



Actividades proteínasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH

Adriana M. Ombrella¹, Liliana Racca² y Laura Ramos³

¹Cátedra de Microbiología, Virología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario; ²Cátedra de Estadística. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario; ³CEREMIC (Centro de Referencia en Micología) Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina

Resumen

Si bien la coexistencia de candidiasis vulvovaginal y vaginosis bacteriana es poco frecuente, en nuestro servicio asistencial encontramos una prevalencia mayor de la habitual. Por ello nos propusimos estudiar la actividad de proteinasas y fosfolipasas, factores de virulencia de *Candida albicans*, para determinar su participación en dicha asociación. De los 70 aislamientos del género *Candida* recuperados de secreciones vaginales, 65 correspondieron a *C. albicans*, de los cuales 26 se aislaron de secreciones vaginales con pH > 4,5, y 39 de muestras con pH ≤ 4,5. Para evaluar la actividad fosfolipasa se usaron los medios agar malta y agar glucosado de Sabouraud suplementados con yema de huevo. La actividad proteolítica se detectó por el método en placa utilizando un medio base con albúmina sérica bovina como única fuente de nitrógeno. La actividad fosfolipasa no mostró diferencias significativas entre las cepas procedentes de los dos grupos estudiados (p = 0,2003). La actividad proteolítica se detectó en el 61,5% de los aislamientos recuperados a pH ≤ 4,5 mientras que a pH > 4,5 dicho valor fue 96,2%, siendo significativamente mayor en el segundo grupo (p = 0,0001). De los resultados obtenidos deducimos que la coexistencia de candidiasis vulvovaginal con vaginosis bacteriana podría deberse a la actividad proteolítica de cepas de *C. albicans* y no a la actividad fosfolipasa de las mismas.

Palabras clave

Factores de virulencia, Proteinasas, Fosfolipasas, Candidiasis vulvovaginal, pH

Proteases and phospholipases activities of *Candida albicans* isolated from vaginal secretions with different pH

Summary

Even though vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis are seldom simultaneously found, we have detected this association at an above average frequency. Thus, we set out to study the activity of proteinases and phospholipases, virulence factors of *Candida albicans*, to assess their role in the above mentioned association. Of a total of 70 *Candida* isolates were retrieved from samples of vaginal secretions analyzed at our Diagnostic Service, 65 were identified as *C. albicans* (a group of n = 26 obtained from clinical samples of pH > 4.5 and a group of n = 39 from clinical samples of pH ≤ 4.5). The evaluation of phospholipases activity was performed on malt agar and Sabouraud dextrose agar with the addition of egg yolk as substrate. The proteolytic activity was detected on plates of agar base medium with the addition of bovine albumin serum as substrate as sole nitrogen source. Phospholipases activity was essentially the same in both groups of samples (p = 0.2003). Proteolytic activity was detected in 61.5% of the isolates from the group with pH < 4.5 and in 96.2% in the group with pH > 4.5; being the former much higher than the latter (p = 0.0001). Based on these results we postulate that the simultaneous occurrence of bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis could be related to the proteolytic activity but unrelated to phospholipases activity.

Key words

Virulence factors, Proteinases, Phospholipases, Vulvovaginal candidiasis, pH

Dirección para correspondencia

Dra. Adriana Ombrella
Cátedra de Microbiología, Virología y Parasitología
Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario
Santa Fe 3100. 2000 Rosario
Santa Fe, Argentina
E-mail: aombrella@hotmail.com

Aceptado para publicación el 23 de octubre de 2007

Candida albicans, una levadura comensal dimorfa del tracto gastrointestinal y genital [35], es el principal organismo causante de la vaginitis candidiásica, denominada también candidiasis vulvovaginal. Otras levaduras que la producen son *Candida glabrata* y *Candida tropicalis*, y más raramente *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr* y *Saccharomyces cerevisiae* [7,22,27].

De los factores de virulencia de las levaduras del género *Candida*, los que contribuyen en mayor medida a la instalación del cuadro de candidiasis vulvovaginal, tanto aguda como recurrente son el cambio fenotípico [10,23,36], el dimorfismo [31,34], la adherencia [8,12] y la secreción de enzimas líticas dependientes del pH. Entre las hidrolasas, las isoenzimas del grupo de las proteinasas aspárticas secretadas y un grupo heterogéneo de enzimas con actividad fosfolipasa cumplen un papel preponderante en la disrupción de las membranas de las células del epitelio, facilitando la penetración de la fase hifal a las mismas [6,9,13,18,19,21,40].

La literatura muestra opiniones contradictorias en cuanto al número y tipos de fosfolipasas secretadas por *C. albicans*, pero coinciden en que la principal actividad fosfolipasa se debe a la expresión del gen *PLB1*. Dicha expresión está regulada por factores nutricionales, medioambientales (temperatura, pH), y la fase de crecimiento de la levadura [24]. Aparentemente la expresión de genes *PLB1* estaría regulada por los mismos factores que regulan su morfología [17].

Las proteinasas aspárticas juegan un papel importante en la degradación de los componentes de la mucosa (colágeno, queratina, mucina), así como de componentes inmunes (citoquinas, anticuerpos, complemento), facilitando la invasión de los tejidos del hospedero [21].

La actividad proteolítica se atribuye a una familia de genes *SAP* de *C. albicans* de, al menos, diez miembros, ocho de los cuales codifican proteinasas que son secretadas al espacio extracelular (*Sap1-8*), mientras que *Sap9* y *Sap10* son proteínas de membrana. Estas enzimas son activas a pH ácido, siendo evidente las diferencias entre los rangos de pH de óptima actividad para cada isoenzima [25,26,39].

Según la bibliografía consultada, es poco frecuente la coexistencia de candidiasis vulvovaginal con vaginosis bacteriana [15,16].

Rodríguez y cols. [32] postularon que la rara comitancia de la vaginosis bacteriana y la candidiasis vulvovaginal se debe a que aminas bacterianas, como cadaverina y putrescina, podrían inhibir la formación de pseudohifas en *C. albicans* y la gemación en otras especies de este género, lo que explicaría la baja tasa de infección por levaduras en mujeres con vaginosis bacteriana.

En estudios de prevalencia de infecciones del tracto genital femenino, realizados en nuestro servicio asistencial [3,37], encontramos un alto porcentaje de asociación de vaginosis bacteriana con candidiasis vulvovaginal.

Considerando las diferencias entre nuestros datos y los expresados en la bibliografía, nos planteamos la posibilidad de que en los aislamientos de *C. albicans* recuperados a valores de pH mayores de 4,5 estuvieran exacerbados algunos factores de patogenicidad. Es por eso que en este trabajo nos propusimos estudiar la producción de proteinasas y fosfolipasas de *C. albicans* provenientes de candidiasis vulvovaginal con distintos valores de pH.

Materiales y métodos

Se estudiaron exudados vaginales de mujeres sintomáticas, en edad reproductiva, no gestantes, ni diabéticas, sin tratamiento antimicrobiano el mes previo a la toma de muestra, que se presentaron en el servicio asistencial de la Cátedra de Microbiología, Parasitología y Virología de la Facultad de Ciencias Médicas. Todas fueron informadas del estudio, brindando su consentimiento de forma escrita.

Las muestras se tomaron previa abstinencia sexual de 48 horas, con espéculo, y mediante hisopo, de los fondos de saco vaginales, conservándose en medio de transporte (Stuart) y en 2 ml de solución fisiológica estéril. Además, se realizaron frotis sobre los que posteriormente se efectuaron las tinciones necesarias. Para la medida del pH se usaron tiras de papel indicador con rango de 0,5 a 5,5 y de 5 a 8.

El procesamiento de las muestras e identificación fenotípica de los microorganismos se llevaron a cabo por las técnicas convencionales habituales [20].

El estudio micológico consistió en exámenes directos en fresco y con colorante azul de lactofenol y siembra en agar glucosado de Sabouraud y agar glucosado de Sabouraud con cloranfenicol, con incubación a 28 °C durante cinco días [20].

Las especies aisladas fueron identificadas mediante siembra en el medio cromogénico CHROMagar *Candida* (CHROMagar Company, Francia) para la identificación presuntiva por el color de las colonias y la detección de la presencia de mezcla de levaduras [22], producción de tubos germinativos en suero [2,22], y producción de clamidoconidias en los medios agar harina de maíz y agar semilla de girasol (este último permite diferenciar entre *C. albicans* y *Candida dubliniensis*) [4,22].

Para la identificación como especies de los aislamientos no tipificados como *C. albicans* se utilizó el sistema comercial API ID 32 C (bioMérieux, Francia).

Debido a que tanto en la vaginosis bacteriana como en la candidiasis vulvovaginal los agentes productores pertenecen a la microbiota habitual, se consideró que coexistían ambas si se cumplían al menos tres de los cuatro criterios clínicos de Amsel y cols. para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana [1], además de desarrollarse en los medios de cultivo *Gardnerella vaginalis* hasta la quinta estría de la placa de siembra, junto con la presencia en el examen en fresco de diversos grados de reacción inflamatoria y levaduras o pseudohifas, con recuperación de las mismas en el cultivo.

La actividad fosfolipasa se detectó por el método en placa, en dos medios de cultivo: agar malta suplementado con 2% de yema de huevo y agar glucosado de Sabouraud suplementado con 8% de yema de huevo [11]. Las placas se incubaron a 37 °C durante tres días [11,29].

Los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron mediante el valor Pz, que es la relación entre el diámetro de la colonia y el diámetro de la colonia más el halo de precipitación debido a la acción de la enzima sobre los fosfolípidos contenidos en el medio. Este índice varía entre 0 y 1 y nos da una idea de la actividad enzimática de cada aislamiento. Valores cercanos a 0 indican máxima actividad de fosfolipasas mientras que valores próximos a 1, baja actividad enzimática [29].

La actividad proteolítica se detectó por el método en placa, utilizando medio de cultivo conteniendo albúmina sérica bovina como única fuente de nitrógeno (0,5 g K₂HPO₄; 0,04 g MgSO₄·7H₂O; NaCl 1 g; 0,2 g extracto de levadura; 4 g glucosa; 0,5 g de albúmina sérica bovina; 4 g agar agar; agua destilada 200 ml) [38].

Para la elección del pH del medio para detectar la actividad proteolítica se tuvo en cuenta el valor preponderante en las secreciones vaginales, por lo cual para los aislamientos provenientes de muestras con $\text{pH} \leq 4,5$ se trabajó a $\text{pH} = 4$ y para aquellos encontrados a $\text{pH} > 4,5$ el mismo fue de 5,5.

Las placas se incubaron a 37°C durante cinco días, tras lo cual se revelaron coloreando con una solución de amidoblack al 0,6% en metanol-acético-agua, decolorando posteriormente con ácido acético [28,30].

Los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron con el índice Prz, donde Prz es la relación entre el diámetro de la colonia y el diámetro de la colonia más el halo de aclaramiento debido a la proteólisis, dando una idea de la actividad proteinasa. Se utilizó la misma escala que para evaluar actividad fosfolipasa [29].

Los valores de ambos índices se analizaron mediante el test de Mann-Whitney.

Resultados

A $\text{pH} \leq 4,5$ ($n = 41$) se recuperaron 39 aislamientos de *C. albicans* (95,1%), un aislamiento de *C. guilliermondii* y uno de *C. tropicalis*, en tanto que a $\text{pH} > 4,5$ ($n = 29$) se identificaron 26 *C. albicans* (89,7%), una *C. tropicalis*, una *C. glabrata* y una *C. parapsilosis*, no existiendo diferencias significativas entre las especies aisladas en los dos grupos, siendo en ambos *C. albicans* la especie preponderante ($p = 0,64$).

Con respecto a la producción de fosfolipasas por *C. albicans*, encontramos que a $\text{pH} \leq 4,5$ el 92,3% de los aislamientos presentaban dicha actividad, siendo alta o muy alta en el 91,6% de los mismos. El valor de la mediana de la actividad fosfolipasa fue de 0,58 y el rango intercuartil de 0,18. El 96,2% de los aislamientos recuperados de secreciones con $\text{pH} > 4,5$ mostraron actividad fosfolipasa y todos en alto o muy alto grado, siendo la mediana y el rango intercuartil de 0,55 y 0,17, respectivamente. No se encontró diferencia significativa en la producción enzimática entre los dos grupos definidos según su pH ($p = 0,2003$).

Cuando se compararon los medios de cultivos utilizados para detectar actividad fosfolipasa se encontró que el medio agar malta suplementado con yema de huevo era el más eficaz para tal fin (figura 1).



Figura 1. Actividad fosfolipasa de diferentes aislamientos de *C. albicans* en agar malta suplementado con yema de huevo después de tres días de incubación.



Figura 2. Actividad proteolítica de diferentes aislamientos de *C. albicans* en medio con albúmina sérica bovina, después de cinco días de incubación.

Con referencia a la actividad proteolítica de los aislamientos de *C. albicans* cabe señalar que la misma se detectó en el 61,5% de los aislamientos de $\text{pH} \leq 4,5$ siendo alta o muy alta en el 50% de ellos con un valor de la mediana de Prz de 0,88 (rango intercuartil de 0,22), mientras que en el otro grupo se observó actividad proteolítica en el 96,2% de los aislamientos, con alta o muy alta actividad en 68% de los mismos y el valor de la mediana de Prz fue de 0,71 (rango intercuartil de 0,16). Los valores de Prz en aislamientos de $\text{pH} > 4,5$ resultaron significativamente menores que en los de $\text{pH} \leq 4,5$ ($p = 0,0001$) (figura 2).

En la tabla pueden observarse los resultados obtenidos para ambas enzimas en los aislamientos de *C. albicans* recuperados de secreciones vaginales en ambos rangos de pH .

Discusión

Los resultados obtenidos en estudios previos realizados en nuestro servicio asistencial [3,37] mostraron un alto porcentaje de asociación de candidiasis vulvovaginal con vaginosis bacteriana, dato que no concuerda con lo descrito por otros autores [15,16], excepto por Hernández y cols. en una población VIH positiva [14].

Debido a que la patogenicidad de *C. albicans* está regulada por una red de factores de virulencia, entre los cuales se encuentran diversas enzimas hidrolíticas extracelulares que convierten a las infecciones candidiásicas en multifactoriales [33], se decidió estudiar la participación de las actividades fosfolipasa y proteinasa en las candidiasis vulvovaginales coexistentes con vaginosis bacteriana.

El término fosfolipasas describe un grupo heterogéneo de enzimas con capacidad de hidrolizar glicerofosfolípidos. Estas enzimas han sido reconocidas como factores de virulencia de bacterias, protozoos y hongos [33].

En base a nuestros resultados, si bien un gran porcentaje de los aislamientos presentaron alta actividad fosfolipasa, podemos desestimar la participación de esta en-

Tabla. Actividad fosfolipasa y proteinasa en aislamientos de *Candida albicans* a distintos rangos de pH. Valores expresados como índice de actividad (Pz y Prz)

Valor del índice	n° de aislamientos			
	pH ≤ 4,5		pH > 4,5	
	Pz	Prz	Pz	Prz
1	3	15	1	1
0,90-0,99	2	4	0	2
0,80-0,89	1	8	0	6
0,70-0,79	4	7	4	7
< 0,70	29	5	21	10

zima en la concomitancia de candidiasis vulvovaginal y vaginosis bacteriana, ya que no se obtuvo diferencia significativa entre los valores Pz de ambos grupos.

Según el trabajo de revisión realizado por Shaller y cols. [33], la función de las fosfolipasas no es, aún, clara y debe continuarse con las investigaciones.

Las proteinasas secretadas son activas a pH ácido, presentando cada isoenzima un rango de pH y un pH óptimo de actividad [25,26].

De Bernardis y cols., en un trabajo de infección candidiásica vaginal experimental en modelo murino, concluyeron que en dicha infección se expresan las isoenzimas Sap1 a Sap3, en tanto que Sap4 a Sap6 tienen poca actividad [5].

Nosotros evaluamos la producción de proteinasas al pH que presentaban la mayoría de las secreciones vaginales de cada grupo. Las cepas provenientes y estudiadas a pH = 4 presentaron menor actividad proteínica que aquellas de pH = 5,5. Teniendo en cuenta el pH óptimo de actividad de las isoenzimas, podemos deducir que la actividad proteolítica debida a Sap4-Sap6 tendría un papel importante en la concomitancia de candidiasis vulvovaginal con vaginosis bacteriana.

Consideramos que es importante continuar con los estudios de otros factores de virulencia de *Candida*, como son la adherencia y el cambio fenotípico, para determinar su importancia en la producción de candidiasis vulvovaginal cuando el pH vaginal es superior a 4,5.

Bibliografía

1. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmer KK. Nonspecific vaginitis; diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74: 14-22.
2. Basu S, Guguani HC, Joshi S, Gupta N. Distribution of *Candida* species in different clinical sources in Delhi, India, and proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* isolates. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 137-140.
3. Belmonte A, Noguera MG, Ombrella AM, Ruiz Abad I, de los Angeles Nistal M, Sutich EG, Caffarena GE, Dlugovitzky DG. Estudio microbiológico de vaginitis y vaginosis en mujeres sexualmente activas. *Medicina (Buenos Aires)* 2002; 62: 103-106.
4. Binolfi A, Biasoli MS, Luque AG, Tosello ME, Magaró HM. High prevalence of oral colonization by *Candida dubliniensis* in HIV-positive patients in Argentina. *Med Mycol* 2005; 43: 431-437.
5. De Bernardis F, Arancia S, Morelli L, Huber B, Sanglard D, Schäfer W, Cassone A. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular *sap2*, are virulence factors for *Candida* vaginitis. *J Infect Dis* 1999; 179: 301-308.
6. De Bernardis F, Bocconeri M, Adriani D, Spreghin E, Santoni D, Cassone A. Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect Immun* 1997; 65: 3399-3405.
7. De Bernardis F, Lorenzini R, Verticchio R, Agantensi L, Cassone A. Isolation acid proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida parapsilosis* from outpatients with vaginitis. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2598-2603.
8. De Bernardis F, Molinari A, Bocconeri M. Modulation of cell surface associated mannanprotein antigen expression in experimental candidal vaginitis. *Infect Immun* 1994; 62: 509-519.
9. De Bernardis F, Mondello G, Scaravelli A, Pachi A, Girolomo A, Agantensi L, Cassone A. High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus- infected women. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1376-1380.
10. De Bernardis F, Mühlischlegel FA, Cassone A, Fonzi WA. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1998; 66: 3317-3325.
11. Echeverría A, Durante AG, Arechavala A, Negrón R. Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 95-98.
12. Fidel PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 335-348.
13. Ghannoum MA. Potencial rol of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 915-926.
14. Hernández E, Colina M, Villalobos N. Infecciones bacterianas y micóticas del tracto genital inferior, en pacientes del sexo femenino VIH positivas. *Kasmera* 2003; 31: 104-111.
15. Holst E, Svensson I, Skarin A, Westrom L, Mardh PA. Vaginal colonization with *Gardereella vaginalis* and anaerobic curved rods. *Scand J Urol Nephrol* 1984; 86 (Suppl): 147-152.
16. Holst E, Wathne B, Hovelius B, Mardh PA. Bacterial vaginosis: microbiological and clinical findings. *Am J Med* 1983; 74: 14-22.
17. Hoover CI, Jantapour MJ, Newport G. Cloning and regulated expression of the *Candida albicans* phospholipase B (PLB-) gene. *Fems Microbiol Lett* 1998; 167: 163-169.
18. Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* 1996; 7: 55-69.
19. Hube B. Possible role of secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 65-68.
20. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico, Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 1992.
21. Kumar G, Kumar SJ, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia* 2006; 161: 213-218.
22. Mendling W, Seebacher C. Guideline vulvovaginal candidosis: Guideline of the German Dermatological Society, the German Speaking Mycological Society and the Working Group for Infections and Infectimmunology of the German Society for Gynecology and Obstetrics. *Mycoses* 2003; 46: 365-369.
23. Morrow B, Ramsey H, Soll DR. Regulation of phase-specific genes in the more general switching system of *Candida albicans* strain 3153A. *J Med Vet Micol* 1994; 32: 287-294.
24. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM. Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB-) under various environmental and physiological conditions. *Microbiology* 2003; 149: 261-267.
25. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* 2004; 6: 915-926.
26. Naglik JR, Challancombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 400-428.
27. Oriel JD, Partridge BM, Denny MJ, Colman JC. Genital yeast infection. *Br Med J* 1992; 4: 761-764.
28. Ozcan S, Kaynak F, Kalkanci A, Abbasoglu U, Kustimur S. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 319-324.
29. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 20: 7-14.
30. Ray TL, Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun* 1990; 58: 508-514.
31. Rodgers CA, Beardall AJ. Recurrent vulvovaginal candidiasis: why does it occur? *International J of STD and aids* 1999; 10: 435-441.
32. Rodríguez A, Mardh PA, Pina Vaz C, Martínez de Olivera J, Freitas Da Fonseca A. Is the lack of concurrence of bacterial vaginosis and vaginal candidiasis explained by the presence of bacterial amines? *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 367-370.
33. Schaller M, Borelli C, Kortling HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005; 48: 365-377.
34. Sobel JD, Muller G, Buckley HR. Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. *Infect Immun* 1984; 44: 576-580.
35. Sobel JD. Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 544: 547-557.
36. Soll DR. High-frequency switching in *Candida albicans* and its relations to vaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 997-1001.
37. Tozzini R, Ruiz Abad I, Molteni O, Belmonte A, Noguera M, Ombrella A. Investigación de la flora autóctona y de transmisión sexual en 100 mujeres sintomáticas y asintomáticas. *Obstet Ginecol Latinoam* 1998; 56: 185-188.
38. Vidotto V, Pontón J, Aoki S, Quindós G, Mantoan B, Pugliese A, Ito-Kuwa S, Nakamura K. Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 70-74.
39. Wagner T, Borg M, Zepelin V, Rüchel R. pH-dependent denaturation of extracellular aspartic proteinases from *Candida* species. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 275-278.
40. White TC, Agabian N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: Isoenzyme pattern is determined by cell type levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol* 1995; 177: 5215-5221.