor porcentaje de *discrepancias muy mayores* se obtuvo con los discos Malbrán para las especies no-*C. albicans* (22,2 %), seguido por los discos Oxoid (13,8 %).

Para el itraconazol, en general el porcentaje de concordancia fue del 75% a excepción de *C. tropicalis* que mostró un 100 % de discrepancias menores.

### Tabla 22.



## RESULTADOS

**Tabla 22.** Porcentaje de concordancia categórica para las combinaciones antifúngico/*Candida* evaluados por método de dilución y difusión en agar

Especies	Categorías	Itraconazol	Fluconazol		
		CIM/T	CIM/T	CIM/DM	CIM/DO
<i>Candida albicans</i> n=111	Concordancia	74,8	93,7	87,4	85,6
	DMi	24,3	4,5	2,7	4,5
	DM	0	0,9	9,0	7,2
	DMM	0,9	0,9	0,9	2,7
	Porcentaje	100	100	100	100
Complejo <i>C. glabrata</i> n=12	Concordancia	75	67	33,3	75
	DMi	25	33	41,7	25
	DM	0	0	0	0
	DMM	0	0	25	0
	Porcentaje	100	100	100	100
<i>Candida tropicalis</i> n=6	Concordancia	0	83,3	83,3	83,3
	DMi	100	0	0	0
	DM	0	16,6	0	0
	DMM	0	0	16,6	16,6
	Porcentaje	100	100	100	100
Complejo <i>C. parapsilosis</i> n=4	Concordancia	75	75	50	50
	DMi	25	0	0	0
	DM	0	0	25	25
	DMM	0	25	25	25
	Porcentaje	100	100	100	100

113

CIM: concentración inhibitoria mínima; T: tableta; DM: disco Malbrán; DO: disco Oxoid; DMi: discrepancia menor; DM: discrepancia mayor; DMM: discrepancia muy mayor.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el software Statgraphics Centurión XV y el MS Excel software.

Se realizó un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados (coeficiente de correlación de Pearson), mediante el registro de los diámetros de la zona de inhibición versus sus respectivos valores de CIM (después de la transformación logarítmica).

El valor de la CIM para cada combinación antifúngico/especie se correlacionó con el diámetro de la zona de inhibición (en milímetros).

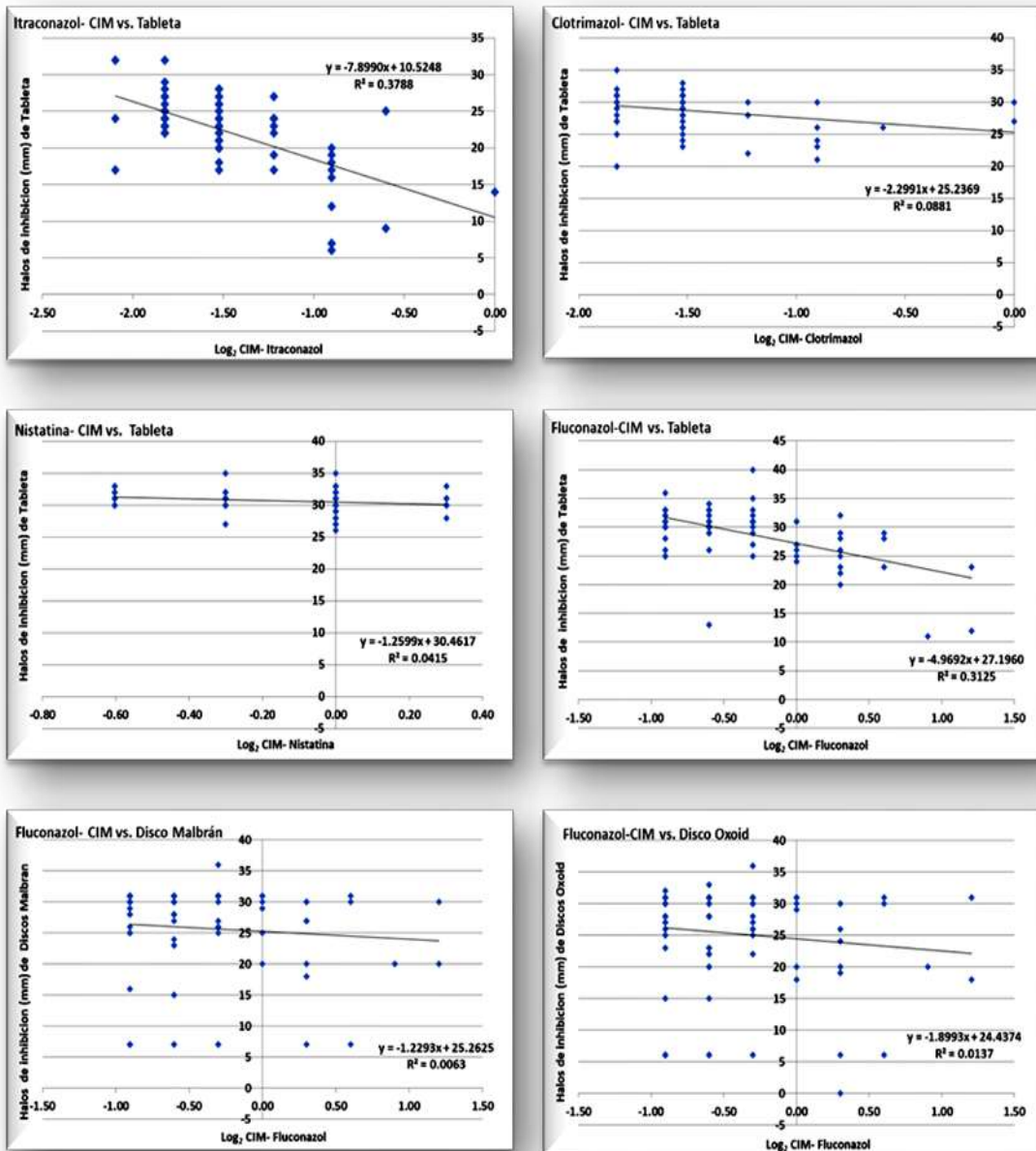
La asociación entre ambos métodos se representó en gráficos de dispersión, en el eje X se representó el Log<sub>2</sub> del valor de la CIM y en el eje Y se registraron los valores del halo de inhibición (en mm).



## **RESULTADOS**

No se observó agrupación lineal entre los valores de la CIM y el valor de los halos de inhibición, por tal motivo, no fue posible calcular el coeficiente de correlación de Pearson ni el análisis de regresión lineal. La asociación entre ambos métodos se muestra en los gráficos de dispersión.

En el **Gráfico 14** se muestra la asociación entre la CIM versus la difusión en medio sólido usando tabletas, discos Malbrán y discos Oxoid cuando se evaluó el itraconazol, el clotrimazol, el fluconazol y la nistatina en *C. albicans*.



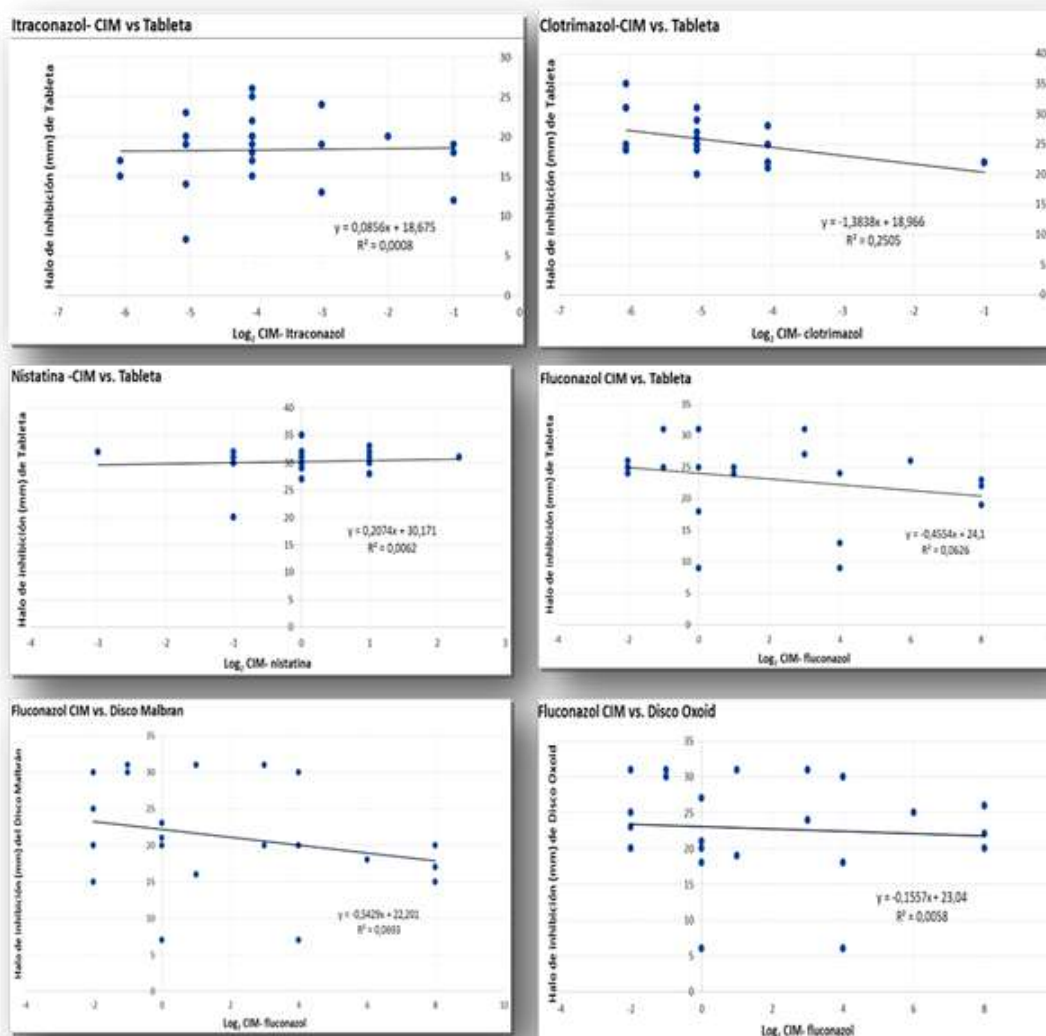
**Gráfico 14.** Gráficos de dispersión utilizados para relacionar el Log<sub>2</sub> CIM y el halo de inhibición de las 111 *C. albicans* frente al itraconazol, el clotrimazol, el fluconazol y la nistatina contenidos en distintos reservorios (tableta/discos).

Con respecto a las especies no-*C. albicans*, al ser un número menor a 30 cepas para cada especie, el análisis se realizó para todas agrupadas (n=23).

## RESULTADOS

Para este grupo de cepas, se observó una relación lineal negativa entre el halo de inhibición y el log de la CIM independientemente del antifúngico y del reservorio utilizado. Si bien los valores de R<sup>2</sup> resultaron significativos en todos los casos al 95% de nivel de confianza, se muestra una baja dependencia entre las dos variables.

Los resultados se muestran en el **Gráfico 15**



**Gráfico 15.** Gráficos de dispersión utilizados para relacionar el Log<sub>2</sub> CIM y el halo de inhibición de las 23 especies no- *C. albicans* frente al itraconazol, el clotrimazol, el fluconazol y la nistatina contenidos en distintos reservorios (tableta/discos).

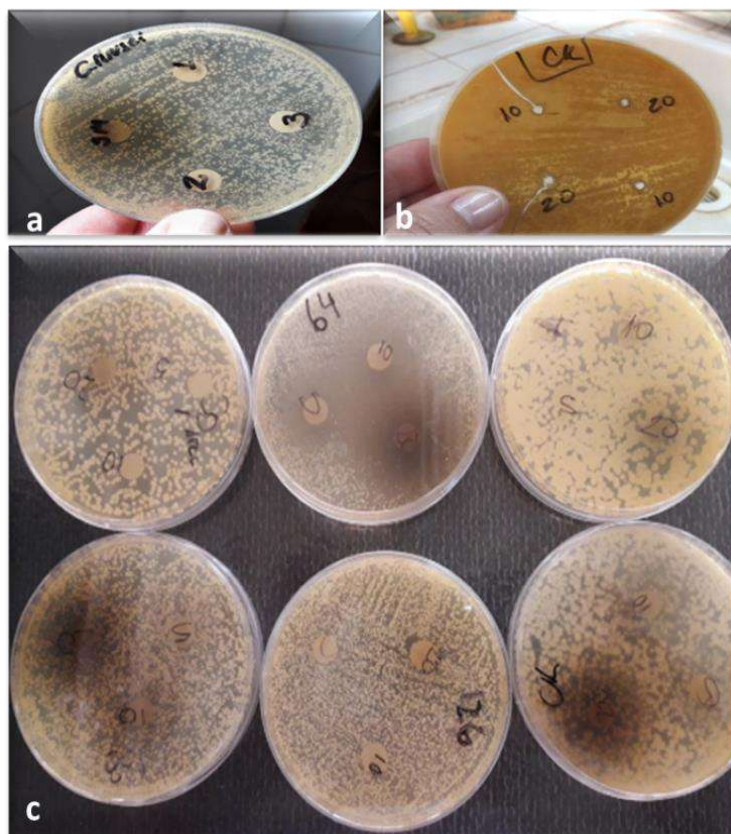
- **Determinación de la sensibilidad por difusión en agar con discos de papel cargados con extractos acuosos de hojas de yerba mate**

Con base en los resultados obtenidos por dilución probamos distintas concentraciones de los EAHYM cargados en discos de papel Whatman N°1 para evaluar su eficacia por difusión en medio sólido.

También se probó haciendo hoyos en el agar y descargando distintas concentraciones de los EAHYM según se describe en materiales y métodos.

Se testaron las especies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y las cepas control ATCC de *C. krusei* y *C. parapsilosis*.

Los resultados obtenidos no han sido óptimos, puesto que no se observó actividad inhibitoria cuando utilizamos los discos, ni cuando cargamos las concentraciones de EAHYM en los hoyos realizados en el medio de cultivo. (**Foto 12**)



**Foto 12.** a y b-Difusión en agar con distintas concentraciones de EAHYM versus *C. krusei*. c- Difusión en agar con distintas concentraciones de EAHYM versus *Candida* sp. No se observa actividad inhibitoria.

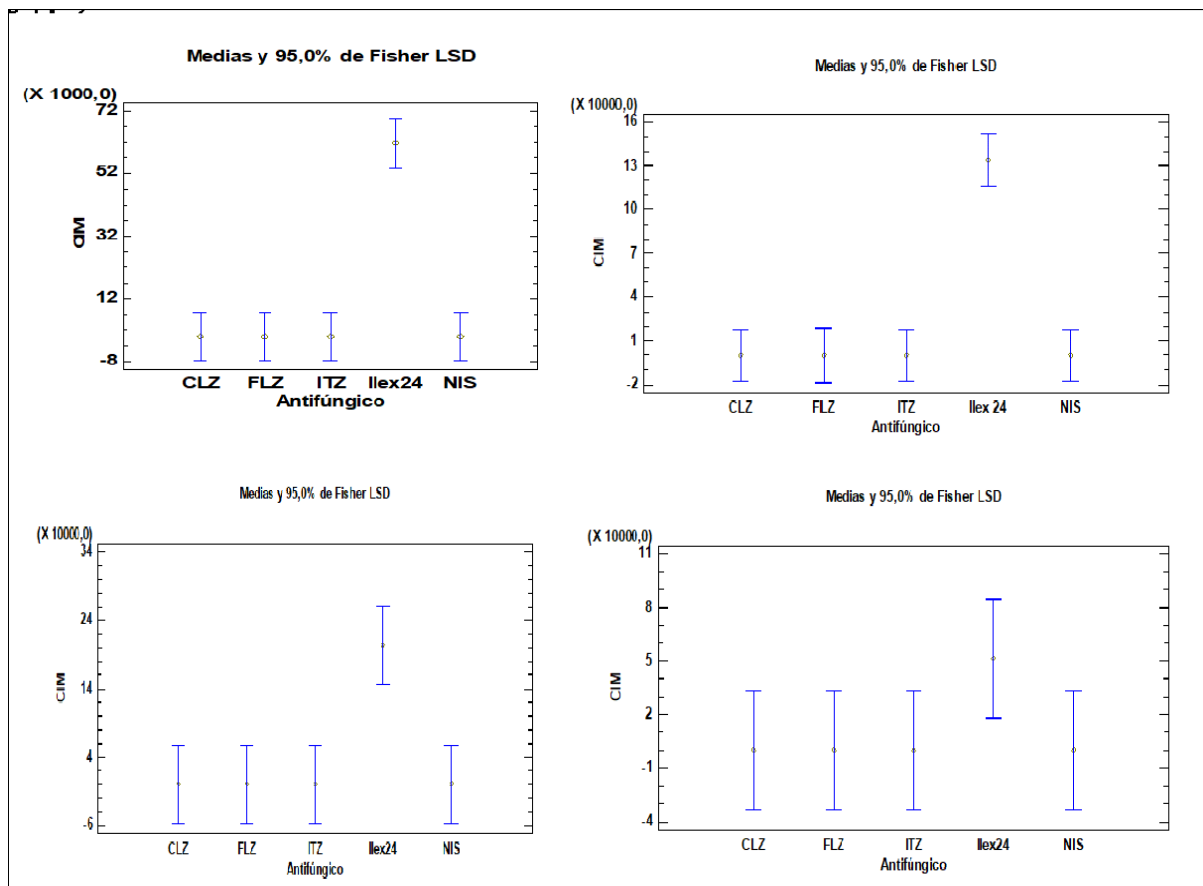


**Análisis estadístico**

**Análisis de medias para los antifúngicos versus el EAHYM**

Se realizó el análisis por especie de *Candida* frente a los antifúngicos versus los resultados obtenidos con el EAHYM.

En general, para las especies de *Candida* estudiadas no se observaron diferencias significativas entre los antifúngicos, aunque si se observaron diferencias con el EAHYM,  $p < 0,01$ , esto es porque las concentraciones estudiadas eran más altas que las concentraciones evaluadas para los antifúngicos. **Gráfico 16.**

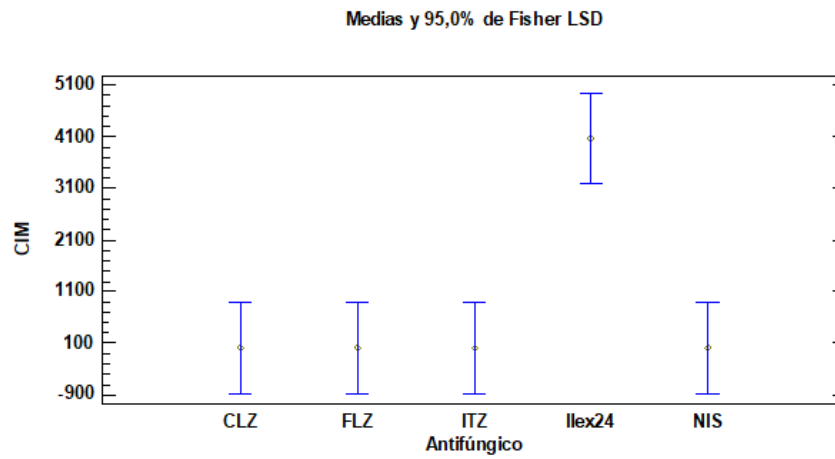


**Gráfico 16:** Antifúngicos vs EAHYM en *Candida*. CIM: concentración inhibitoria mínima; CLZ: clotrimazol; FLZ: fluconazol; ITZ: itraconazol; NIS: nistatina.



## RESULTADOS

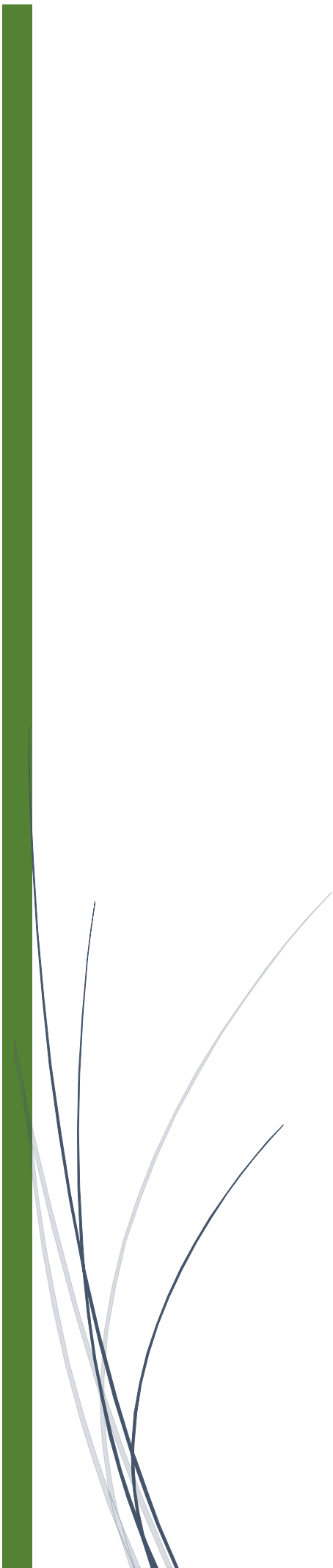
Con respecto a *S. cerevisiae* se observó diferencia significativa  $p < 0,01$  al analizar los antifúngicos versus el EAHYM. **Gráfico 17.**



**Gráfico 17:** Antifúngicos vs EAHYM en *Saccharomyces*. CIM: concentración inhibitoria mínima; CLZ: clotrimazol; FLZ: fluconazol; ITZ: itraconazol; NIS: nistatina.

# DISCUSSION

## CAPITULO 4





Las infecciones del aparato genital femenino constituyen un problema sanitario que a la fecha permanece sin resolver. Distintas especies de *Candida* son capaces de producir vulvovaginitis, y entre ellas, *C. albicans* es el agente causal en aproximadamente el 90% de los casos.

En los últimos años se describen con mayor frecuencia otras especies de levaduras, en parte por el aumento en la resistencia a los antifúngicos de uso habitual (García Heredia, 2006; Negroni, 2008; Alemán Mondeja, 2010; Kenedy, 2010; Marchaim, 2012; Gómez Moyano, 2013; Díaz, 2016).

La aparición de resistencia en aislados de *C. albicans* frente al fluconazol, droga de elección para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal, no solo dificulta el manejo terapéutico, sino que además conlleva a la evolución crónica, con el consiguiente deterioro psicosocial y sexual de las pacientes (Sobel, 2016; Córdoba, 2019).

La aparición de microorganismos resistentes a los antifúngicos de uso convencional generó la necesidad de explorar otras alternativas terapéuticas potencialmente más eficaces y con menos efectos indeseables para los pacientes (Isao Kubo, 1993; Deladino, 2008; Filip, 2001, Filip, 2010, Silva, 2011).

En las últimas décadas se incrementó el interés por encontrar compuestos naturales obtenidos de plantas que puedan sustituir a los fármacos sintéticos brindando nuevas oportunidades terapéuticas. La compleja constitución de los compuestos naturales, con predominio de compuestos terpénicos, bencénicos y fenólicos, contribuyen al escaso o nulo riesgo de desarrollar mecanismos de resistencia en los microorganismos (Isao Kubo, 1993; Deladino, 2008; Filip, 2001, Filip, 2010, Silva, 2011).

No obstante, para asegurar que los compuestos naturales cumplen con los requisitos necesarios en términos de eficacia, seguridad y calidad, es necesario someterlos a procesos de validación científica. (Buitrón García 2007, Filip, 2010, Wen, 2011; Martínez, 2011; Rojas Armas, 2015).

La yerba mate es un producto regional con marcado anclaje territorial y con un fuerte contenido identitario (Rau, 2009). Su producción está en el 90%, en la provincia de Misiones fundada en la pequeña y mediana explotación. **Conforma la Ruta de la Yerba Mate declarada “Patrimonio cultural,**



**histórico, turístico, paisajístico, productivo, gastronómico e industrial de Misiones” por la Legislatura de la provincia (ley VI N°236 Posadas, Misiones. 04/06/2020).**

La yerba mate es objeto de estudio por sus propiedades como antioxidante, anti carcinogénica, antiinflamatoria, señalada también como potencialmente activa para el control de infecciones fúngicas y bacterianas (Coentrão, 2011; Gorjanović, S., 2012; Carini, 1998; Anesini, 2006; Dellacassa, 2007; Gonzalez Coria, 2018).

En este trabajo evaluamos y comparamos la actividad *in vitro* de antifúngicos de uso convencional y de extractos acuosos de yerba mate sobre 139 aislados de levaduras causantes de vulvovaginitis obtenidos de pacientes que fueron asistidas en diferentes hospitales de la ciudad de Posadas (Misiones).

- **Identificación fenotípica de las levaduras**

Destacamos la importancia de realizar el aislamiento de los cultivos en agar cromógeno, este procedimiento nos permitió detectar la presencia de más de una especie de levadura en los cultivos.

En nuestro estudio, se observó la asociación de dos especies de levaduras en 6/133 pacientes (4,51 %); en cuatro pacientes entre *C. albicans* y *C. glabrata* y entre *C. albicans* y *C. parapsilosis*; y en dos pacientes con recidiva se presentó asociación entre *C. albicans* y *C. glabrata*. Estas asociaciones de especies fueron similares a las que reportaron otros autores (Buscemi, 2004).

El porcentaje de infección mixta fue menor al comunicado por Mahmoudi Rad *et. al.* (2011) en un trabajo realizado con 175 pacientes, el 10,3 % presentó asociación entre dos o más especies de levaduras (Mahmoudi Rad, 2011). Por el contrario, en un trabajo realizado por Fan *et. al.*, (2008), el porcentaje de infecciones mixtas fue del 2,05 % en una población de 1070 pacientes con CVV.

Con las técnicas fenotípicas clásicas fue posible identificar a las especies del complejo *C. albicans* 79,8 %, seguido por el complejo *C. glabrata* 8,6 %, *C. tropicalis* 4,3 %, complejo *C. parapsilosis* 2,8 %, *C. krusei* 0,7 % y *S. cerevisiae* 3,6 %. Esta distribución de especies coincide con otros estudios a nivel mundial que indican que las especies del complejo *C. albicans* ocupan el primer lugar



## DISCUSION

seguido del complejo *C. glabrata* (Arechavala, 2007; Mendling, 2012; Gamarra, 2014; Sanabria, 2014; Sobel, 2016; Díaz, 2016; Miro, 2017; Sánchez-Martin, 2019).

Las técnicas fenotípicas no suelen ser de utilidad para distinguir a las especies crípticas, sin embargo, para diferenciar a *C. dubliniensis* dentro del complejo *C. albicans* existen distintos medios de cultivo que mostraron ser eficaces, confiables y costo accesible para identificar presuntivamente a *C. dubliniensis*.

En nuestro estudio utilizamos los medios de cultivo agar tabaco modificado, agar tomate zanahoria, agar Pal, agar opacidad y caldo hipertónico, sin embargo, no encontramos *C. dubliniensis*, a diferencia de lo comunicado por otros autores que si identificaron a esta especie críptica utilizando los mismos medios de cultivo (Bartoli, 2011; Camacho, 2012, Pardi, 2012, Gianechini, 2015). Es posible que no halláramos *C. dubliniensis* debido a que en general, no es una especie de aislamiento frecuente como agente de vulvovaginitis (Arechavala, 2007; Shan, 2014; Gamarra, 2014; Theill, 2016; Hazirolan, 2017).

En cuanto al complejo *C. glabrata*, 11/12 cepas mostraron color lila en agar cromogénico, y la restante mostró color blanquecino, aunque con micromorfología compatible para *C. glabrata*. La expresión de diferentes colores en las levaduras del complejo *C. glabrata* fue observada por Bishop *et al.*, (2008), en un trabajo que incluía además a otras especies que también mostraban color blanquecino (Bishop, 2008).

Por su parte, Morales López *et al.*, (2016) estudiaron una colección de cultivos de levaduras pertenecientes al complejo *C. glabrata*, y al realizar los cultivos en medios cromogénicos encontraron que las especies crípticas mostraban color blanquecino (Morales-López, 2016).

Los medios cromogénicos son de ayuda para detectar más de una especie en los cultivos, pero es importante realizar la identificación molecular de las cepas pertenecientes a los complejos *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, puesto que la correcta identificación es fundamental para el diagnóstico, para conocer la epidemiología, y en algunos casos, para elegir el tratamiento más eficaz. (Mollerach, 2006; Arango, 2012; Swoboda-Kopeć, 2014; Figueiredo-Carvalho, 2016; Sánchez- Martin, 2019).



- **Identificación de especies utilizando técnicas de proteómica**

Para la validación de la identificación fenotípica se utilizó el equipo MALDI-TOF MS. Los resultados fueron 100 % concordantes con *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* sensu stricto y con *S. cerevisiae* y 97 % concordantes con *C. albicans* sensu stricto. Los porcentajes de concordancia fueron similares a los comunicados por Taverna *et. al.* (2019) para las especies estudiadas.

MALDI-TOF es una herramienta valiosa para identificar especies crípticas o poco comunes. En nuestro estudio, se identificaron dos especies crípticas de los complejos *C. glabrata* y *C. parapsilosis*: *C. nivariensis* y *C. metapsilosis* con un puntaje de confianza de 2,04 y 1,95 respectivamente indicando género seguro y probable identificación de especie. Resultados similares informaron Galan *et. al.* en 2015, Aznar-Marin *et. al.* en 2016, y Taverna *et. al.* en 2019.

- **Identificación de especies utilizando técnicas moleculares**

Fue posible corroborar la identificación de las dos especies crípticas *C. nivariensis* y *C. metapsilosis* por métodos moleculares. Se compararon los resultados obtenidos con el MALDI-TOF, con la amplificación por PCR y secuenciación de la región ITS1-5,8S-ITS2 y de los análisis de identidad y similitud realizados en las bases de datos primaria (NCBI) y secundaria (*Fungal barcoding*). Todos estos procedimientos permitieron identificar a la cepa 26 como *C. metapsilosis* y a la cepa 11B como *C. nivariensis*.

En cuanto a *C. nivariensis*, otros autores (Sharma, 2013; Li, 2014; Aznar Marin, 2016) también identificaron, en bajo porcentaje de frecuencia, a esta especie como agente de candidiasis vulvovaginal.

Hasta el momento, en Argentina, *C. nivariensis* había sido aislada a partir de otros sitios (faringe, catéter renal, orina, bolsa de diálisis) (Morales López, 2016), pero no encontramos publicaciones sobre aislamientos a partir de muestras obtenidas de pacientes con vulvovaginitis.

Con respecto al complejo *C. parapsilosis*, estas especies pueden ser agentes de CVV, aunque al ser levaduras comensales en la mucosa vaginal la relevancia como agente causal suele ser cuestionada.



A esto se suma el hecho de la baja frecuencia de aislamiento del complejo *C. parapsilosis* en casos de candidiasis vulvovaginal y además, que *C. metapsilosis* parece ser la especie menos virulenta del complejo (Treviño Rangel, 2012; Sena, 2015; García-Salazar, 2017).

### **Estudio de la sensibilidad *in vitro* por dilución**

- **Actividad inhibitoria de los agentes azólicos**

El fluconazol ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la vulvovaginitis por levaduras, de hecho, es el antifúngico de elección, aunque hay estudios que señalan la emergencia en la aparición de cepas resistentes (Zhang, 2014; Córdoba, 2018).

La resistencia a los azoles puede ser debido a una incapacidad de alcanzar concentraciones adecuadas de la droga en el sitio de acción por la presencia de barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo activo, disminución o mutaciones de enzimas en el sitio de acción (*Erg 11*) o bien, por incremento en la síntesis del ergosterol (Gómez Quintero, 2010; Zhang, 2014; Sanabria, 2014).

En este trabajo evaluamos la sensibilidad *in vitro* frente al fluconazol, al itraconazol y al clotrimazol. Al realizar el análisis para cada combinación antifúngico / microorganismo, observamos que, para *C. albicans* el 94,6 % de las cepas evaluadas manifestó sensibilidad al fluconazol en concordancia con los datos presentados por Díaz *et. al.* (2016).

El 2,7 % de las 111 *C. albicans* fueron resistentes al fluconazol, y observamos que nuestros resultados son coincidentes con los presentados por Zhou *et. al.* y Theill *et. al.* en 2015, aunque existen importantes diferencias entre nuestros resultados y los publicados por otros autores. Yan *et. al.* (2019) comunicó un 8,2 % de resistencia en 207 cepas de *C. albicans*. En Argentina, Gamarra *et. al.* en 2014 comunicaron un 5,8 % de resistencia al fluconazol en *C. albicans* aisladas de flujo vaginal de pacientes de la provincia de Santa Fe.

En un trabajo reciente Córdoba *et. al.* (2018) comunicó la emergencia de resistencia (45,4 %) a fluconazol en 130 cepas de *C. albicans* en aisladas pacientes con candidiasis vulvovaginal durante el período 2011-2017. Otros





autores también comunicaron porcentajes mayores al 50 % de resistencia al fluconazol en *C. albicans* (Wang, 2016; Khan, 2018).

Con respecto a *C. glabrata*, tanto del CLSI como del EUCAST, no consideran que esta especie resulte sensible al fluconazol, y queda reflejado en las categorías interpretativas definidas para esta especie. En este estudio, el 72,7 % de las cepas fue categorizada como de sensibilidad intermedia (CIM entre 0,25 -16 µg/mL), y el 27,3 % fue categorizada como resistente.

Este porcentaje de resistencia resulta un llamado de atención, debido a que en otros estudios realizados a nivel nacional no se habían registrado porcentajes tan altos de resistencia en *C. glabrata* aisladas de vulvovaginitis (Arechavala, 2007; Gamarra, 2014; Morales López, 2016).

A diferencia de nuestros resultados, otros autores encontraron porcentajes de resistencia al fluconazol considerablemente menor en *C. glabrata* aisladas de pacientes con CVV. Maraki *et. al.*, (2019) encontró un 1,2 % de resistencia al fluconazol en 168 aislados de *C. glabrata* (Maraki, 2019).

Zhang *et. al.*, (2014) comunicó un 9,8 % de resistentes sobre 164 aislados y Richter *et. al.*, (2005) un 15,2 % de resistentes sobre 112 aislados (Zhang, 2014; Richter, 2005). Por su parte, en un trabajo de Zhou *et. al.* (2015) no registraron resistencia al fluconazol en aislados de *C. glabrata*.

Es importante mencionar que en nuestro estudio 1/3 *C. parapsilosis* y 1/5 *C. tropicalis* resultaron resistentes al fluconazol. Si bien el número de especies es bajo para realizar conclusiones, este hallazgo es una alerta para tener en cuenta.

Es posible que la emergencia en la resistencia al fluconazol sea multifactorial, y que resulte de una sumatoria de eventos. Entre los factores más frecuentes se menciona la selección de cepas no sensibles, en parte inducida por automedicación, o por recibir tratamientos no adecuados, a los que se suman las mutaciones en genes que codifican para la síntesis del ergosterol, principal componente de la membrana celular fúngica (Sobel, 2016, Zhang, 2014).

En general observamos las mayores diferencias entre nuestros resultados y los publicados por autores de países asiáticos. Tal vez exista alguna condición



étnica, geográfica o una suma de ambas, que contribuyan para que los porcentajes de resistencia sean mayores en esas zonas geográficas.

Si bien el control eficaz de la RVVC se puede lograr con el uso de la terapia con fluconazol, la cura de la patología sigue siendo difícil, especialmente por el aumento en la frecuencia de aparición de especies resistentes (Sobel, 2016).

Con respecto al itraconazol, es un antifúngico azólico con actividad inhibitoria en las levaduras del género *Candida*. Este azol suele indicarse como tratamiento de la CVV cuando la especie aislada no responde al fluconazol.

En este trabajo, entre el 80- 100 % de las cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* resultaron sensibles, en concordancia con los resultados de Gamarra *et. al.*, (2014). Sin embargo, en un estudio realizado por Wang *et. al.*, (2016), con 2204 especies de *Candida* encontraron porcentajes considerablemente elevados de resistencia, para *C. albicans* 51,5 %, para *C. glabrata* 61,9 % y para *C. krusei* 83,3 % (Wang, 2016). Cabe aclarar que en el trabajo de Wang se usó el método de difusión en medio sólido para determinar la sensibilidad *in vitro*. El uso de distintos métodos no debería impactar en el resultado, aunque resulta llamativo el porcentaje de resistencia tan elevado.

Cuando analizamos los resultados por especie, remarcamos que para *C. glabrata* no hay puntos de corte clínicos definidos frente al itraconazol, por lo tanto, no fue posible asignar categorías interpretativas. El 82 % de las *C. glabrata* mostraron una CIM de  $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$ , resultados comparables con los informados por Gamarra *et. al.* (2014).

Por el contrario, nuestros resultados no son comparables con los comunicados por Kiasat *et. al.* (2019), en un estudio realizado con 61 cepas de *C. glabrata* cuyos valores de CIM fueron 0,5-8  $\mu\text{g/mL}$ , ni con los resultados de Hou *et. al.*, (2017), que comunicó un rango de CIM 0,12 -  $>16 \mu\text{g/mL}$  (Hou, 2017; Kiasat, 2019).

En el único aislado de *C. krusei* se evidenció la resistencia intrínseca al fluconazol (16  $\mu\text{g/mL}$ ), mientras que para el itraconazol al no estar definido el punto de corte clínico no se asignó categoría.



El itraconazol es una alternativa para el tratamiento de la RCVV cuando se aíslan especies no sensibles al fluconazol, p. ej. causadas por *C. krusei*, siempre que el valor de la CIM indique que no existe resistencia cruzada con fluconazol.

Con respecto al clotrimazol no se definieron puntos de corte clínicos, por lo tanto, no se asignaron categorías interpretativas.

El análisis general de los valores de CIM para las cepas estudiadas mostró que el clotrimazol tuvo actividad inhibitoria con valores de CIM50 aceptablemente bajos ( $\leq 0,03 \mu\text{g/mL}$ ), en concordancia con los datos comunicados por Diaz *et. al.* (2016).

Al analizar los resultados por especie de *Candida* encontramos que el 100 % las cepas de *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* mostraron valores de CIM  $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$ .

En cambio, para *C. albicans* y *C. glabrata* algunas cepas tuvieron valores más altos de CIM,  $1 \mu\text{g/mL}$  y  $0,5 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Otros autores comunicaron resultados similares para la combinación clotrimazol versus *C. albicans* y *C. glabrata*. (Gamarra, 2014; Zhou, 2016).

Aunque en un trabajo realizado por Rezaei-Matehkolaei *et. al.*, (2016) el rango de CIM fue más amplio entre  $0,125$  a  $1 \mu\text{g/mL}$  para estas especies.

El clotrimazol es un azol de elección para el tratamiento de CVV no complicada, principalmente cuando el agente etiológico es *C. krusei*, ya que el tratamiento con fluconazol estaría contraindicado. Zhou *et. al.*, demostró la eficacia y seguridad del tratamiento con clotrimazol versus fluconazol en 240 pacientes con CVV. El porcentaje de cura fue del 71,9 % y 78 % para el clotrimazol y fluconazol, respectivamente y ocurrió luego de 30-35 días.

- **Comportamiento de cepas crípticas frente a los azoles**

La especie críptica *C. nivariensis* es considerada como un patógeno emergente con capacidad para causar vulvovaginitis (Sharma, 2013; Li, 2014).

En nuestro estudio identificamos una cepa de *C. nivariensis* y fue categorizada como resistente al fluconazol (CIM  $256 \mu\text{g/mL}$ ), a diferencia de los



resultados obtenidos por Shi *et. al.*, (2020) que no encontró resistentes en un estudio realizado con 13 *C. nivariensis* aisladas de vulvovaginitis (Shi, 2020).

Otros autores también informaron CIM de fluconazol entre 0,5 y 16 µg/mL, es decir categoría intermedio, sin embargo, según lo publicado por Aznar-Marín *et. al.* (2015) aún con una CIM de 2 µg/mL la paciente no mostró mejoría clínica.

Con respecto a la especie críptica *C. metapsilosis* no se definieron los puntos de corte clínicos frente al fluconazol ni al itraconazol, por lo que se consideraron los puntos de corte definidos para el complejo *C. parapsilosis*.

La única cepa de *C. metapsilosis* identificada en nuestro estudio resultó sensible al itraconazol (CIM 0,06 µg/mL) y al fluconazol (CIM 1 µg/mL), resultados concordantes con los comunicados por Aznar-Marín *et. al.* (2015).

- **Actividad inhibitoria de la nistatina**

Para la nistatina no han sido definidos puntos de corte, por lo tanto, no se asignaron categorías de sensible/resistente. Es importante remarcar que no debe extrapolarse la interpretación categórica definida para la anfotericina B para categorizar a la nistatina, aunque por su estructura, ambas drogas son polienos.

El análisis general de los valores de CIM para las cepas estudiadas mostró que la nistatina fue el antifúngico con menor actividad inhibitoria (CIM90 2 µg/mL), resultados en coincidencia a lo reportado por Díaz *et. al.* (2016), sobre una población semejante.

Al analizar los resultados por especie de *Candida* encontramos que fueron inhibidas en rangos variables de CIM 0,125 – 2 µg/mL. Estos resultados son comparables a los comunicados por Lloveras Suárez *et al.*, (2004) en un estudio realizado con 404 pacientes con CVV (Llovera Suárez, 2004). Por el contrario, Gamarra *et. al.*, comunicaron un estrecho rango de CIM 0,03-0,25 µg/mL para 121 especies de *Candida* aisladas de pacientes con CVV (Gamarra, 2014).

La nistatina es de elección para el tratamiento de las CVV complicadas o las recidivantes, asimismo, es el antifúngico indicado cuando se aísla *C. krusei* o alguna especie no sensible a los azoles (Mendling, 2010; Pappas, 2016).



- ***Saccharomyces cerevisiae***

En este estudio el 3,6% de los aislados fueron *S. cerevisiae*, y el orden de frecuencia de aparición correspondió al cuarto lugar luego de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*. Porcentajes similares fueron comunicados por otros autores (Sanz, 2002; Sobel, 1993; Buscemi, 2004; Gamarra, 2014; Castro Rodríguez, 2015).

Por el contrario, Papaemmanouil *et. al.* (2011) aisló un 6,1 % de *S. cerevisiae* de 262 mujeres sintomáticas y asintomáticas de CVV (Papaemmanouil, 2011) y ocupó el tercer lugar en orden de frecuencia de aparición después de *C. albicans* y *C. glabrata*.

La presencia de *S. cerevisiae* como agente causal de CVV es objeto de distintas hipótesis, entre las que se mencionan que la proximidad del recto a la vagina favorecería la llegada de la levadura al canal vaginal por higiene precaria de la zona. Otras teorías mencionan el desbalance provocado por el uso de probióticos, el contacto permanente con *S. cerevisiae* en mujeres que trabajan en la industria panadera, en la industria cervecera, en la industria farmacéutica, entre las más mencionadas. Sin embargo, a la fecha esas hipótesis no han sido contrastadas (Papaemmanouil, 2011).

Para esta especie no se definieron puntos de corte clínicos para interpretar los resultados de las pruebas de sensibilidad. En este trabajo, la CIM50 de los azoles clotrimazol, itraconazol y fluconazol mostró valores aceptablemente bajos, 0,03 µg/mL, 0,06 µg/mL y 1 µg/mL, respectivamente, en concordancia con los resultados presentados en otros trabajos (Sanz, 2002; Sobel, 1993; Buscemi, 2004; Echeverría-Irigoyen, 2011).

Por el contrario, en el trabajo de Papaemmanouil, los azoles no mostraron actividad inhibitoria en los aislados de *S. cerevisiae* estudiados. (Papaemmanouil, 2011)

Al igual que para las especies de *Candida*, la menor actividad se observó con la nistatina.

Si bien la frecuencia de aparición de *S. cerevisiae* como agente causal de CVV es muy baja, su presencia no debe ser ignorada y debemos tener en cuenta



que la respuesta al tratamiento no siempre es la esperada. (Sobel 1993; Sanz, 2002; Buscemi; 2004, Buitron, 2007; Castro Rodríguez, 2015).

- **Pruebas de sensibilidad por difusión en medio sólido. Concordancia con el método de referencia**

La técnica de difusión en medio sólido es costo accesible, sencilla, fácil de realizar e interpretar, aunque es importante validar los resultados con el método de referencia antes de implementarla en un laboratorio.

En este trabajo utilizamos discos y tabletas cargados con concentraciones fijas y únicas de antifúngicos y evaluamos y comparamos los resultados obtenidos con el método de referencia.

Al no estar definidos los puntos de corte clínicos para el clotrimazol y la nistatina, solo fue posible calcular la concordancia para el itraconazol y el fluconazol.

Para *C. albicans* el porcentaje de concordancia que observamos con el fluconazol en los tres reservorios fue > 85 % y para *C. tropicalis* > 83 %, estos porcentajes son menores a los comunicados por otros autores (>95 %) (Cantón, 2006; Espinel-Ingroff, 2007; Kiraz, N., 2010; Maldonado, 2013).

Con el complejo *C. parapsilosis* la concordancia para el fluconazol resultó menor, 75 %, 50 % y 50 %, con tableta, disco Malbrán y disco Oxoid, respectivamente. Nuestros resultados discrepan de los comunicados en otros trabajos. (Cantón, 2006; Espinel-Ingroff, 2007; Kiraz, N., 2010; Maldonado, 2013).

Con el respecto al complejo *C. glabrata*, y en coincidencia con lo comunicado por Cantón *et. al.* (2006) y Maldonado *et. al.* (2013) la concordancia para el fluconazol fue la más baja entre las especies estudiadas, aun cuando fueron evaluadas con las tabletas Neo-Sensitabs™. Es posible que sea debido a la característica de *C. glabrata* de no ser categorizadas como sensibles por los documentos de referencia. (M60 2nd ed. CLSI; Antifungal Breakpoint versión 2,0, EUCAST).

En este trabajo, el reservorio que resultó confiable para detectar aislados de *Candida* spp., sensibles al fluconazol, fue el de las tabletas Neo-Sensitabs™.



Con el itraconazol, la concordancia con el método de referencia no superó el 75 % cuando se evaluaron *C. albicans*, el complejo *C. glabrata* y el complejo *C. parapsilosis*, mientras que el 100 % de las *C. tropicalis* mostró discrepancia menor.

Este porcentaje fue menor al presentado por Espinel Ingroff *et. al.*, (2007) en un estudio realizado con 90 especies de *Candida*, en el que la concordancia fue del 92,7 % con el método de referencia del CLSI. Por su parte, Kiraz *et. al.* (2010) comunicaron un 14 % de concordancia categórica con el CLSI al usar discos cargados en el laboratorio en forma artesanal. Desafortunadamente, al consultar en la bibliografía no encontramos otras publicaciones con las que pudiéramos comparar nuestros resultados.

- ***Ilex paraguariensis*. Contenido en polifenoles**

La yerba mate, por sus importantes actividades biológicas, atribuidas principalmente a compuestos fenólicos, es tema de constante estudio. Los polifenoles, son compuestos fenólicos que provienen del metabolismo vegetal de los hidratos de carbono, que protegen a las plantas del estrés oxidativo por radiaciones UV-B, por ello se les asocia su principal actividad como antioxidantes (Mejía Giraldo, 2014). Para obtener extractos de yerba mate con altos contenidos de polifenoles y compuestos antioxidantes se debe trabajar con materia prima obtenida al inicio de la cosecha (Hartwing, 2015).

La cosecha de la yerba mate se inicia en abril-mayo y se extiende hasta octubre. Durante este período la planta disminuye la circulación de su savia y cuenta con mayor porcentaje de hojas maduras. En nuestro trabajo las hojas de *I. paraguariensis* fueron cosechadas durante el mes de abril, para obtener el extracto acuoso con el que se determinó la cantidad de polifenoles totales y se evaluó su actividad inhibitoria frente a las levaduras del género *Candida* y *S. cerevisiae*.

Según su contenido en compuestos fenólicos, le son otorgadas a la yerba mate propiedades antimicrobianas (Heck, 2008).



## DISCUSION

En este trabajo el contenido de polifenoles totales fue de 243,7 mg/g bh EAG; con importante actividad inhibitoria sobre levaduras del género *Candida* y del género *Saccharomyces*.

Otros autores demostraron actividad antimicrobiana aún con menores concentraciones de polifenoles totales. Burris en 2015 comprobó la acción inhibitoria sobre *Staphylococcus* meticilino resistentes de extractos de yerba mate cuyo contenido en polifenoles fue de 77 mg EAG/g extracto seco.

Por su parte Prado *et. al.*, (2013) trabajó con extracto etanólico de yerba mate elaborada, de origen brasileño cuyo contenido de fenólicos totales fue de 193,9 mg EAG/g y comprobó la actividad inhibitoria sobre bacterias causantes de infecciones alimentarias, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, aunque no fue eficaz para inhibir a *E. coli*.

De igual forma, González Coria en 2018 trabajó con extractos hidroalcohólicos de yerbas comerciales de origen paraguayo, con contenido de polifenoles totales de 244,7 mg EAG/ g con actividad inhibitoria sobre microorganismos de importancia en alimentos como *Staphylococcus* spp, pero inactivos sobre *E. coli* y *P. aeruginosa*.

La cuantificación de polifenoles en extractos de vegetales está influenciada por numerosos factores, tales como su naturaleza química, el método de extracción utilizado (polaridad de la fase extractiva, tamaño de las partículas de las muestras, tiempo y temperatura de extracción, etc.), el tiempo y condiciones de almacenamiento tanto de las muestras como de los extractos, el método de ensayo empleado, los estándares elegidos, y la presencia de sustancias que interfieren en las determinaciones. (Heck, 2008). Es posible que cualquiera de estos factores pueda influir no solo en la concentración de polifenoles, sino también, en la actividad antimicrobiana.

En algunos trabajos se demostró que los triterpenos (alcaloides, cumarinas, flavonoides y taninos) presentes en plantas del género *Ilex* favorecen la actividad antimicrobiana por alteración de la membrana lipídica de los microorganismos (Haraguchi, 1999; Ruiz Quiroz, 2013).





En este estudio, por razones ajenas a nuestra voluntad, no pudimos determinar la composición química de los polifenoles, trabajamos con el extracto completo. Esto fue una limitante en nuestro estudio al desconocer cuál fue el componente con mayor actividad antifúngica.

- **Actividad inhibitoria del extracto acuoso de *I. paraguariensis***

La elección del método para determinar la sensibilidad *in vitro* es un punto importante para conocer el perfil de sensibilidad de los microorganismos frente a un determinado antimicrobiano.

A la fecha no existen documentos de referencia que sienten las bases para determinar la sensibilidad de compuestos naturales obtenidos de plantas. Tampoco existen puntos de corte clínicos ni epidemiológicos para los distintos compuestos que se evalúan.

En este trabajo pusimos a punto la técnica de microdilución en caldo, con base en el documento EDef 7.3.2 del EUCAST para determinar la CIM del EAHYM frente a especies de *Candida* y *S. cerevisiae*.

Las concentraciones más altas de uso del EAHYM presentan un color verde oscuro que dificultan la lectura con el espectrofotómetro.

Para minimizar el efecto del color verde oscuro incorporamos modificaciones menores descriptas en la sección de materiales y métodos, logramos ampliar el rango de concentraciones y mejorar la lectura e interpretación de los resultados. De esta manera, la lectura se realizó en el lector de placas y se evitó la subjetividad que se hubiera generado con la lectura visual.

Este es un aporte importante en el desarrollo de la técnica ya que facilita la lectura final y la interpretación de los resultados. Al leer la densidad óptica del crecimiento del microorganismo fue posible calcular objetivamente el momento óptimo para realizar la lectura de los resultados, y además fue posible determinar con precisión el punto de lectura.

El 88,5 % de las *Candida* spp. evaluadas fue inhibida con un valor de CIM  $\leq 200$  mg/mL, y el 100 % de *S. cerevisiae* fue inhibido con un valor de CIM 6,25 mg/mL.



## DISCUSION

Al consultar la bibliografía comprobamos una escasez de trabajos con los que comparar y discutir nuestros resultados, y en los pocos trabajos que encontramos observamos diversidad de técnicas para realizar los ensayos de sensibilidad.

Nuestros resultados son distintos a los presentados por De Biasi *et. al.*, (2009) que encontraron actividad en hojas de yerba mate en concentraciones entre 50 y 100 mg/mL frente a *C. albicans*. Debemos remarcar que De Biasi determinó la sensibilidad por difusión en medio sólido, mientras que nuestra evaluación fue por dilución en caldo.

Fretes Corrales (2017) comprobó la actividad de inhibitoria de dos compuestos polifenólicos de yerba mate, cafeína y ácido clorogénico. La cafeína inhibió el desarrollo de *C. albicans* con valor de CIM de 0,6 mg/mL y a *C. krusei* con valor de CIM de 0,3 mg/mL. El ácido clorogénico no inhibió el crecimiento de *C. albicans* mientras que inhibió a *C. krusei* con CIM de 0,009 mg/mL. De acuerdo al trabajo de Fretes Corrales, la determinación de la CIM se realizó según el documento de referencia M27 del CLSI. Es posible que la mayor actividad antifúngica se deba a que el ácido clorogénico interrumpe la estructura de la membrana celular, provocando un efecto lítico sobre la célula fúngica. (Sung, 2010).

En nuestro trabajo evaluamos los polifenoles totales, lo que nos hace pensar, que a diferencia de lo que ocurre con otros compuestos naturales en los que la actividad de sus componentes suele ser sinérgica, cuando los compuestos de yerba mate actúan en solo, la actividad inhibitoria es más manifiesta que cuando están en el extracto completo.

Observamos discrepancias con los resultados presentados por Filip *et. al.*, (2010) en un estudio realizado con *Malassezia furfur*, el valor de la CIM fue 1000 mg/mL, valor considerablemente mayor al comunicado en nuestro estudio.

Para remarcar, Filip evaluó la sensibilidad *in vitro* por dilución en medio sólido, otro factor que debe ser considerado es que en nuestro trabajo evaluamos especies de *Candida* y a *S. cerevisiae*, pertenecientes a los *Ascomycetes*, mientras que *M. furfur* es una levadura *Basidiomycete*, con distinta estructura de pared.



Si observamos los resultados de los escasos trabajos disponibles en la literatura, nos surge la pregunta de si los polifenoles de la yerba mate serían más activos frente a los hongos *Ascomycetes*.

La actividad del extracto acuoso de yerba mate utilizado en el presente estudio, mostró importante acción inhibitoria frente a distintas especies de levaduras del género *Candida* y a *S. cerevisiae*.

- ***Evaluación de la sensibilidad in vitro de EAHYM por difusión y dilución en medio sólido***

El método de referencia de dilución en caldo es el adecuado para determinar la sensibilidad de los extractos acuosos de yerba mate en el laboratorio. No obstante, el método de referencia es oneroso, es laborioso, requiere de equipos e insumos con los que no siempre cuentan los laboratorios.

Por tal motivo, evaluamos la actividad de los EAHYM por difusión en medio sólido utilizando discos de papel embebidos en concentraciones fijas de EAHYM y por dilución en medio sólido.

Con ambas técnicas no observamos actividad inhibitoria, a pesar que las cepas fueron inhibidas por distintas concentraciones de EAHYM cuando se evaluaron con el método de referencia por dilución en caldo.

La técnica de difusión en medio sólido utilizando discos es ampliamente utilizada para la determinación de la actividad antimicrobiana. Aunque es posible que los resultados no sean los esperados debido a la interacción entre el papel filtro Whatman, compuesto por celulosa, cuya estructura química está constituida por uniones  $\beta$ -(1-4) de monómeros de glucosa, con grupos hidroxilos libres, lo que le da carácter de superficie hidrofílica al disco, con posibilidad de relacionarse con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales que se absorben a la superficie del disco e impiden la difusión en el agar. De esta manera se impide la interacción con el microorganismo a evaluar, lo que genera resultados negativos de inhibición que conlleva a errores en la interpretación (Ramírez, 2009).



## **DISCUSION**

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis, analizamos y discutimos los resultados de la determinación de la CIM y observamos la escasa concordancia entre las técnicas de difusión en medio sólido y el método de referencia.

Con la intención de encontrar un método adecuado que permitiera obtener resultados fiables, reproducibles para determinar la sensibilidad *in vitro* de los EAHYM frente a levaduras causantes de CVV, pusimos a punto la técnica de dilución en caldo y difusión en medio sólido.

Comparar la acción de los antifúngicos convencionales, drogas puras, frente a extractos vegetales que presentan una variedad de componentes en diferentes concentraciones, sigue siendo motivo de estudios fitoquímicos que son muy importantes para aislar los compuestos presentes y determinar que sustancia es la responsable de la acción inhibitoria o si existen efectos sinérgicos entre ellas.

Nuestro aporte al determinar el potencial inhibitorio del extracto de yerba mate frente a levaduras aisladas de vulvovaginitis, se presenta como una herramienta para obtener un producto etnofarmacológico natural y económico, quizás con escasos o nulos efectos secundarios que pueda ser utilizado como tratamiento de la CVV. Esta patología produce tantas incomodidades a la mujer, que puede repercutir en sus relaciones familiares, así como trastornos emocionales y psicológicos, además de gastos constantes en tratamientos con antifúngicos y otras alternativas de tratamiento.



## CONCLUSIONES

- En este trabajo, la distribución de especies de levaduras coincide con otros estudios a nivel mundial que indican que el complejo *C. albicans* ocupa el primer lugar seguido del complejo *C. glabrata*.
- *S. cerevisiae* se presenta como un patógeno emergente como agente de vulvovaginitis. Su presencia debe monitorearse por ser menos sensible a los antifúngicos.
- A la fecha, comunicamos el primer aislamiento de las especies crípticas *C. nivariensis* y *C. metapsilosis* de como agentes de vulvovaginitis en Argentina.
- Observamos un amplio rango de valores de CIM para los 4 antifúngicos evaluados, evidenciándose que la sensibilidad es especie dependiente.
- En general, los resultados obtenidos con la técnica de difusión en agar resultaron discordantes con el método de referencia, aunque las tabletas cargadas con fluconazol serían una herramienta de utilidad para discriminar aislados sensibles al fluconazol.
- La incorporación de modificaciones menores al método EDef 7.3.1 del EUCAST para determinar la sensibilidad *in vitro* de los EAHYM permitió realizar las lecturas e interpretación de resultados.
- Las hojas de la yerba mate cosechadas en la provincia de Misiones, Argentina, poseen componentes bioactivos que inhiben a hongos levaduriformes asociados a vulvovaginitis. Pudimos comprobar que existe actividad inhibitoria *in vitro* del EAHYM frente a especies de *Candida* y *S. cerevisiae*.
- Este trabajo constituye un primer aporte al conocimiento de la actividad inhibitoria de EAHYM sobre especies de *Candida* y *S. cerevisiae* aisladas de pacientes con vulvovaginitis y evaluada por un método de referencia.



## RECOMENDACIONES

- Estudiar el comportamiento de los extractos acuosos con distintos solventes.
- Identificar los componentes de los polifenoles en los distintos extractos.
- Comprender mecanismos de acción de los extractos acuosos de yerba mate.
- Lograr con el extracto de *I. paraguariensis* S. Hilarie (yerba mate) una formulación tópica para ser utilizada como biofungicida en casos de candidiasis vulvovaginal.



## CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se trabajó con cepas de levaduras recuperadas de pacientes con signos clínicos de candidiasis vulvovaginal. Los datos filiatorios, clínicos, y resultados de las pacientes fueron encriptados y resguardados en forma confidencial.



## REFERENCIAS

- Albuquerque, C., & Tapia, C.V. (2013). Interacción *Candida albicans*-Hospedero: un proceso complejo en el que la inmunidad innata juega un importante papel. *Boletín Micológico*; 28(2), 37-47.
- Alemán Mondeja, L. D., Almanza Martínez, C., & Fernández Limia, O. (2010). Diagnóstico y prevalencia de infecciones vaginales. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 36(2), 62-103. Recuperado en 19 de julio de 2020, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-600X2010000200008&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2010000200008&lng=es&tlng=es).
- Allevato, M. A. J., Negroni, R., & Galimberti, R. (2007). Antifúngicos: Ayer, hoy y mañana. *Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas*; 30(8), 1-12. Disponible en: [http://www.atdermae.com/pdfs/atd\\_30\\_01\\_02.pdf](http://www.atdermae.com/pdfs/atd_30_01_02.pdf).
- Al Mosaid, A., Sullivan, D. J., & Coleman, D. C. (2003). Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10), 4787–4789. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.10.4787-4789.2003>.
- Alsina, M., Arencibia, O., Centeno, C., de la Cueva, P., Fuertes, I., Fusté P., Galiano, S., Martínez Escoriza, J.C., Nonell, R., Sendagorta, E., Serrano, M., & Vall, M. (2016). *AEPCG-Guía: Infecciones del tracto genital inferior*, 1-66.
- Anesini, C., Ferraro, G. y Filip, R. (2006). Actividad similar a la peroxidasa de *Ilex paraguariensis*. *Química de los alimentos*, 97 (3), 459-464.
- Angoulvant, A., Guitard, J., & Hennequin, C. (2016). Old and new pathogenic *Nakaseomyces*-species: epidemiology, biology, identification, pathogenicity and Antifungal resistance. *FEMS Yeast Research*. 16 (2), fov114. doi: 10.1093/femsyr/fov114. Epub 2015 Dec 20.
- Arango, A., & Moreno, N. (2012). Diagnóstico micológico: del examen directo a los métodos moleculares. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 20(1), 76-82.
- Ardizzoli, K., Farinatti, A., Negroni, R., & Santiso, G. (2018). Un desafío desde el diagnóstico hasta el tratamiento. Conclusiones y Recomendaciones. Jornada de candidiasis vaginal recidivante. *Boletín AAM (Asociación Argentina de Microbiología)*. N° 219. Pág 27-30.
- Arechavala, A. I., Bianchi, M. H., Robles, A. M., Santiso, G., & Negroni, R. (2007). Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas





- de levaduras aisladas de flujo vaginal. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(4), 305–308. [https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(07\)70061-x](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(07)70061-x).
- Arendrup, M. C., Meletiadis, J., Mouton, J. W., Lagrou, K., Hamal, P., Guinea, J., and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Definitive Document E.Def. 7.3.2. (2020). [www.eucast.org](http://www.eucast.org).
- Argimón, S., Wishart, J. A., Leng, R., Macaskill, S., Mavor, A., Alexandris, T., Nicholls, S., Knight, A. W., Enjalbert, B., Walmsley, R., Odds, F. C., Gow, N. A., & Brown, A. J. (2007). Developmental regulation of an adhesin gene during cellular morphogenesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*, 6(4), 682–692. <https://doi.org/10.1128/EC.00340-06>.
- Arroyo-Fajardo A., San Juan-Delgado M.F., García-Rodríguez J. (2017). Vaginitis por *Candida glabrata*: ¿la gran olvidada? *Revista Iberoamericana de Micología*; 34 (4):246–250. DOI: 10.1016/j.riam.2017.01.001.
- Aznar-Marin, P., Galan-Sanchez, F., Marin-Casanova, P., García-Martos, P., & Rodríguez-Iglesias M. (2016). *Candida nivariensis* as a New Emergent Agent of Vulvovaginal Candidiasis: Description of Cases and Review of Published Studies. *Mycopathologia*. 181(5-6):445-9. doi: 10.1007/s11046-015-9978-y.
- Barañaño J.L. (2015). Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina. Documento: Argentina Innovadora 2020. Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. Lineamientos estratégicos 2012-2015.
- Barrenetxea Ziarrusta G. (2002). Vulvovaginitis candidiásica. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19(1), 22–24.
- Bartoli, M. Z., Cingolani, B., García-Effron, G., Gamarra S. (2011). Análisis de métodos fenotípicos para la diferenciación de *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*. Propuesta de una secuencia de identificación. *Revista FABICIB*; 15, 138-149.
- Bastidas, R. J., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (2009). The protein kinase Tor1 regulates adhesin gene expression in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 5(2), e1000294. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000294>.
- Baumann, E., Stoya, G., Völkner, A., Richter, W., Lemke, C., & Linss, W. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane



- structure. *Acta Histochemica*, 102(1), 21–35. <https://doi.org/10.1078/0065-1281-00534>.
- Bialková, A., & Subík, J. (2006) Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Folia Microbiologica (Praha)*, 51(1), 3–20. <https://doi.org/10.1007/BF02931443>.
- Bishop, J. A., Chase, N., Lee, R., Kurtzman, C. P., & Merz, W. G. (2008). Production of white colonies on CHROMagar Candida medium by members of the *Candida glabrata* clade and other species with overlapping phenotypic traits. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10), 3498–3500. <https://doi.org/10.1128/JCM.00982-08>.
- Blanco, M. T., Sacristán, B., Lucio, L., Blanco, J., Pérez-Giraldo, C., & Gómez-García, A. C. (2010). La hidrofobicidad de la superficie celular como indicador de otros factores de virulencia en *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(4), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.09.001>.
- Bottinelli, M. M. (2007). La producción de conocimientos y las publicaciones científicas en la práctica profesional. Reflexiones metodológicas sobre la producción de artículos científicos”. En Cuadernos de trabajo del centro de investigaciones en teorías y prácticas científicas, N° 6 Ediciones EDUNLA. Universidad Nacional de Lanús Depto. Humanidades y Artes. Pág.: 62-91, ISSN 1667-4995.
- Brand A. (2012). Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. *International Journal of Microbiology*, 2012, 517529. <https://doi.org/10.1155/2012/517529>.
- Brumovsky, L. A., Hartwig, V. G., y Aguirre, T. (2008) Evaluación del contenido de polifenoles totales en distintas formas de consumo de yerba mate producidas en argentina – FCEQ y N – UNaM – INYM. <https://studylib.es/doc/7062246/evaluaci%C3%B3n-del-contenido-de-polifenoles-totales-en>
- Buckley, H. R., & van Uden N. (1963). The identification of *Candida albicans* within two hours by the use of an egg white slide preparation. *Sabouraudia*, 2(4), 205–208. <https://doi.org/10.1080/00362176385190351>
- Buitrón García, R., Bonifaz, A., Amancio Chassin, O., Basurto Kuba, E., Araiza, J., & Romero Cabello, R. (2007). Correlación clinico-micológica de la candidiasis vulvovaginal. *Ginecología y Obstetricia de Mexico*, 75(2), 68–72.



- Burris, K. P., Davidson, P. M., Stewart, C. N., Jr, & Harte, F. M. (2011). Antimicrobial activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts against Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus. *Journal of Food Science*, 76(6), M456–M462. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02255.x>
- Burris, K. P., Harte, F., Davidson, P., Neal Stewart, C., & Zivanovic, S. (2012) Composición y propiedades de bioactivos de yerba mate (*Ilex paraguariensis* a. St.-Hil.): una revisión. *Revista Chilena de Investigación Agrícola*. 72 (2).
- Burris K.P., Higginbotham K. Stewart Jr. N. (2015). Aqueous extracts of yerba mate as bactericidal agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a microbiological medium and ground beef mixtures Food Control 50: 748- 753. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.021>
- Buscemi, L., Arechavala, A., & Negroni, R. (2004). Study of acute vulvovaginitis in sexually active adult women, with special reference to candidosis, in patients of the Francisco J. Muñiz Infectious Diseases Hospital. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21(4), 177–181.
- Camacho, L. D., Mata, E. S., Pardi, G., Pineda, V., Roselló, A., & Colella, M. T. (2012). Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la diferenciación entre *Candida dubliniensis* y *Candida albicans*. *Kasmera*. 40(1), 47 – 58.
- Cantón, E., Pemán, J., Sastre, M., Valentín, A., Bosch, M., & Espinel-Ingroff, A. (2006). Evaluación y utilidad de los métodos E-test y Neo-Sensitabs para estudiar la sensibilidad de las levaduras al fluconazol. *Revista Española de Quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 19(3), 267–274.
- Carelli, G; Macedo, SMD; Valduga, AT; Corazza, ML; Oliveira, JV; Franceschi, E; Vidal, R; Jaskulski, MR. (2011). Evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana de la "yerba mate" (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) Extracto obtenido mediante el uso de CO<sub>2</sub> supercrítico. *Revista Brasileira de plantas medicinales*. vol.13 no.1 Botucatu. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000100016>.
- Carini, M., Facino, RM, Aldini, G., Calloni, M. y Colombo, L. (1998). Caracterización de antioxidantes fenólicos de Maté (*Ilex paraguayensis*) mediante cromatografía líquida / espectrometría de masas y cromatografía líquida / espectrometría de masas en



tándem. *Comunicaciones rápidas en espectrometría de masas*, 12 (22), 1813-1819.

Carrasco-Ríos, L. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta-b en plantas. *Idesia (Arica)*, 27(3), 59-76. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292009000300009>.

Carrillo Muñoz, A. J., Giusiano, G. E., Arechavala, A., Tur Tur, C., Eraso, E., Jauregizar, N., Quindós, G., & Negroni, R. (2015). La utilidad clínica de los derivados triazólicos en el tratamiento de las infecciones fúngicas. *Sociedad Española de Quimioterapia; Revista Española de Quimioterapia*; 28 (4), 169-182.

Castrillon-Rivera, L., Palma-Ramos, A., & Padilla-Desgarenes, M. C. (2013). Biopelículas fúngicas. *Dermatología Revista Mexicana*, 57(5), 350- 361.

Castro Rodríguez, K. A. (2015). Estudio clínico, epidemiológico y de laboratorio de la vulvovaginitis asociada a levaduras en mujeres mayores de 15 años de la ciudad de León, Nicaragua. *Revista Científica de la UNAN-León*, 6(1), 11-23.

CLSI. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; M26-A. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute. (1999)

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4<sup>th</sup> ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2nd ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020.

CLSI. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast, 3rd. ed. CLSI guidelines M44. Wayne, PA: Document M44-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI: 2018.

Coentrão, P., Teixeira, V. L., & Netto, A. D. P. (2011). Antioxidant activity of polyphenols from green and toasted mate tea. *Natural product communications*, 6(5), 651-656.

Cooperativa Yerbatera Andresito Ltda. Ruta Prov. N°25 Zona Industrial, Almirante Brown, Misiones, Argentina. Tel.: (54) (03757) 49740 - Fax.: (54) (03757) 497160 - e-mail: [coop\\_andresito@yahoo.com.ar](mailto:coop_andresito@yahoo.com.ar)

<http://sgc.anlis.gob.ar/bitstream/123456789/546/1/Reiev%2C2009%2C4%281y2%2930-32.pdf>.



- Córdoba, S., & Davel, G. (2018). Manual Curso a Distancia y Taller “Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el laboratorio”. Departamento de Micología. ANLIS INEI. Dr. C. G. Malbrán.
- Córdoba, S., Taverna, C., Vivot, W., Szusz, W., Vivot, M., Isla, G., & Davel, G. (2018). Emergence of Resistance to Fluconazole in *Candida albicans* Isolated From Vaginal Discharge. *Current Fungal Infection Reports*, 12, 155–160. <https://doi.org/10.1007/s12281-018-0329-6>.
- Cuenca-Estrella, M. (2010). Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Revista española de Quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 23(4), 169–176.
- Chen, S. L., Yu, H., Luo, H. M., Wu, Q., Li, C. F., & Steinmetz, A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese Medicine*, 11, 37. <https://doi.org/10.1186/s13020-016-0108-7>.
- Davicino, R., Mattar, M. A., Casali, Y. A., Correa, S. G., Pettenati, E. M., & Micalizzi B. (2007) Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Revista Peruana de Biología*. 14(2): 247-251. © Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM.
- De Biasi, B., Grazziotin, N. A., & Hofmann, Jr., A.E. (2009). Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* St.-Hil., Aquifoliaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2b), 582-585. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400013>
- de Capriles, CH, Mata, S. y Middelveen, M. (1989). Preservación de hongos en el agua (Castellani): 20 años. *Mycopathologia* 106, 73–79 <https://doi.org/10.1007/BF00437084>
- Dellacassa, E., & Bandoni A. (2001) El mate. *Revista de Fitoterapia*. 1(4): 269-278.
- Dellacassa, E., Cesio, V., Vázquez, A., Echeverry, S., Soule, S., Ferreira, F., & Heinzen, H. (2007). Yerba mate. Historia, uso y propiedades. *Revista de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay*, 51, 16-20.
- De la Calle-Rodríguez, N., Santa-Vélez, C., & Cardona-Castro, N. (2012) Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *CES Medicina*; 26(1): 43-55. ISSN: 0120-8705. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=2611/261123426005>.



- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., y Martino, M. N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71(1), 126-134.
- Del Pozo, J. L., & Cantón, E. (2016). Candida biofilm-related infections. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(3), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2015.06.004>.
- Denning, D. W., Kneale, M., Sobel, J. D., & Rautemaa-Richardson, R. (2018). Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(11), e339–e347. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30103-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30103-8).
- Díaz, M. C. (2005) Cursos. Utilidad clínica de la determinación de sensibilidad antifúngica *in vitro*. *Medwave*. 5(8), 3554. <http://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/Cursos/3554>.
- Díaz, A., & Garcés, C. (2012) Uso Actual de los Antifúngicos triazoles en niños. *Infectio*, 16(3), 82-93. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(12\)70031-0](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70031-0).
- Díaz, M. C., Camponovo, R., Araya, I., Cerda, A., Santander, M. P., & Carrillo-Muñoz, A. J. (2016). Identificación y sensibilidad antifúngica in vitro de *Candida* spp. de origen vaginal a fluconazol, clotrimazol y nistatina. *Revista Española de Quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 29(3), 151–154.
- Diekema, D., Arbefeville, S., Boyken, L., Kroeger, J., & Pfaller, M. (2012). The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73(1), 45–48. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.001>.
- Donders, G. G., & Sobel, J. D. (2017). Candida vulvovaginitis: A store with a butterfly and a show window. *Mycoses*, 60, 70-2. doi: 10.1111/myc.12572.
- Dudiuk, C. (2017). Subunidades Fksp del complejo beta-1,3- D-glucansintetasa de *Candida glabrata*: rol en la síntesis de la pared celular, en la resistencia a las equinocandinas y como marcadores de resistencia clínica. <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/tesis/handle/11185/994>.
- Echeverría-Irigoyen, M. J., Eraso, E., Cano, J., Gomáriz, M., Guarro, J., & Quindós, G. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* vaginitis: microbiology and in vitro antifungal susceptibility. *Mycopathologia*, 172(3), 201–205. <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9414-x>.
- Edwards, J. E., Schwartz, M. M., Schmidt, C. S., Sobel, J. D., Nyirjesy, P., Schodel, F., Marchus, E., Lizakowski, M., DeMontigny, E. A., Hoeg, J., Holmberg,



- T., Cooke, M. T., Hoover, K., Edwards, L., Jacobs, M., Sussman, S., Augenbraun, M., Drusano, M., Yeaman, M. R.,... & Hennessey, J. P., Jr (2018). A Fungal Immunotherapeutic Vaccine (NDV-3A) for Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis-A Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 66(12), 1928–1936. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy185>.
- Enache-Angoulvant, A. (2007). Reglas de interpretación de las infecciones por *Candida*. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 41(4). 587-593.
- Espinel-Ingroff, A., Canton, E., Gibbs, D., & Wang, A. (2007). Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole. *Journal of clinical microbiology*, 45(3), 858–864. <https://doi.org/10.1128/JCM.01900-06>.
- Espinosa Pérez, J. F (2017). Evaluación de factores de virulencia y Susceptibilidad antifúngica de aislamientos clínicos del complejo *Candida glabrata*. Tesis (Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Médica). Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/14482/>.
- EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and agar dilution for yeasts and moulds as recommended by EUCAST. Version 4.0, 2020. (<http://www.eucast.org>).
- EUCAST -The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.3, E.Def 9.3 and E.Def 11.0 procedures. Version 2, 2020. <http://www.eucast.org>.
- Fan, S. R., Liu, X. P., & Li, J. W. (2008). Clinical characteristics of vulvovaginal candidiasis and antifungal susceptibilities of *Candida* species isolates among patients in southern China from 2003 to 2006. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 34(4), 561–566. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2008.00817.x>.
- Fernández Andreu, C. M., Díaz Suárez, L. A., Illnait Zaragoza, M. T., Aragonés López, C., Martínez Machín, G., Perurena Lancha, M. R., & Rodríguez Gutiérrez, I. (2013). Conservación de cultivos de hongos de importancia



- médica en agua destilada. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 65(3), 361-369.
- Ferris, D. G., Nyirjesy, P., Sobel, J. D., Soper, D., Pavletic, A., & Litaker, M. S. (2002). Over-the-counter antifungal drug misuse associated with patient-diagnosed vulvovaginal candidiasis. *Obstetrics and Gynecology*, 99(3), 419–425. [https://doi.org/10.1016/s0029-7844\(01\)01759-8](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(01)01759-8).
- Figueiredo-Carvalho, M. H., Ramos, L de S., Barbedo, L. S., Chaves, A. L., Muramoto, I. A., Santos, A. L., Almeida-Paes, R., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2016). First description of *Candida nivariensis* in Brazil: antifungal susceptibility profile and potential virulence attributes, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*; 111(1):51-8.
- Filip, R., López, P., Giberti, G., Coussio, J., & Ferraro, G. (2001). Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*, 72(7), 774–778. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(01\)00331-8](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(01)00331-8).
- Filip, R., Davicino, R., & Anesini, C. (2010). Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur*. *Phytotherapy Research: PTR*, 24(5), 715–719. <https://doi.org/10.1002/ptr.3004>.
- Filler S. G. (2012). Insights from human studies into the host defense against candidiasis. *Cytokine*, 58(1), 129–132. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.09.018>.
- Fretes Corrales, M. L. (2017). Efeito in vitro de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) frente a leveduras do gênero *Candida* spp. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Estadual de Maringá. <http://www.pcs.uem.br/pgo/dissertacoes/dissertacoes-dos-egressos-de-2016-1/MayraLeticiaConcepcionFretesCorrales.pdf>
- Fuentes, M., Hermosilla, G., Alburquenque, C., Falconer, M., Amaro, J., & Tapia, C., (2014). Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *Candida albicans*. *Revista Chilena Infectología*. 31(5), 511-517. doi: 10.4067/S0716-10182014000500001.
- Gabaldón, T., Martin, T., Marcet-Houben, M., Durrens, P., Bolotin-Fukuhara, M., Lespinet, O., Arnaise, S., Boisnard, S., Aguilera, G., Atanasova, R., Bouchier, C., Couloux, A., Creno, S., Almeida Cruz J., Devillers, H., Enache-Angoulvant, A., Guitard, J., Jaouen, L., Ma, L., ... & Fairhead, C. (2013). Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics*. 14, 623. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-623>.





- Galán, F., García-Agudo, L., Guerrero, I., Marín, P., García-Tapia, A., García-Martos, P., & Rodríguez-Iglesias, M. (2015). Evaluación de la espectrometría de masas en la identificación de levaduras de interés clínico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(6), 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.003>.
- Gamarra, S., Morano, S., Dudiuk, C., Mancilla, E., Nardin, M. E., de Los Angeles Méndez, E., & Garcia-Effron, G. (2014). Epidemiology and antifungal susceptibilities of yeasts causing vulvovaginitis in a teaching hospital. *Mycopathologia*, 178(3-4), 251–258. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9780-2>.
- García Cortés, V. (2012). Introducción a la microbiología (2da ed., p.203). Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- García Heredia, M., García, S. D., Copolillo, E. F., Cora Eliseth, M., Barata, A. D., Vay, C. A., de Torres, R. A., Tiraboschi, N., & Famiglietti, A. M. (2006). Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(1), 9–12.
- García Martínez, EM., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. <http://hdl.handle.net/10251/52056>
- García-Salazar, E., Duarte-Escalante, E., López-Álvarez, MR., Martínez-Herrera, E., Acosta-Altamirano, G., Reyes-Montes, MR., y Frías De León, MG. (2017). Variabilidad genética de aislados del complejo *Candida parapsilosis* en dos servicios de un hospital terciario de la Ciudad de México. *Investigación Clínica*, 58(3), 227-237.
- Gianecini R.A. (2015) Evaluación de métodos fenotípicos e incorporación de un método de biología molecular para la diferenciación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. [Tesis de Maestría en Microbiología molecular]. <http://sgc.anlis.gob.ar/handle/123456789/575>.
- Gil Febres, M. M., González, L., Mendoza, V., Ochoa, M., Castrillo, S., Sánchez, J., & Briceño, A. (2017). Capacidad de formación de biopelículas en especies del género *Candida* de procedencia clínica. *Revista Médica de Risaralda*, 23 (2), 4-9.
- Giri, S., Kindo, A. J., & Kalyani, J. (2014). Fatal Case of Candidemia due to *Candida glabrata*. *Journal of Laboratory Physicians*, 6(1), 63–64. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.129098>.



- Giusiano, G., Rojas, F., Toma-Vanacore, S., & Mangiaterra, M. (2009). Frequency and antifungal profile of *Candida* isolated from vaginal exudates of preadolescent girls. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(7), 428. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.07.009>.
- Giusiano, E. G.; Piontelli, E. L. (2016) Soluciones de montaje, coloraciones y medios de cultivo. *Hongos Oportunistas Levaduriformes y Filamentosos Comunes en Clínica. 1ra edición: 235 – 239*.
- Gomez-Moyano, E., Cid Lama, A., Fernández Ballesteros, M. D., Lova Navarro, M., Vera Casaño, A., & Crespo Erchiga, V. (2013). Eficacia terapéutica del voriconazol en candidiasis vulvovaginal crónica por *Candida glabrata*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 61–63. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.07.004>.
- Gómez Quintero, C.H. (2010). Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Infectio*. vol.14 suppl.2 Bogotá. Print version ISSN 0123-9392.
- Gonzalez Coria, J. C. G., & Horianski, M. A. (2018) Actividad Antibacteriana in vitro de extractos Hidroalcohólicos secos de Yerba Mate elaborada procedente de Paraguay. *Revista de Ciencia y Tecnología (RECYT) UNaM* (Universidad Nacional de Misiones). Rep. Argentina. Año 20 / N° 30 / 2018 / 12–20. <https://www.fceqyn.unam.edu.ar/recyt/index.php/recyt/article/view/251>.
- Gorjanović, S., Komes, D., Pastor, F. T., Belščak-Cvitanović, A., Pezo, L., Hečimović, I., & Sužnjević, D. (2012). Antioxidant capacity of teas and herbal infusions: polarographic assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(38), 9573–9580. <https://doi.org/10.1021/jf302375t>.
- Guelfand, L.; Cataldi, S.; Arechavala, A.; Perrone, M. (2015) Preparación de Medios y Reactivos. Manual Práctico de Micología Médica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Suplemento 1: 83-99.
- Guinea J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20 Suppl 6, 5–10. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12539>.
- Gutiérrez-Martínez, M. J., Araiza-Santibáñez, J., Hernández, M. A., Chávez-Mayol, J. M., Rodríguez-Piñeyro, O. M., & Bonifaz, A. (2012). Estudio in vitro de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del



- Hospital General de México OD. *Dermatología Revista Mexicana*, 56(2), 93-101.
- Hartz Alves, S.; Milan, E. P.; De Laet Sant'Ana, P.; Oliveira, L. o.; Santurio, J. M.; Lopes Colombo, A. (2002). Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 43: 85 - 86.
- Haraguchi, H., Kataoka, S., Okamoto, S., Hanafi, M., & Shibata, K. (1999). Antimicrobial triterpenes from *Ilex integra* and the mechanism of antifungal action. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 13(2), 151-156.
- Hartwig, V. G.. (2015). Obtención de extractos secos de yerba mate con alto contenido de polifenoles y alta capacidad antioxidante. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Recuperado de [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n5817\\_Hartwig](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5817_Hartwig)
- Hashemi, S. E., Shokohi, T., Abastabar, M., Aslani, N., Ghadamzadeh, M., & Haghani I. (2019) Species distribution and susceptibility profiles of *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis, emergence of *C. lusitaniae*. *Current Medical Mycology*. 5(4), 26-34. doi: 10.18502/cmm.5.4.2062.
- Hazirolan, G., Altun, H. U., Gumral, R., Gursoy, N. C., Otlu, B., & Sancak, B. (2017). Prevalence of *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis: First Turkish *Candida africana* isolates from vulvovaginal candidiasis. *Journal de Mycologie Medicale*, 27(3), 376–381. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.04.106>.
- Heck, C. I., Schmalko, M., & Gonzalez de Mejia, E. (2008). Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8394–8403. <https://doi.org/10.1021/jf801748s>.
- Hernández-Solís, S. E., Rueda-Gordillo, F., & Rojas-Herrera, R. A. (2014). Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(2), 137 – 140. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.003>.
- Hou, X., Xiao, M., Chen, S. C., Kong, F., Wang, H., Chu, Y. Z., Kang, M., Sun, Z. Y., Hu, Z. D., Li, R. Y., Lu, J., Liao, K., Hu, T. S., Ni, Y. X., Zou, G. L., Zhang, G., Fan, X., Zhao, Y. P., & Xu, Y. C. (2017). Molecular Epidemiology and



- Antifungal Susceptibility of *Candida glabrata* in China (August 2009 to July 2014): A Multi-Center Study. *Frontiers in Microbiology*, 8, 880. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00880>.
- Ibrahim, A. S., Luo, G., Gebremariam, T., Lee, H., Schmidt, C. S., Hennessey, J. P., Jr, French, S. W., Yeaman, M. R., Filler, S. G., & Edwards, J. E., Jr (2013). NDV-3 protects mice from vulvovaginal candidiasis through T- and B-cell immune response. *Vaccine*, 31(47), 5549–5556. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.016>.
- INTA .INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA. <https://inta.gob.ar/cerroazul>.
- INYM. INSTITUTO NACIONAL DE LA YERBA MATE. <https://www.inym.org.ar/es/>.
- ISO/FDIS 14502-1:2004 (E) “Determination of total polyphenols in tea Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent. Part 1”.
- Isao. Kubo, Hisae. Muroi y Masaki. Himejima. (1993) Actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* de los componentes del sabor del mate. *Revista de química agrícola y alimentaria*. 41 (1), 107-111. DOI: 10.1021 / jf00025a023
- Khan, M., Ahmed, J., Gul, A., Ikram, A., & Lalani, F. K. (2018). Antifungal susceptibility testing of vulvovaginal *Candida* species among women attending antenatal clinic in tertiary care hospitals of Peshawar. *Infection and Drug Resistance*, 11, 447–456. <https://doi.org/10.2147/IDR.S153116>.
- Kennedy, M. A., & Sobel, J. D. (2010). Vulvovaginal Candidiasis Caused by Non-albicans *Candida* species: New Insights. *Current Infectious Disease Reports*, 12(6), 465–470. <https://doi.org/10.1007/s11908-010-0137-9>.
- Kiasat, N., Rezaei-Matehkolaei, A., & Mahmoudabadi, A. Z. (2019). Microsatellite Typing and Antifungal Susceptibility of *Candida glabrata* Strains Isolated From Patients With *Candida* Vaginitis. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1678. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01678>.
- Kiraz, N., Dag, I., Oz, Y., Yamac, M., Kiremitci, A., & Kasifoglu, N. (2010). Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*. *Journal of microbiological methods*, 82(2), 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.05.002>.
- Kołaczkowska, A., & Kołaczkowski, M. (2016). Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species. *The Journal of*



*Antimicrobial Chemotherapy*, 71(6), 1438–1450.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkv445>.

- Kumamoto, C. A., & Vinces, M. D. (2005). Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cellular Microbiology*, 7(11), 1546–1554. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00616.x>
- Kurtzman, C. P., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th Edition, Elsevier, Amsterdam. Volumen 1. <https://www.elsevier.com/books/the-yeasts/kurtzman/978-0-444-52149-1>.
- Lachance MA, Boekhout T, Scorzetti G, Fell JW, Kurtzman CP (2011) *Candida* Berkhout. En: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, eds. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th Edition, Elsevier, Amsterdam pp. 987-1277.
- Lagier, J. (2014). *La Aventura de la Yerba Mate, Más de cuatro siglos de Historia*, Jerónimo Lagier, Editorial Tambú. Cap. 1: La Conquista y los Jesuitas
- Li, J., Shan, Y., Fan, S., & Liu, X. (2014). Prevalence of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in vulvovaginal Candidiasis. *Mycopathologia*. 178(3-4):279-83. doi: 10.1007/s11046-014-9800-2.
- Lima J.S.; Braga K.R.; Vieira C.A.; Souza W.W.R.; Chávez-Pavoni J.H. y de Araújo C. Goulart L.S. (2018). Genotypic analysis of secreted aspartyl proteinases in vaginal *Candida albicans* isolates. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. vol.54 no.1. Rio de Janeiro.
- Liu, Y., & Filler, S. G. (2011). *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryotic cell*, 10(2), 168–173. <https://doi.org/10.1128/EC.00279-10>.
- Llovera Suárez, V., & Perurena Lancha, M. R. (2004). Identificación de levaduras de exudados vaginales: características clínicas asociadas a la candidiasis. *Revista cubana de medicina tropical*, 56(1), 21–25.
- López Alvarez, J. L., Martínez Vidal, A., & Blanco López, M. A. (2005). Vulvovaginitis. *Guías Clínicas* 5(30), 134-140.
- López-Ávila K., Lugo-Caballero C., Arias-León J. J., Zavala-Castro J., Dzul-Rosado Karla (2016) Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Revista Biomédica*; 27:127-136.
- Lopez, J., Dalle, F., Mantelin, P., Moiroux, P., Nierlich, A. C., Pacot, A., Cuisenier, B., Vagner, O., & Bonnin, A. (2001). Rapid identification of *Candida glabrata* based on trehalose and sucrose assimilation using Rosco diagnostic tablets. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(3), 1172–1174. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.1172-1174.2001>.



- López Martínez, R., Méndez Tovar, L. J., Hernández Hernández, F., & Castañón Olivares, R. (1995). *Micología Médica Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio*. 7, 99-105.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M. & Portolés, A. (2008). Velázquez *Farmacología Básica y Clínica*. Edición. Editorial Panamericana Madrid. 18, 957-968.
- Mahmoudi Rad, M., Zafarghandi, S., Abbasabadi, B., & Tavallaee, M. (2011). The epidemiology of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 155(2), 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2010.11.022>.
- Manzano-Gayosso P., Méndez-Tovar L. J., Hernández- Hernández F. & López-Martínez R. (2008). La resistencia a los Antifúngicos: un problema emergente en México. *Gaceta Médica Mexicana*; 144 (1), 23-26.
- Maldonado, I., Cataldi, S., Garbasz, C., Relloso, S., Striebeck, P., Guelfand, L., López Moral, L., Red de Micología de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (RMCABA), Argentina, & Red de Micología de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires: (2018). Identificación de levaduras del género *Candida*: los métodos convencionales frente a MALDI-TOF MS. *Revista Iberoamericana de Micología*, 35(3), 151–154. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2018.02.002>.
- Maldonado, MA., Berger, A., Costa, ME., Szabo, D., Catri, M., Lafage, L., y Fernández, C. (2013). Prevalencia de especies de *Candida* en vulvovaginitis. Evaluación de la actividad in vitro de fluconazol y nistatina. *Revista Argentina de Microbiología*, sup-1-vol-45.
- Maraki, S., Mavromanolaki, V. E., Stafylaki, D., Nioti, E., Hamilos, G., & Kasimati, A. (2019). Epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Candida* isolates from Greek women with vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*, 62(8), 692–697. <https://doi.org/10.1111/myc.12946>.
- Marchaim, D., Lemanek, L., Bheemreddy, S., Kaye, K. S., & Sobel, J. D. (2012). Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstetrics and Gynecology*, 120(6), 1407–1414. <https://doi.org/10.1097/aog.0b013e31827307b2>.
- Martínez, S., Mollinedo, P., Mamani, O., Almanza, G., & Terrazas, E. (2011). Estudio *in vitro* de la actividad antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* sobre *Candida albicans*. *Revista Boliviana de Química* .28 (1), 35-40.



- Medvedeff, M., Vedoya, M., Kramer, F., Señuk, I., Benitez, L. & Lorenzón, P. (2013). Ensayos preliminares in vitro de la actividad antifúngica de *Ilex paraguayensis* St. Hilarie. <http://www.inym.org.ar/wp-content/uploads/2017/06/Segunda-Jornada-Yerba-Mate-y-Salud.pdf>.
- Mejía Giraldo, J.C., Atehortúa, L., & Puertas Mejía, M. A. (2014). Foto-protección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares. *Dermatología CMQ*; 12(4), 272-281.
- Méndez-Tovar, L. J., Manzano-Gayosso, P., Velásquez-Hernández, V., Millan-Chiu, B., Hernández-Hernández, F., Mondragón-González, R., & López-Martínez, R. (2007). Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos de *Trichophyton spp.* *Revista Iberoamericana Micología*; 24(4), 320-322.
- Mendling, W., Brasch, J., (2012). Guideline vulvovaginal candidosis (2010) of the German Society for Gynecology and Obstetrics, the Working Group for Infections and Infectimmunology in Gynecology and Obstetrics, the German Society of Dermatology, the Board of German Dermatologists and the German Speaking Mycological Society. *Mycoses*, 55 Suppl 3, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2012.02185.x>.
- Miró, M. S., Rodríguez, E., Vigezzi, C., Icely, P. A., Gonzaga de Freitas Araújo, M., Riera, F. O., Vargas, L., Abiega, C., Caeiro, J. P., & Sotomayor, C. E. (2017). Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(2), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.11.006>.
- Mitchell, A. P. (2016). Microbiology: Fungus produces a toxic surprise. *Nature*, 532 (7597), 41–42. doi: 10.1038/nature17319.
- Mollerach, M. (2006). Genómica y proteómica: oportunidades y desafíos para la microbiología. *Revista Argentina de Microbiología* 38(1), 1-3.
- Morales-López, S., Taverna, C., Bosco-Borgeat, M., Maldonado, I., García-Effron, G., Córdoba, S. Identificación de especies crípticas del complejo *Candida glabrata*: utilidad del CHROMagar Candida, pruebas bioquímicas, espectrometría de masas (MALDI-TOF) Y PCR. XIII Congreso Argentino de Micología y 1ª Reunión de la Asociación Micológica Carlos Spegazzini. Buenos Aires, 24 al 27 de agosto, 2014. Presentación oral. DM 14 pág129.
- Morales-López, S. E., Taverna, C. G., Bosco-Borgeat, M. E., Maldonado, I., Vivot, W., Szusz, W., Garcia-Effron, G., & Córdoba, S. B. (2016). *Candida glabrata* species complex prevalence and antifungal susceptibility testing



- in a culture collection: First description of *Candida nivariensis* in Argentina. *Mycopathologia*, 181(11-12), 871–878. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0052-1>
- Moyes, D. L., Wilson, D., Richardson, J. P., Mogavero, S., Tang, S. X., Wernecke, J., Höfs, S., Gratacap, R. L., Robbins, J., Runglall, M., Murciano, C., Blagojevic, M., Thavaraj, S., Förster, T. M., Hebecker, B., Kasper, L., Vizcay, G., Iancu, S. I., Kichik, N., ... & Naglik, J. R. (2016). Candidalysin es una toxina peptídica fúngica crítica para la infección de la mucosa. *Nature*, 532 (7597), 64-8. <https://doi.org/10.1038/nature17625>.
- Muñoz Leiva Valdivia, M. V. (2012). Caracterización fenotípica y molecular de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* en muestras clínicas. 23 – 24. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fcm971c/doc/fcm971c.pdf>
- Naeimi, B., Mirhendi, H., Khamisipour, G., Sadeghzadeh, F., & Ahmadi, B. (2018). *Candida africana* in recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC) patients: frequency and phenotypic and genotypic characteristics. *Journal of Medical Microbiology*, 67(11), 1601–1607. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000834>.
- Nava Memije, K., Saldaña Juárez, C., Hernandez Córtez, C., & Aguilera Arreola, G. (2016). Principales Infecciones Cervicovaginales. *Revista trimestral científica, MedLab*. 8(4), 3-16.
- Negrón R., Arechavala A. I., Bianchi, M. H., & Robles A. M. (2008). Problemas clínicos en Micología Médica: problema nº 33. *Revista Iberoamericana de Micología*; 25, 196-198 [https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(08\)70047-0](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70047-0).
- Negrón, R.; Guelfand, L. y Perrone, M.C. (2011) Manual de medios y reactivos del laboratorio de Micología. Red de micología GCBA.
- Neo-Sensitabs User's Guide. 2016. Documento 3.15.0 para *Candida* spp. [www.rosco.dk](http://www.rosco.dk).
- Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J., & Gow, N. A. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 67–78. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1815>.
- Odds, F. C., & Bernaerts, R. (1994). CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(8), 1923–1929. <https://doi.org/10.1128/JCM.32.8.1923-1929.1994>.
- Ortigoza-Medrano, E. & Arroyo- Espinosa, D. I. (2014). Suceptibilidad *in vitro* de las especies de *Candida* a los antifúngicos en el Hospital de





- Especialidades del Centro Nacional de Occidente. *Medicina Interna de México*, 30, 373-380.
- Otero, A. (2018). Candidiasis vulvovaginal: Un problema de salud pública. Disponible en: <https://periodistas-es.com/candidiasis-vulvovaginal-un-problema-de-salud-publica-102117>.
- Panizo, M. M., & Reviákina, V. (2001). Adhesinas y receptores involucrados en el fenómeno de adherencia de *Candida albicans* a las células epiteliales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(1), 05-11.
- Papaemmanouil, V., Georgogiannis, N., Plega, M., Lalaki, J., Lydakis, D., Dimitriou, M., & Papadimitriou, A. (2011). Prevalence and susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* causing vaginitis in Greek women. *Anaerobe*, 17(6), 298–299. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.008>.
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., Walsh, T. J., Zaoutis, T. E., & Sobel, J. D. (2016). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 62 (4), e1–e50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>.
- Pardi, G., Mata Essayag, S., Colella, M. T., Roselló, A., Pineda, V., & Camacho, D. (2012). Reporte de caso detección e identificación de *Candida dubliniensis* por métodos fenotípicos en estomatitis sub-protésica. reporte de un caso. *Acta Odontológica Venezolana. Vol 50 N° 3*.
- Parolin, C., Marangoni, A., Laghi, L., Foschi, C., Ñahui Palomino, RA., Calonghi N., & Vitali B. (2015). Isolation of Vaginal Lactobacilli and Characterization of Anti-Candida Activity. *PLoS ONE* 10(6), e0131220. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131220>.
- Pedrola, I. E. (2010). Polifenoles y sus propiedades antioxidantes. Universidad Complutense de Madrid. <http://www.dietcan.net/docs/POLIFENOLES-MAD.pdf>.
- Peters, B. M., Yano, J., Noverr, M. C., & Fidel, P. L., Jr. (2014). *Candida* vaginitis: when opportunism knocks, the host responds. *PLoS pathogens*, 10(4), e1003965. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003965>.
- Pfaller, M. A., Sheehan, D. J., & Rex, J. H. (2004). Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal



- testing and the need for standardization. *Clinical microbiology reviews*, 17(2), 268–280. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.2.268-280.2004>.
- Pfaller M. A. (2012). Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine*, 125(1 Suppl), S3–S13. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001>.
- Perurena Lancha, M., Pérez Muñoz, Y., Fernández Andreu, C. M., Martínez Machín, G. & Illnait Zaragoz, M.T. (2016). Susceptibilidad antifúngica de aislados vaginales de *Candida* spp. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 68(3), 248-254.
- Pietrella, D., Pandey, N., Gabrielli, E., Pericolini, E., Perito, S., Kasper, L., Bistoni, F., Cassone, A., Hube, B., & Vecchiarelli, A. (2013). Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome. *European Journal of Immunology*, 43(3), 679–692. <https://doi.org/10.1002/eji.201242691>.
- Pineda, G., Scollo, K., Santiso, G., Lehmann, E., & Arechavala, A. (2008). Aislamiento de *Candida dubliniensis* en distintos materiales clínicos. Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación con *Candida albicans*. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(4), 211–217.
- Pineda-Murillo J., Cortés-Figueroa A., Uribarren-Berrueta T. y CastañónOlivares L. (2017). Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. *Revista Médica de Risaralda* 23 (1), 38 – 44.
- Pontón, J. & Quindós, G. (2006). Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. *Medicina Clínica*, 126(1), 56-60.
- Pradenas, M. (2014). Infecciones cérvico vaginales y embarazo. *Revista Medicina Clínica. Las Condes*; 25(6), 925-935.
- Prado Martin, J. G., Porto, E., de Alencar, S. M., da Glória, E. M., Corrêa, C. B., & Ribeiro Cabral, I. S. (2013). Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(2), 93–98. [https://doi.org/10.1016/s0325-7541\(13\)70006-3](https://doi.org/10.1016/s0325-7541(13)70006-3).
- Puig, L., & Gallardo, C. (2003). Vulvovaginitis. *Revista Farmacia Profesional*. 17(2), 7-79.
- Ramirez, L. S. & Marin Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et*



*Technica* Año XV, No 42, 263-268. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701 263.

- Ramírez-Navas, J. S. (2006). Liofilización de alimentos. *Revista ReCiTeIA (Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos)*. <https://es.calameo.com/read/00043365419cd1f250c9c>
- Rau, V. (2009). La yerba mate en misiones (Argentina). Estructura y significados de una producción localizada. *Agroalimentaria*, 15(28), 49-58.
- Relloso, M. S.; Nievas, J.; Fares Taie, S.; Farquharson, V.; Mujica, M. T.; Romano, V.; Zárate, M. S. y Smayevsky, J. (2015). Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Revista Argentina de Microbiología*. 47 (2): 103 - 107.
- Rempe, C., Burris, K. P., Woo, H. L., Goodrich, B., Gosnell, D. K., & Tschaplinski, T. J. (2015) Computational Ranking of Yerba Mate Small Molecules Based on Their Predicted Contribution to Antibacterial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 10(5), e0123925. doi:10.1371/journal.pone.0123925.
- Rempe C., Lenaghan S., Burris K. & Stewart Jr N. (2017). Metabolomic analysis of the mechanism of action of yerba mate aqueous extract on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Metabolomics* 13, 16. DOI 10.1007/s11306-016-1159-6.
- Rezaei-Matehkolaei, A., Shafiei, S., & Zarei-Mahmoudabadi, A. (2016). Isolation, molecular identification, and antifungal susceptibility profiles of vaginal isolates of *Candida* species. *Iranian Journal of Microbiology*, 8(6), 410–417.
- Richter, S. S., Galask, R. P., Messer, S. A., Hollis, R. J., Diekema, D. J., & Pfaller, M. A. (2005). Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2155–2162. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2155-2162.2005>.
- Rodríguez Vaquero M.J., Tomassini Serravalle, Manca de Nadra M.C. y Strasser de Saad A.M. (2010) Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control* 21 779–785.
- Rojas Armas, J., Ortiz Sánchez, J., Jáuregui Maldonado, J., Ruiz Quiroz, J., & Almonacid, R. (2015). Aceite esencial de *Thymus vulgaris* L (tomillo), su combinación con EDTA contra *Cándida albicans* y formulación de una



crema. *Anales de la Facultad de Medicina*. 76(3), 235-40  
<http://dx.doi.org/10.15381/anales.v76i3.11230>.

Rosco en el Documento 3.15.0 para *Candida* spp. ([www.rosco.dk](http://www.rosco.dk)).

Ruiz Quiroz, J. R. (2013). Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales.

<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/2590>.

Sanabria R, Samudio M, Fariña N., Laspina F., Figueredo L de, Aguilar G., Espínola C. (2014). Perfil de susceptibilidad a anti fúngicos de aislados de *Candida* spp por el método de microdilución. Nuevos puntos de cortes para fluconazol. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, Vol. 12(1), 33-40 33.

Sánchez-Martín, M. A., Pellón-Olmedo, M., San-Miguel-Hernández, A., Pachón-Julián, J., Rodríguez-Barbero, E., Pastor-Martín, M.R., Pellicer, D., & Albert-Hernández, M. (2019). Importancia clínica de la candidiasis con especial relevancia en la candidiasis vulvovaginal recurrente. *Gaceta Médica Bilbao*; 116(2), 74-82.

Sanz, F., & Pazos, C (2002). Infección vaginal causada por *Saccharomyces cerevisiae*: aspectos clínicos. *Toko-Gin Pract.* 61(5):291-293.

Schmalko, M. E. & Alzamora, S. M. (2001) 'Color, Chlorophyll, Caffeine, and Water Content Variation During Yerba Maté Processing', *Drying Technology*, 19(3-4), 599-610. <http://dx.doi.org/10.1081/DRT-100103937>.

Schmalko, M. E. (2013). Avances en el conocimiento de las propiedades nutricionales y funcionales de la yerba. 1ra Jornada de Divulgación Científica sobre Yerba Mate y Salud. Campus Universitario Misiones. Universidad Nacional de Misiones UNaM. <https://www.inym.org.ar/wp-content/uploads/2017/06/Primera-jornada-yerba-mate-y-salud-.pdf>.

Schmidt, C. S., White, C. J., Ibrahim, A. S., Filler, S. G., Fu, Y., Yeaman, M. R., Edwards, J. E., Jr, & Hennessey, J. P., Jr (2012). NDV-3, a recombinant alum-adjuvanted vaccine for *Candida* and *Staphylococcus aureus*, is safe and immunogenic in healthy adults. *Vaccine*, 30(52), 7594-7600. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.038>.

Sena, G., Aznar, P., García-Agudo, L., & García-Martos, P. (2015). Prevalencia de *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* en muestras clínicas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(4), 290-291. doi:10.1016/j.eimc.2014.06.008.

Shan, Y., Fan, S., Liu, X., & Li, J. (2014). Prevalence of *Candida albicans*-closely related yeasts, *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal



candidiasis. *Medical Mycology*, 52(6), 636–640.  
<https://doi.org/10.1093/mmy/myu003>.

Sharma, C., Wankhede, S., Muralidhar, S., Prakash, A., Singh, P. K., Kathuria, S., Kumar, D. A., Khan, N., Randhawa, H. S., Meis, J. F., & Chowdhary, A. (2013). *Candida nivariensis* as an etiologic agent of vulvovaginal candidiasis in a tertiary care hospital of New Delhi, India. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76(1), 46–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.023>.

Sherrard, J., Wilson, J., Donders, G., Mendling, W., & Jensen, J. S. (2018). 2018 European (IUSTI/WHO) International Union against sexually transmitted infections (IUSTI) World Health Organisation (WHO) guideline on the management of vaginal discharge. *International Journal of STD & AIDS*, 29(13), 1258–1272. <https://doi.org/10.1177/0956462418785451>.

Shi, Y., Zhu, Y., Fan, S., Vitagliano, A., Liu, X., Liao, Y., Liang, Y., & Vitale, S. G. (2020). Clinical Characteristics and Antifungal Susceptibility of *Candida nivariensis* from Vulvovaginal Candidiasis. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 85(1), 88–93. <https://doi.org/10.1159/000504095>.

Silva, R. D. A., Bueno, A. L. S., Gallon, C. W., Gomes, L. F., Kaiser, S., Pavei, C., Ortega, G. G. I., Kucharski, L. C., y Jahn, M. P. (2011). The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. *Fitoterapia*, 82(6), 818- 826

Sobel, J. D., Vazquez, J., Lynch, M., Meriwether, C., & Zervos, M. J. (1993). Vaginitis due to *Saccharomyces cerevisiae*: epidemiology, clinical aspects, and therapy. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 16(1), 93–99.  
<https://doi.org/10.1093/clinids/16.1.93>.

Sobel, J. D., & Akins, R. A. (2015). The Role of PCR in the Diagnosis of *Candida* Vulvovaginitis-a New Gold Standard?. *Current Infectious Disease Reports*, 17(6), 488. <https://doi.org/10.1007/s11908-015-0488-3>.

Sobel, J. D. (2016). Recurrent vulvovaginal candidiasis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 214 (1), 15-21. doi: 10.1016/j.ajog.2015.06.067.



- Sobel JD, Sobel R. (2018). Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. *Expert Opin Pharmacother*. 19(9), 971-977. doi: 10.1080/14656566.2018.1476490.
- STATGRAPHICS (2009). Centurion XV. Statpoint Technologies, Inc. Warrenton VA, U.S.A.
- Sui, X., Yan, L., & Jiang, Y. Y. (2017). The vaccines and antibodies associated with Als3p for treatment of *Candida albicans* infections. *Vaccine*, 35 (43), 5786-5793. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.08.082.
- Sung, W. S., & Lee, D. G. (2010). Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure and Applied Chemistry*, 82(1), 219–226. doi:10.1351/pac-con-09-01-08.
- Swoboda-Kopeć, E., Sikora, M., Golas, M., Piskorska, K., Gozdowski, D., & Netsvyetayeva, I. (2014). *Candida nivariensis* in comparison to different phenotypes of *Candida glabrata*. *Mycoses*, 57(12), 747–753. <https://doi.org/10.1111/myc.12264>
- Tam, P., Gee, K., Piechocinski, M., & Macreadie, I. (2015). *Candida glabrata*, Friend and Foe. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 1(2), 277–292. <https://doi.org/10.3390/jof1020277>.
- Tapia, C. (2012). Antifúngicos y resistencia. *Revista Chilena Infectología*; 29(3),357. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000300020>
- Taverna, C. G., Mazza, M., Bueno, N. S., Alvarez, C., Amigot, S., Andreani, M., Azula, N., Barrios, R., Fernández, N., Fox, B., Guelfand, L., Maldonado, I., Murisengo, O. A., Relloso, S., Vivot, M., & Davel, G. (2019). Development and validation of an extended database for yeast identification by MALDI-TOF MS in Argentina. *Medical Mycology*, 57(2), 215–225. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy021>.
- Thea, A. E. (2016). Actualización sobre los compuestos nutricionales y bioactivos de la Yerba Mate (*I. paraguariensis*). III Jornada de Divulgación Científica sobre Yerba Mate y Salud. Escuela de Nutrición - Facultad de Ciencias Médicas UNC – 18 de Agosto 2016 –Córdoba. <https://yerbamateargentina.org.ar/wordpress/wp-content/uploads/2016/08/tercera-jornada-yerba-mate-y-salud-cordoba.pdf>
- Theill, L., Dudiuk, C., Morano, S., Gamarra, S., Nardin, M. E., Méndez, E., & Garcia-Effron, G. (2016). Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina.



- Revista Argentina de Microbiología*, 48(1), 43–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.10.003>.
- Torres Camacho, V. & Castro Cañoviri, A. E. (2014). Fitoterapia. *Revista de Actualización Clínica*, 42, 2184 - 2189.  
[http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v42/v42\\_a01.pdf](http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v42/v42_a01.pdf).
- Torres Rodríguez J.M., Morera, Y., & López, O. (2015). *Candida glabrata*: un patógeno emergente. Grupo de Recerca en Micología Experimental i Clínica. Instituto Municipal de Investigación Médica.  
<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/cglabra.pdf>.
- Treviño-Rangel, R., González-González, J.G., Garza-González, E., & González, G. (2012). *Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante. *Medicina Universitaria*; 14 (56):157-165.
- Tscherner, M., Schwarzmüller, T., & Kuchler, K. (2011). Pathogenesis and Antifungal Drug Resistance of the Human Fungal Pathogen *Candida glabrata*. *Pharmaceuticals*, 4(1), 169–186.  
<https://doi.org/10.3390/ph4010169>.
- Yan, L., Wang, X. D., Seyedmousavi, S., Yuan, J. N., Abulize, P., Pan, W. H., Yu, N., Yang, Y. L., Hu, H. Q., Liao, W. Q., & Deng, S. W. (2019). Antifungal Susceptibility Profile of *Candida albicans* Isolated from Vulvovaginal Candidiasis in Xinjiang Province of China. *Mycopathologia*, 184(3), 413–422. <https://doi.org/10.1007/s11046-018-0305-2>.
- White, T. J.; Bruns, T. D; Lee S. B., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. [https://www.researchgate.net/publication/223397588\\_White\\_T\\_J\\_T\\_D\\_Brunns\\_S\\_B\\_Lee\\_and\\_J\\_W\\_Taylor\\_Amplification\\_and\\_direct\\_sequencing\\_of\\_fungal\\_ribosomal\\_RNA\\_Genes\\_for\\_phylogenetics](https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Brunns_S_B_Lee_and_J_W_Taylor_Amplification_and_direct_sequencing_of_fungal_ribosomal_RNA_Genes_for_phylogenetics)
- Wang, F. J., Zhang, D., Liu, Z. H., Wu, W. X., Bai, H. H., & Dong, H. Y. (2016). Species Distribution and In Vitro Antifungal Susceptibility of Vulvovaginal *Candida* Isolates in China. *Chinese Medical Journal*, 129(10), 1161–1165.  
<https://doi.org/10.4103/0366-6999.181964>.
- Wen, L., Haddad, M., Fernández, I., Espinoza, G., Ruiz, C., Neyra, E., Bustamante, B., & Rojas, R. (2011). Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana aislamiento de 3' – formil – 2',4',6' –



Trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(3), 199-204.

Zapata-González, F., & Cardona-Castro, N. (2012). Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *CES Medicina*, 26(1), 71-83. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v26n1/v26n1a07.pdf>

Zhang, J. Y., Liu, J. H., Liu, F. D., Xia, Y. H., Wang, J., Liu, X., Zhang, Z. Q., Zhu, N., Yan-Yan, Ying, Y., & Huang, X. T. (2014). Vulvovaginal candidiasis: species distribution, fluconazole resistance and drug efflux pump gene overexpression. *Mycoses*, 57(10), 584–591. <https://doi.org/10.1111/myc.12204>.

Zhou, X., Li, T., Fan, S., Zhu, Y., Liu, X., Guo, X., & Liang, Y. (2016). The efficacy and safety of clotrimazole vaginal tablet vs. oral fluconazole in treating severe vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*, 59(7), 419–428. <https://doi.org/10.1111/myc.12485>

### Paginas Web

[https://www.portalfarma.com/Profesionales/campanaspf/categorias/Paginas/introduccion\\_nalafitoterapia.aspx](https://www.portalfarma.com/Profesionales/campanaspf/categorias/Paginas/introduccion_nalafitoterapia.aspx).

<https://www.educ.ar/sitios/educar/resources/150216/usos-y-espacios-de-la-yerba-mate-en-argentina/download>.

<https://yerbamateargentina.org.ar/yerba-mate/que-es-la-yerba-mate/>.

<https://www.vix.com/es/salud/197402/los-banos-de-asiento-funcionan-para-tratar-infecciones-intimas-algunas-opciones-con-manzanilla>.

<http://www.microbiologiaysalud.org/noticias/vacuna-candidiasis/> Vacuna candidiasis.



**MEDIOS DE CULTIVO**

Medio levadura: bacto yeast morphology agar (agar morfología YM)

Fórmula (en gramos por litro)

Extracto de levaduras .....	3.0 g
Extracto de malta.....	3.0 g
Peptona.....	5.0 g
Glucosa.....	10.0 g
Agar.....	20.0 g

**Solución de Cloranfenicol**

Cloranfenicol.....250 mg/1000 mL

Agregar, si corresponde, la solución de cloranfenicol y/o agar.

**Esterilización**

Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos.

**Almacenamiento**

Máximo de seis meses en heladera entre 4 y 8°C.

**Métodos de preservación de cultivos****Método de Castellani o del agua destilada**

El método descrito por Castellani es una técnica económica y sencilla de realizar. Permite la conservación de varios hongos filamentosos y levaduras por más de 1 año.

**-Procedimiento para levaduras:** fraccionar 2-3 mL de agua destilada en viales con cierre hermético para prevenir la evaporación y/o contaminación. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos. Tomar con un ansa 2 o 3 colonias de un cultivo de 24-48 horas y suspenderlas en el vial. Las cepas se conservan a temperatura ambiente o refrigeradas.

**Pruebas para identificación de especies fúngicas****Prueba del tubo germinativo (TG), fenómeno de Reynolds- Braude**

Es el método rápido para la identificación presuntiva de *Candida albicans*/*Candida dubliniensis*.



### **Procedimiento:**

Se utiliza 0,3 a 0,5 mL de un pool de suero fresco, suero bovino o equino en tubo de hemólisis. Tocar una colonia de levadura de la placa de 24 horas y suspenderla en el suero. Incubar a 35 °C por 2 a 3 horas. Ubicar una gota de la suspensión en un portaobjeto, colocar cubreobjeto y observar en microscopio a 400x.

### **Control de calidad:**

Positivo: *C. albicans* ATCC 60193

Negativo: *C. parapsilosis* ATCC 66029

166

### **Agar cromogénico para levaduras:**

Es útil para la detección de infecciones mixtas de distintos materiales como orina, sangre, heridas, flujos vaginales, esputos, etc. Este medio permite la identificación presuntiva de algunas levaduras. El medio contiene sustratos enzimáticos unidos a compuestos cromógenos que producen un color determinado en presencia de la enzima específica. Algunas especies de levaduras desarrollan un color característico. Existen diferentes medios comerciales en nuestro mercado, los cuales desarrollan distintos colores según las especies que pueden detectar.

### **CHROMagar (CHROMagar™)**

Verde: *C. albicans*/*C. dubliniensis*

Azul: *C. tropicalis*

Rosa (aspecto seco): *C. krusei*

Se prepara según instrucciones del fabricante. Las placas sembradas se incuban a 28-35 °C durante 48-72 h.

### **Agar leche con tween 80**

Se utiliza para observar la producción de clamidosporas y tubo germinativo de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* y la micromorfología del resto de las especies de *Candida*. Esta técnica tiene la ventaja que realiza dos métodos diagnósticos en la misma prueba.

Permite ver producción o ausencia de micelio y pseudohifas y la disposición de los blastoconidios.

Tween 80.....1 mL



Agar.....2 g  
Agua destilada.....100 mL

Esterilizar en autoclave en autoclave 15 minutos a 121 °C. Fraccionar en tubos estériles. Al momento de usar, derretir el medio y dejar enfriar aproximadamente a 50 °C, luego agregar leche descremada en polvo estéril a razón de 100 µL de leche/10 mL de medio.

### Control de calidad:

Positivo: *C. albicans* ATCC 60193

Negativo: *C. tropicalis* ATCC 66029

**Procedimiento:** fraccionar en tubos. En el momento de usar, fundir el medio y preparar un portaobjetos con 3 mL del agar, como para inmunodifusión. Sembrar con una estría en la superficie y cubrir con un cubreobjetos previamente flameado a la llama. Se incuba en una placa de Petri con un dispositivo similar al empleado para microcultivos.

### Agar opacidad

Se utiliza para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*. Detecta la actividad de la enzima lipasa. La prueba es positiva (formación de halo alrededor de la colonia) para *C. albicans* y negativa para *C. dubliniensis*.

Bacto Peptone (BD Biosciences, Sparks, Md).....10 g  
NaCl.....5 g  
CaCl<sub>2</sub>.....0,1 g  
Agar.....15 g  
Agua destilada.....1000 mL

Autoclavar a 121 °C por 20 minutos. Llevar a 50 °C y añadir 5 mL de Tween 80 estéril.

El pH final del medio es de 6,8.

Fraccionar en placas de Petri de 9 cm, 25 mL en cada uno.

Inocular e incubar a 30°C; examinar diariamente durante 10 días.



## **Agar tabaco modificado**

Permite la detección de la enzima fonoloxidasa producida por *C. dubliniensis*. Esta reacción tiene como producto final la melanina, la cual le da al hongo una coloración marrón característica.

Es utilizado como una prueba más para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

Se trituran 2 atados de cigarrillos y se vuelca el tabaco en un Erlenmeyer con 1 litro de agua destilada.

Hervir durante 30 minutos a baño María. Filtrar a través de gasa y corregir volumen a 1 litro.

Agregar 20 gramos de agar, mezclar bien. Ajustar el pH a 5,4.

Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Plaquear a razón de 20 mL por placa.

### **Procedimiento:**

Sembrar el material o un subcultivo fresco de agar Sabouraud de la colonia en estudio, incubar a 28 °C durante 96 h.

### **Interpretación:**

*Candida albicans*: colonia color blanco o crema, lisa, borde liso.

Observación microscópica del borde a las 48 horas: clamidosporas negativas.

*Candida dubliniensis*: colonia color pardo amarillenta, rugosa, borde festoneado.

Observación microscópica del borde a las 48 horas: clamidosporas positivas.

*C. neoformans/C. gattii*: colonia color marrón.

El enriquecimiento del medio con el agregado de glucosa no ha arrojado resultados significativos.

## **Agar tomate zanahoria**

Es utilizado como una prueba más para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

Se preparó un extracto de 20 g de zanahoria rallada y 20 g de tomate picado y sin semillas, se hirvieron durante 1 hora en 1 litro de agua, se filtró por gasa y se llevó nuevamente a volumen de 1 litro, se agregaron 20 g de agar, se disolvió y se autoclavó durante 15 minutos a 1 atm de presión.

### **Procedimiento:**

Se vertió el medio sobre portaobjetos (3 mL) y se sembró por incisión, se colocó un cubreobjetos estéril y se incubó en cámara húmeda a 30 °C durante 48 h. Se observó microscópicamente la presencia de clamidoconidios a 200x y 400x.



### Interpretación:

*C. albicans*: No produce clamidoconidios

*C. dubliniensis*: Produce abundantes clamidoconidios.

### Caldo Sabouraud dextrosa

Composición (en gramos por litro)

Triptona.....5.0

Glucosa.....20.0

Peptona de carne.....5.0

pH final: 5.6 ± 0.2

169

Suspender 30 g de polvo en 1 litro de agua purificada. Agitar lentamente hasta completar disolución. Repartir en tubos estériles o en frascos.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

### Caldo Sabouraud hipertónico

El ensayo de tolerancia al caldo de cloruro de sodio al 6,5 % (NaCl Test) es una prueba tradicional útil en microbiología para la identificación de diferentes microorganismos. Es un marcador fenotípico de *C. dubliniensis* basado en su incapacidad a crecer en caldo de Sabouraud dextrosa con NaCl al 6,5 %. Se trata de un ensayo barato, fácil de realizar y genera imágenes reproducibles con resultados consistentes. El ensayo también permite probar no sólo aislados clínicos recientes, sino también cultivos de reserva. La prueba no genera resultados falsos positivos o negativos.

Para esta prueba se prepararon tubos estériles a los cuales se le añadió 1 mL de caldo Sabouraud suplementado con ClNa al 6,5 %. Posteriormente se obtuvo un inóculo de 10<sup>4</sup> UFC/mL en agua destilada estéril de cada una de las cepas en estudio y se inocularon 20 µL en los tubos que contenían el caldo Sabouraud hipertónico. Los tubos se incubaron a 35 °C durante 96 h y se observó el crecimiento mediante la presencia de turbidez en cada tubo.

Esta prueba tiene la capacidad de diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis* ya que la presencia de turbidez indica crecimiento y esto sólo lo realiza *C. albicans*.

Un resultado positivo de la prueba fue definida como la ausencia de crecimiento visual de las colonias.



### Interpretación:

*C. albicans*: crecimiento significativo (presencia de turbidez).

*C. dubliniensis*: escaso o nulo crecimiento.

### Agar Pal

Es utilizado como una prueba más para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

Se preparó un extracto de 70 g de semillas de girasol en 350 mL de agua destilada.

Se hirvieron durante 1 hora, se filtró por gasa y se llevó nuevamente a volumen de 350 mL.

Se disolvió y se autoclavó durante 15 minutos a 1 atm de presión.

Para 350 mL de extracto:

Glucosa.....	1 g
Creatinina.....	0,78 g
Agar.....	18 g
Cloranfenicol.....	0,05 g

Se mezclaron en partes iguales con CHROMagar *Candida*. Plaques a razón de 20 mL por placa.

### Procedimiento:

Sembrar el material o un subcultivo fresco de agar Sabouraud de la colonia en estudio, incubar durante 48 h. Se observa desarrollo a las 24 h.

### Interpretación:

*C. albicans*: colonia gris y cremosa. Ausencia de clamidoconidios. (Gris beige)

*C. dubliniensis*: colonia gris, rugosa, y con franja de hifas. (Gris verdoso)

### Crecimiento a 45 °C (Termotolerancia)

Se evalúa el crecimiento de las cepas en medio Agar Sabouraud Glucosa sin antibióticos sembrando en este medio 20 µL de un inóculo 10<sup>4</sup> UFC/mL preparado en agua destilada estéril e incubando los tubos a 45 °C. A las 48 h se evaluó el desarrollo de las colonias a esta temperatura.

*C. albicans*: crecimiento a 45 °C, es termotolerante.

*C. dubliniensis*: no presenta crecimiento a 45 °C.



## PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE YERBA MATE (proceso propio)

Se pesan 20 gramos del extracto liofilizado y se disuelven en 5 mL de agua (4000 mg/mL).

Se filtra el sobrenadante con unidades filtrantes de 0.45  $\mu\text{m}$  (clarificante) y luego 0.22  $\mu\text{m}$  (esterilizante).

Tomar 2 mL (8000 mg/ml) efectuar diluciones seriadas al medio, luego pasar 1 mL de cada dilución a 8 mL de RPMI.

2/10 en RPMI (800 mg).

1/2 en la placa que es la dilución final con el RPMI más el inóculo, dilución final 400 mg/mL.

171

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78

### Secuencias consenso para las cepas codificadas como 26 y 11B.

#### Cepa 26

```
TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAG
GTCGAATTTGGAAGAATGTTTGGAGTTTGTACCAATGAGTGGAAAAAAAAAAC
CTATCCATTAGTTTATACTCCGCCTTTCTTTCAAGCAAACCCAGCGTATCGCTC
AACACCAAACCCGAAGGTTTGGAGGGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCC
TTTGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACGAAT
ATCTGCAATTCATATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGA
ACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGACTATTAGTTAATCAAGTTGACAATT
AAATAAAAATTTGGTTGAGTTTAATCTCTGGCAGGCCGtGGGCCACCAAAGC
AAAGTTTTCAAAAAAAAAgAAAAACACATGTGTAgAAAGAAAAGGATTGCAGTTA
AGCAACCTTCTCCTATTTCTGTAATGATCCTTCCGCAGG
```

#### Cepa 11B

```
ATTTGAGGTCAACTTAAAGGTTCTGTTTGCCAGCATGACTTCACAGCAGAGC
CCTTCCACCAGAATTTAAAATGCCCTGCAACAGAGACCGTCGAAGTTGGTAAA
```



ACCTAATACGACTTTCTCATTGCAAACTTCCAATGAAAAAAAAACAGCCCACCA  
TGCACGTCCGCATAAAATGGCCAACAATTTCAAGCTAACTCCAGCAGAGTATC  
ACTCACCAACGAGACGTTTGAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATG  
CCCCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCAC  
GGAATTCTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATG  
CGAGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGAAGTTATTTCTCAACAGAGA  
ATTTGGTTTTGACAAAGTAGAATATAAAATAATTGTTTGTGTTTGCTTCTCCCG  
GGACGCCAAAAAGAGCTGTCCCAAAGAAAATAAGAACAATAAAGTAAGATTA  
CTCCACTGTGTGTAAGTTGAAAGATACAACTCCTCCCTTTGAATTAGCTAG  
CTTCAGAAAAAGCACCGCCTCCGCCGCGCACTTAAGCGCAGGCAGCTGCAG  
CACCCCCGAACTAACCAGGATGAGCTCGCTCC