



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

ESTUDIO DE LOS GENES ALS1, ALS3 Y HPW1 ASOCIADOS A LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y RESISTENCIA A LOS AZOLES EN *Candida albicans* AISLADO DE PACIENTES CON CANDIDIASIS VAGINAL RECURRENTE DE UN CENTRO DE SALUD PRIVADO DE LIMA DURANTE 2019-2024

STUDY OF THE ALS1, ALS3 AND HPW1 GENES ASSOCIATED WITH BIOFILM FORMATION AND RESISTANCE TO AZOLES IN *Candida albicans* ISOLATED FROM PATIENTS WITH RECURRENT VAGINAL CANDIDIASIS FROM A PRIVATE HEALTH CENTER IN LIMA DURING 2019-2024

TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

AUTOR

ZAIDA PATRICIA SAHUANAY BLACIDO

ASESOR

LIDIO EDGAR NEYRA VALDEZ

LIMA – PERÚ

2024

ASESOR DE TRABAJO ACADÉMICO

ASESOR

MSc. Lidio Edgar Neyra Valdez

Departamento Académico de Tecnología Médica

ORCID: 0000-0003-2086-7245

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen María por ser mi roca y fortaleza,
a mis padres que son mi motivo de superación
y a M. Petit por ser mi mejor compañera.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por brindarme la oportunidad de formarme como especialista en Microbiología e incentivar me en la investigación científica, al MSc.

Edgar Neyra por su orientación y paciencia para elaborar este proyecto y a la MS(c)

Giovanna Ugarte por sus recomendaciones y consejos en mis trabajos de científicos.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

El presente trabajo será autofinanciado.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaramos no tener conflicto de interés.

RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD

turnitin 1 de 6: Zaida Patricia Sahuanay Blacido ESTUDIO DE LOS GENES ALS1, ALS3 Y HPW1 ASOCIADOS A LA FORMA...  

Similitud 11% Marcas de alerta



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

ESTUDIO DE LOS GENES ALS1, ALS3 Y HPW1 ASOCIADOS A LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y RESISTENCIA A LOS AZOLES EN *Candida albicans* AISLADO DE PACIENTES CON CANDIDIASIS VAGINAL RECURRENTE DE UN CENTRO DE SALUD PRIVADO DE LIMA DURANTE 2019-2024

STUDY OF THE ALS1, ALS3 AND HPW1 GENES ASSOCIATED WITH BIOFILM FORMATION AND RESISTANCE TO AZOLES IN *Candida albicans* ISOLATED FROM PATIENTS WITH RECURRENENT VAGINAL CANDIDIASIS FROM A PRIVATE HEALTH CENTER IN LIMA DURING 2019-2024

TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

AUTOR
ZAIDA PATRICIA SAHUANAY BLACIDO

ASESOR
LIDIO EDGAR NEYRA VALDEZ

LIMA - PERÚ
2024



Informe estándar 

Informe en inglés no disponible [Más información](#)

11% Similitud estándar

Filtros

Fuentes

Mostrar las fuentes solapadas 

- 1 Internet  
repositorio.upch.edu.pe 3%
 3 bloques de texto  103 palabra que coinciden
- 2 Internet  
es.slideshare.net <1%

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo general	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
III. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1 Diseño de estudio	7
3.2 Población y lugar de estudio	7
3.2.1 Criterios de inclusión.....	7
3.2.2 Criterios de exclusión.....	8
3.3 Muestra.....	8
3.4 Operacionalización de variables.....	9
3.5 Procedimientos y técnicas	11
3.6 Aspectos éticos	14
3.7 Análisis de datos.....	14
IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
V. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	19
VI. PRESUPUESTO	20

RESUMEN

Introducción: La candidiasis vaginal es una enfermedad fúngica que se presenta principalmente en la edad fértil y afecta la calidad de vida de las mujeres que la padecen. Se afirma que el 75% de las mujeres tendrá un episodio de candidiasis en su vida y que el 8% desarrollará candidiasis vaginal recurrente. La resistencia actual a los antifúngicos de primera línea, como los azoles, se debe a mutaciones en el sitio diana de la droga, así como también a la expresión de genes de virulencia que promueven la formación de biopelículas sobre la mucosa vaginal, generando falla terapéutica y la recurrencia de la infección. Los genes reguladores de la adhesión ALS1, ALS3 y HPW1 juegan un rol importante en las primeras etapas de la formación de biopelículas, y han sido descritos como los principales genes presentes en los aislamientos de *Candida albicans* capaz de generar estas biopelículas. Dichos aislamientos deben ser abordados con una terapéutica diferente. **Objetivo:** Determinar la frecuencia de los genes ALS1, ALS3 y HPW1 asociados a la formación de biopelículas y la resistencia a los azoles en aislamientos de *Candida albicans* de pacientes con candidiasis vaginal recurrente. **Método:** Se desarrollará un estudio transversal y descriptivo, con aislamientos de *Candida albicans* proveniente de cultivo de secreción vaginal de pacientes con candidiasis vaginal recurrente, atendidos en un Centro de Salud privado de Lima, la caracterización del perfil de susceptibilidad se realizará siguiendo los lineamientos del CLSI M44 para fluconazol y voriconazol y la identificación de los genes ALS1, ALS3 y HWP1 se determinará mediante PCR convencional.

Palabras clave: Fluconazol, voriconazol, antifúngicos, secreción vaginal.

ABSTRACT

Introduction: Vaginal candidiasis is a fungal disease that occurs mainly in childbearing age and affects the quality of life of women who suffer from it. It is stated that 75% of women will have an episode of candidiasis in their lifetime and that 8% will develop recurrent vaginal candidiasis. Current resistance to first-line antifungals, such as azoles, is due to mutations in the target site of the drug, as well as the expression of virulence genes that promote the formation of biofilms on the vaginal mucosa, generating therapeutic failure. and recurrence of infection. The adhesion regulatory genes ALS1, ALS3 and HPW1 play an important role in the early stages of biofilm formation and have been described as the main genes present in *Candida albicans* isolates capable of generating these biofilms. These isolations must be addressed with a different therapy. **Objective:** Determine the presence of the ALS1, ALS3 and HPW1 genes associated with biofilm formation and resistance to azole antifungals in *Candida albicans* isolates from patients with recurrent vaginal candidiasis. **Method:** A cross-sectional and descriptive study will be developed, with *Candida albicans* isolates from culture of vaginal secretion of patients with recurrent vaginal candidiasis, treated in a private Health Center in Lima, the characterization of the susceptibility profile will be carried out following the guidelines of the CLSI M44 for fluconazole and voriconazole and the identification of ALS1, ALS3 and HWP1 genes will be determined by conventional PCR.

Keywords: Fluconazol, voriconazol, antifungal, vaginal discharge.

I. INTRODUCCIÓN

La candidiasis vaginal es una infección fúngica del tracto genital femenino generada como resultado del crecimiento o invasión de la mucosa vaginal por levaduras del género *Candida* (1-3). El principal agente etiológico es *Candida albicans* en el 90% de los casos, seguido por otras especies no albicans como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* (4).

La candidiasis vaginal es un problema de salud principalmente en mujeres en edad reproductiva (4-6). Se estima que el 75% de las mujeres han padecido un episodio de candidiasis vaginal en su vida y aproximadamente el 8% presentará infecciones recurrentes. Una infección recurrente está definida como la ocurrencia de tres o más episodios sintomáticos de candidiasis dentro de un periodo de 12 meses (2,6).

El microbioma vaginal es un ecosistema en equilibrio, donde *Candida albicans* se encuentra en un estado comensal (1,2), sin embargo, bajo ciertos factores externos como internos, puede verse alterado el equilibrio, permitiendo la proliferación de la levadura que genera un cuadro sintomático causado por una inflamación grave de la mucosa vaginal (1,4-6). Factores como diabetes mellitus, embarazo, consumo de anticonceptivos estrogénicos, inmunosupresión, y el uso de antibióticos por periodos largos están relacionados con el desequilibrio del ecosistema vaginal y la infección por *Candida albicans* (1, 5-7).

El diagnóstico de la candidiasis vaginal se basa en los signos y síntomas sumados al aislamiento de *Candida albicans* en cultivo microbiológico de la secreción vaginal. Se

identifica al agente patógeno y su patrón de susceptibilidad (7). El tratamiento principalmente es con azoles, por vía tópica o de manera oral en dosis única (5), aunque inicialmente la infección puede responder a los tratamientos de primera línea, un porcentaje de mujeres vuelve a presentar el episodio sintomático al suspender o tiempo después de culminar el tratamiento (5,6).

La resistencia a los antimicóticos en las candidiasis vaginales recurrentes está relacionada con el uso empírico o excesivo del agente antimicótico (5-8), la resistencia a los azoles se ha descrito por las mutaciones moleculares de la enzima diana esterol desmetilasa y la sobre expresión de transportadores que disminuyen la concentración intracelular del fármaco (9), además de los factores de virulencia que presenta *Candida albicans* como su capacidad de producir hifas, generar enzimas hidrolíticas y la adhesión a las células formando biopelícula, que conlleva a la recurrencia y falla terapéutica (6-8).

Las biopelículas se definen como una comunidad microbiana altamente especializada, compuesta por una red de levaduras e hifas adherida a un soporte biótico o abiótico y rodeada por una matriz de sustancia polimérica extracelular (10,11). La formación de biopelículas consta de cuatro etapas que se inicia con la fase de adherencia sobre una superficie formando una capa basal que fija la estructura, continúa con la fase de proliferación que se caracteriza por la filamentación con producción de hifas y pseudohifas formando una red protectora y sólida, prosiguiendo con la etapa de maduración donde el andamiaje hifal queda envuelto en una matriz de sustancias exopoliméricas que mantiene unida toda la estructura de la biopelícula y finalmente la

fase de diseminación, donde se liberan células levaduriformes que sirven para sembrar nuevos sitios de infección (10-12).

La fase inicial de adherencia de las biopelículas, está regulada por un conjunto de genes que se expresan en adhesinas de la pared levaduriforme y que cumple un rol de anclaje a una superficie, entre las más importantes se tiene la familia de secuencia similar a la aglutinina (ALS) que consta de 8 miembros ALS 1- ALS7 y ALS9 con estructura similar (10, 13-15) y la familia de proteínas 1 de la pared de las hifas (HPW1), gen que codifica una manoproteína específica para la forma filamentosa de *Candida albicans* relacionada con la adhesión y regulación (14-16). Las mutaciones de estos genes provocan la formación de biopelículas muy débiles o la incapacidad de generarlos, es así, que las mutaciones en ALS1 y ALS3, generan biopelículas muy desorganizadas y con una biomasa reducida (10,17), lo mismo que las mutaciones a nivel del HPW1 que inhabilita a la levadura de generar hifas y formar biopelículas (10). La presencia de estos genes es muy importante para el desarrollo de las biopelículas y el daño tisular, los estudios demuestran que existe una prevalencia estadísticamente significativa en los aislamientos de *Candida albicans* que expresan estos genes y que forman biopelículas con respecto a los no formadores de biopelículas (18, 19) y que conlleva a su vez a la resistencia a los antifungico, como los azoles, ya que puede soportar alta concentración de la droga sin alterar su matriz (19,20) además que se ha descrito la asociación de las biopelículas a bacterias oportunistas permitiéndoles la protección colectiva y la infección de tejidos más profundos y severos (20, 21).

Si bien la formación de biopelículas puede realizarse sobre superficies inertes como los dispositivos intrauterinos (DIU), también se puede formar sobre superficies bióticas como el epitelio vaginal (6). Un estudio realizado por Wu en el 2020, demostró la formación de biopelículas en el epitelio vaginal en un modelo desarrollado en ratones, estableció la asociación de la biopelículas e infiltraciones fúngicas realiza cambios histopatológicos en el epitelio vaginal generando una inflamación local y que conduce a una alta resistencia a los anti fúngicos y su erradicación (6).

En el estudio de Shrief del 2019 en Egipto, investigó la prevalencia de la resistencia a los antifúngicos y los genes ALS 1 y HWP1 en aislamiento de *Candida albicans*, encontrando una prevalencia estadísticamente significativa entre los aislamientos con los genes de virulencia con capacidad de formar biopelículas y la resistencia a Fluconazol, Itaconazol y Caspofunginas en muestras de sangre y orina (19).

Roudbarmohammadi en el 2015 en Irán, estudió un grupo de genes involucrados en la patogenia y adhesión de la *Candida albicans* al epitelio vaginal, encontró que el 75.8% de los aislamientos presentaron el gen ALS1, y el 77% expresaron el gen ALS3, demostrando de los aislamiento de *Candida albicans* que presentaban alguno de los dos genes poseían mayor capacidad de adherencia que los aislamientos que carecían de la expresión génica, además que la presencia de ambos genes en simultaneo incrementaba el índice de adherencia y capacidad de generar biopelículas (15).

Mohammadi en el 2021 en Irán, estudió la formación de biopelículas, así como los genes marcadores de virulencia, se encontró la frecuencia de los genes ALS1, ALS3 y HPW1 en 67.1%, 80% y 81.4%, en las especies formadoras de biopelículas (7).

El incremento de la resistencia a los azoles en *Candida albicans* es una realidad a nivel mundial y el Perú no es ajeno, el estudio de Herrera en el 2022 en Ayacucho, encontró que el 10.8% de aislamientos de *Candida albicans* de cultivo de secreción vaginal presentaban resistencia tanto a Fluconazol y Voriconazol (22). Si bien el estudio reporta la resistencia a los azoles, no precisan si se debe a una mutación enzimática o a la presencia de genes de virulencia formadores de biopelículas.

La candidiasis vaginal recurrente es una infección ginecológica que merma el desenvolvimiento pleno de las mujeres que la padecen, los síntomas de picazón, ardor, flujos vaginales y malestar influyen en la vida diaria de una mujer, incluso puede traer complicaciones obstétricas como infecciones intraamnióticas y partos prematuros (3). La población femenina principalmente afectada, se encuentra entre los 20 a 50 años, donde el índice de recurrencia reportada está entre 5 a 8%, el cual puede estar subestimada ya que hay pocos estudios de seguimiento de las recaídas durante al menos un año y probablemente la incidencia y la población en riesgo sea mayor (2). Los antimicóticos Fluconazol y Voriconazol son el tratamiento de primera elección, sin embargo, se ha reportado resistencia a estos fármacos la cual se viene incrementando de una manera acelerada (22), esta problemática tiene repercusión en la morbilidad y calidad de la vida de las mujeres que la padecen, además de impacto económico sobre las personas y el sistema de salud, que se ven obligadas a optar por tratamientos combinados más costosos y por periodos largos (2). Si bien la resistencia puede deberse a mutaciones en el sitio diana, también puede deberse a la capacidad de las levaduras de expresar genes de virulencia y proliferar a manera de biopelículas, lo cual

dificultaría su tratamiento y erradicación, por lo que es importante determinar si las cepas de *Candida albicans* aislado de candidiasis vaginal recurrente presenta los genes ALS1, ALS3 y HPW1, los cuales están asociados a la formación de biopelículas, para que el tratamiento de estas pacientes deba ser abordado de una manera diferente.

A lo que generamos la siguiente pregunta;

¿Cuál es la frecuencia de los genes ALS1, ALS3 y HPW1 asociados a la formación de biopelículas y la resistencia a los azoles en aislamientos de Candida albicans de pacientes con candidiasis vaginal recurrente de un Centro de Salud privado en Lima durante el 2019 al 2024?

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia de los genes *ALS1*, *ALS3* y *HPW1* asociados a la formación de biopelículas y la resistencia a antifúngicos azólicos en aislamientos de *Candida albicans* de pacientes con candidiasis vaginal recurrente de un Centro de Salud privado en Lima durante el 2019 al 2024.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar los genes productores de biopelículas *ALS1*, *ALS3* y *HPW1* presentes en los aislamientos de *Candida albicans* de pacientes con candidiasis vaginal recurrente de un Centro de Salud privado en Lima durante el 2019 al 2024.

- Determinar el perfil de la susceptibilidad a fluconazol y voriconazol de los aislamientos de *Candida albicans* en pacientes con candidiasis vaginal recurrente.
- Determinar la asociación entre la presencia de los genes productores de biopelículas y la resistencia a Fluconazol y Voriconazol.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño de estudio

Estudio descriptivo de corte transversal, retrospectivo.

3.2 Población y lugar de estudio

La población estará constituida por los aislamientos de *Candida spp.* proveniente de muestras clínicas de pacientes ambulatorios atendidos en un Centro de Salud privado de Lima, el cual cuenta con un laboratorio de microbiología, durante el 2019 al 2024.

3.2.1 Criterios de inclusión

- Aislamientos que hayan sido identificados como *Candida albicans* mediante pruebas manuales o automatizadas.
- Aislamientos de *Candida albicans* provenientes de cultivos de secreción vaginal.
- Aislamientos de *Candida albicans* que correspondan al tercer episodio o más de candidiasis vaginal dentro de un año en una misma paciente.

3.2.2 Criterios de exclusión

- Aislamientos que no son viables en el cultivo.
- Aislamientos que en la activación del cultivo se evidencien contaminación con otros microorganismos.
- Viales mal identificados o con datos incompletos que no permitan identificar su origen.

3.3 Muestra

Serán parte del estudio todos los aislamientos de *Candida albicans* provenientes de cultivo de secreción vaginal que representen el tercer aislamiento o más dentro de un año en la misma paciente; todas estas reportadas y conservadas por el laboratorio de microbiología de un Centro de Salud privado de Lima durante el periodo 2019 al 2024.

Este proyecto no propone realizar un cálculo de muestra ya que tiene como finalidad caracterizar molecularmente la presencia de los genes y determinar el perfil de susceptibilidad a los azoles en todos los aislamientos de *Candida albicans* que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión y que se encuentre disponibles en el periodo del estudio.

3.4 Operacionalización de variables

Variable: “Candidiasis vaginal recurrente”

- a) **Definición operacional:** Aislamiento de *Candida albicans* proveniente de cultivos de secreción vaginal.
- b) **Definición conceptual:** Infección vaginal causado por *Candida albicans* en más de tres episodios dentro de 1 año.
- c) **Criterio de medición:** Identificación manual o automatizada.
- d) **Tipo de variable:** categórica dicotómica.

Variable: “Formación de biopelículas”

- a) **Definición operacional:** Capacidad de un microorganismo de generar mecanismo de resistencia a la erradicación y tratamiento.
- b) **Definición Conceptual:** Comunidad de microorganismos que crecen en una matriz de exopolisacaridos adheridos a una superficie inerte o tejido vivo.
- c) **Criterio de medición:** De acuerdo con la presencia o ausencia de los genes.
- d) **Tipo de variable:** Categórica dicotómica (Presencia o ausencia).

Variable: “Genes ALS1 y ALS3”

- a) **Definición operacional:** Genes asociados a la formación de biopelículas en *Candida albicans*.
- b) **Definición conceptual:** Genes productores de glicoproteínas de la pared celular que está relacionada con la adherencia a la superficie inerte o tejido vivo.
- c) **Criterio de medición:** Será detectado mediante PCR multiplex.

d) **Tipo de variable:** categórica dicotómica (Presencia o ausencia).

Variable: “Genes HPW1”

a) **Definición operacional:** Genes asociados a la formación de biopelículas en *Candida albicans*.

b) **Definición conceptual:** Gen que expresa glicosilfosfatidilinositol en las primeras etapas de la formación de las biopelículas.

c) **Criterio de medición:** Será detectado mediante PCR multiplex.

d) **Tipo de variable:** categórica dicotómica (Presencia o ausencia).

Variable: “Perfil de susceptibilidad a Fluconazol y Voriconazol”

a) **Definición operacional:** Interpretación de la prueba de susceptibilidad antifúngica de Fluconazol y Voriconazol frente a *Candida albicans* ensayados mediante disco difusión y comparado con los puntos de corte establecido en el manual M44 del CLSI (23).

b) **Definición conceptual:** Categorización de la susceptibilidad a los antifúngicos azólicos determinado mediante métodos estandarizados que reflejan la capacidad de inhibir el crecimiento del microorganismo.

c) **Criterio de medición:** Se determinará midiendo el diámetro del halo de inhibición y se interpretará en sensible, intermedio, susceptible dosis dependiente o resistente de acuerdo con el manual M44 del CLSI.

d) **Tipo de variable:** Categórica politómica (Sensible, intermedio, susceptible dosis dependiente o resistente).

3.5 Procedimientos y técnicas

Los aislamientos de *Candida albicans* serán identificados y confirmados en el laboratorio de microbiología de un Centro de Salud privado de Lima. Los aislamientos serán recolectados y posteriormente enviados al Laboratorio de Micología Clínica del Instituto de Medicina Tropical “Alexandeer von Humboldt” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.5.1 Recolección de datos:

Los datos serán recolectados directamente en una hoja Excel, codificando de manera correlativa cada cepa a estudiar e ingresando los resultados del perfil de susceptibilidad a los antifúngicos testeados, así como el resultado del PCR respectivamente.

3.5.2 Transporte de los aislamientos:

Las cepas serán almacenadas a - 20° C en agua con glicerol al 10% para su posterior reactivación y caracterización genética.

3.5.3 Activación de los aislamientos:

Una vez codificado con el número interno, las cepas se activarán en tubos de Sabouraud dextrosa (Marca Merck®), y se incubarán a 37°C por 24 horas.

3.5.4 Antibiograma por disco difusión:

Siguiendo los lineamientos para el estudio de susceptibilidad de levaduras del CLSI M44 (23) tercera edición, se evaluará los discos de Fluconazol (25ug) y Voriconazol (1ug) (ambos de la marca OXOID) y se interpretará como “Resistente” (R), “Intermedio” (I), “Susceptible dosis dependiente” (SDD) o “Sensible” (S).

3.5.5 Detección de los genes:

La detección de los genes ALS1, ALS3 y HPW1, se realizará mediante PCR convencional, siguiendo el protocolo de trabajo descrito por Mohammadi et. al (7), haciendo uso de las secuencias de cebadores CR-f y CR-r, para la identificación de *Candida albicans*. La lista de cebadores se aprecia en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de cebadores para la identificación de *Candida albicans* y presencia de genes de biopelículas. Tomado de: Mohammadi, Faezeh y colaboradores, 2021.

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Especie identificada y tamaño del producto
CR-f	GCTACCACTTCAGAATCATCATC	C.albicans:
CR-r	GCACCTTCAGTCGTAGAGACG	1000
ALS1	F: ACCAGAAGAAAACAGCAGGTG R: GACTAGGTGAACCAACAAAATACCAG	319
ALS3	F: CCAATGTTCCAACAAACTGAA R: GAACCGGTTGTTGGCTAGGT	185
HPW1	F: ATGACTCCAGCTGGTTC R: TAGATCAAGAATGCAGC	503

Los productos de PCR serán visualizados mediante una electroforesis en agarosa al 1.5%. Se utilizará una fuente de poder al 100 V/cm en buffer TAE 1X, usando como marcador de peso molecular 100bp (Gene ruler, Thermo scientific) y Gel Red para visualizar las bandas bajo un trans iluminador FotoDyne Foto/Analyst.

3.6 Aspectos éticos

Las cepas recolectadas del laboratorio de microbiología, previa autorización de la jefatura del Centro de Salud privado, se codificarán con un número correlativo manteniendo en anonimato y no pudiéndose identificar el nombre ni apellido de las pacientes.

Este protocolo se registrará en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) - Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT), y será evaluado por el Comité de Ética de la UPCH (CIE-UPCH) previamente a su ejecución. Durante la implementación del estudio se respetarán los principios éticos delineados en la Declaración de Helsinki, y se seguirán estrictamente las recomendaciones realizadas por el CIE-UPCH.

3.7 Análisis de datos

Se realizará el análisis de la presencia de los genes ALS1, ALS3 y HPW1, así como las categorías del perfil de susceptibilidad (Sensible, intermedio, susceptible dosis dependiente o resistente) de todos los aislamientos estudiados. Se elaborará las tablas y gráficos que permitan evidenciar los resultados obtenidos en función a los objetivos planteados. La medida de asociación se estimará mediante la prueba estadística de Chi-cuadrado, considerando un $p < 0.05$ como significativo, todo el análisis estadístico será ejecutado en Stata v17.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. David H, Adline Princy Solomon. Molecular association of *Candida albicans* and vulvovaginal candidiasis: focusing on a solution. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023 Oct 13;13.
2. San J, Poliquin V, Aleeza Cara Gerstein. Insights and advances in recurrent vulvovaginal candidiasis. *PLOS pathogens*. 2023 Nov 10;19(11):e1011684–4.
3. Wang Y, Liu Z, Chen T. Vaginal microbiota: Potential targets for vulvovaginal candidiasis infection. *Heliyon* [Internet]. 2024 Mar 2 [cited 2024 Jun 25];10(5): e27239. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10923723/>
4. Jiménez JC, Garro ARG, Trabado SJT. Generalidades de la candidiasis vulvovaginal. *Revista Médica Sinergia* [Internet]. 2023 Mar 1;8(3):e924–4. Available from: <https://revistamedicasinergia.com/index.php/rms/article/view/924>
5. Pan Y, Sun Y, Chen L, Cheng Y, Jin P, Zhang W, et al. *Candida* causes recurrent vulvovaginal candidiasis by forming morphologically disparate biofilms on the human vaginal epithelium. *Biofilm* [Internet]. 2023 Dec 15 [cited 2024 May 18], 6:100162. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S259020752300059X#:~:text=Candida%20species%20grew%20on%20the>
6. Wu X, Zhang S, Li H, Shen L, Dong C, Sun Y, et al. Biofilm Formation of *Candida albicans* Facilitates Fungal Infiltration and Persister Cell Formation in Vaginal Candidiasis. *Frontiers in Microbiology*. 2020 Jun 5;11.

7. Mohammadi F, Hemmat N, Bajalan Z, Javadi A. Analysis of Biofilm-Related Genes and Antifungal Susceptibility Pattern of Vaginal *Candida albicans* and Non-*Candida albicans* Species. Cantore S, editor. *BioMed Research International*. 2021 May 28; 2021:1–9.
8. McKloud E, Delaney C, Sherry L, Kean R, Williams S, Metcalfe R, et al. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: a Dynamic Interkingdom Biofilm Disease of *Candida* and *Lactobacillus*. *MSystems*. 2021 Aug 31;6(4).
9. Nishimoto AT, Sharma C, Rogers PD. Molecular and genetic basis of azole antifungal resistance in the opportunistic pathogenic fungus *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2019 Oct 11;75(2). Available from: <https://academic.oup.com/jac/advancearticleabstract/doi/10.1093/jac/dkz400/55856>.
10. Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Critical Reviews in Microbiology*. 2021 Jan 2;47(1):91–111.
11. Wall G, Montelongo-Jauregui D, Vidal Bonifacio B, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 2019 Dec; 52:1–6.
12. Chong P, Chin V, Wong W, Madhavan P, Yong V, Looi C. Transcriptomic and Genomic Approaches for Unravelling *Candida albicans* Biofilm Formation and Drug Resistance—An Update. *Genes*. 2018 Nov 7;9(11):540.
13. Alikhani T, Ghazvini RD, Mirzaii M, Hashemi SJ, Fazli M, Rafat Z, et al. Drug Resistance and Biofilm Formation in *Candida* Species of Vaginal Origin. *Iranian*

Journal of Public Health [Internet]. 2022 Apr 19 [cited 2023 Mar 11]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9288395/>

14. Goulart LS, Sousa J, Rosa, Vieira CA, Crestani J, Claudinéia Araújo. Analysis of the ALS1 and HWP1 genes from clinical isolates of *Candida albicans* / Análise de genes ALS1 e HWP1 em isolados clínicos de *Candida albicans*. Brazilian Journal of Health Review [Internet]. 2018 [cited 2024 Nov 11];1(1):112–9. Available from: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/633>

15. Roudbary M, Shahla Roudbarmohammadi, Bakhshi B, Farzad Katirae, Mohammadi R, Mehraban Falahati. ALS1 and ALS3 gene expression and biofilm formation in *Candida albicans* isolated from vulvovaginal candidiasis. Advanced biomedical research. 2016 Jan 1;5(1):105–5.

16. Karolina Klesiewicz, Mrowiec P, Kania K, Iwona Skiba-Kurek, Białeczka J, Namysł M, et al. Prevalence of Closely Related *Candida albicans* Species among Patients with Vulvovaginal Candidiasis in Southern Poland Based on the hwp1 Gene Amplification. Polish Journal of Microbiology. 2023 Mar 1;72(1):69–77.

17. La Bella AA, Andersen MJ, Gervais NC, Molina JJ, Molesan A, Stuckey PV, et al. The catheterized bladder environment promotes Efg1- and Als1-dependent *Candida albicans* infection. Science Advances [Internet]. 2023 Mar 3 [cited 2023 Nov 19];9(9): eade7689. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36867691/#:~:text=Candida%20albicans%20is%20the%20second>

- 18.** Hamady A, Marei Y. Detection of als1 and hwp1 genes involved in biofilm formation in *Candida albicans* isolated from catheter associated candiduria. *Microbes and Infectious Diseases*. 2021 Jun 13;0(0).
- 19.** Shrief R, Zaki MES, El-Sehsah EM, Ghaleb S, Mofreh M. Study of Antifungal Susceptibility, Virulence Genes and Biofilm Formation in *Candida albicans*. *The Open Microbiology Journal*. 2019 Sep 30;13(1):241–8.
- 20.** Nett JE, Andes DR. Contributions of the Biofilm Matrix to *Candida* Pathogenesis. *Journal of Fungi*. 2020 Feb 3;6(1):21.
- 21.** Ardehali SH, Azimi T, Fallah F, Aghamohammadi N, Alimehr S, Karimi AM, et al. Molecular detection of ALS1, ALS3, HWP1 and SAP4 genes in *Candida* Genus isolated from hospitalized patients in Intensive Care Unit, Tehran, Iran. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* [Internet]. 2019;65(4):15–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31078147/>
- 22.** Gomez LRH, López VLC. Perfil de resistencia antifúngica en el tratamiento de candidiasis vaginal: Un diagnóstico de agentes etiológicos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* [Internet]. 2022 Apr 27;21(2):4241. Available from: <https://revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4241>
- 23.** M27M44S Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts
This document includes updated minimal inhibitory concentration, zone diameter, and quality control tables for the Clinical and Laboratory Standards Institute antifungal susceptibility testing documents M27 and M44. A CLSI supplement for global application [Internet]. Available from: https://clsi.org/media/osthhexax/m27m44sed3e_sample.pdf.

V. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	Tiempo (Meses)	MESES								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Presentación del proyecto a la FMAH de la UPCH	1.5	X	X							
Evaluación por el Comité de Ética	1.5		X	X						
Presentación del proyecto al HNRPP	1				X					
Ejecución del estudio	3					X	X	X		
Análisis de dato	1								X	
Redacción del informe final	1									X

VI. PRESUPUESTO

Este proyecto será autofinanciado por el investigador:

Cantidad	Unidad de Medida	Descripción	Costo
AGARES			
1	Frasco	Agar Mueller Hinton OXOID	S/. 450.00
1	Frasco	Sabouraud dextrosa 2% MERCK	S/. 500.00
1	Frasco	Azul de metileno MERCK 10gr	S/. 200.00
1	Frasco	Glucosa anhidra MERCK 250gr	S/. 210.00
1	Frasco	Agarosa grado molecular	S/. 260.00
DISCO DE ANTIMICÓTICO			
5	Cartucho	Fluconazol 25ug OXOID	S/.75.00
5	Cartuchos	Voriconazol 1ug OXOID	S/. 75.00
PROCEDIMIENTO MOLECULAR			
1	200 X 50ul de Reactions	MyTaq™ Red Mix	S/. 980.00
25	50 nmol 20-30nmol	Primer CR-F´	S/. 210.00
25	50 nmol 20-30nmol	Primer CR-R´	S/. 210.00
25	50 nmol 20-30nmol	Primer ALS1 F´	S/. 320.00
25	50 nmol 20-30nmol	Primer ALS1 R´	S/. 320.00
25	50 nmol 20-30nmol	Primer ALS3 F´	S/. 380.00
25	50 nmol 20-30nmol	Primer ALS3 R´	S/. 380.00
25	50 nmol 20-30nmol	Primer HPW1 F´	S/. 330.00
25	50 nmol 20-30nmol	Primer HPW1 R´	S/. 330.00
MATERIAL DE PLÁSTICO			
2	96 und/rack	Tips estériles con filtro de 10ul	S/. 120.00
2	96 und/rack	Tips estériles con filtro de 50ul	S/.120.00
20	Paq x 10 unidades	Asas de 10ul esteriles descartables	S/. 80.00
1	Caja x 50 unidades	Hisopos estériles	S/. 15.00
1	Bolsa x 12 trips	PCR Strip 8 x 0.1 ml	S/.45.00
		TOTAL	S/. 5460.00