

## ARTICULO ORIGINAL

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DEL ÓXIDO DE CLORO PARA INHIBIR LA FORMACIÓN DE BIOFILM DE *CANDIDA ALBICANS*

Anna Carolina Rubio Molina<sup>1,2</sup>, Lorena Paola Arce<sup>1</sup>, Ercilia Ibarra<sup>1,2</sup> y María Guadalupe Vizoso Pinto<sup>1,2,3\*</sup>.

<sup>1</sup>CCT-INSIBIO (UNT-CONICET), Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Tucumán.

<sup>2</sup>Laboratorio Central de Cs. Básicas y OR. Genética, Dto. Biomédico Fac. de Medicina de la Universidad Nacional de Tucumán. <sup>3</sup>Cátedra de Micología, Instituto de Microbiología "L. Verna", Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán. E-mail address: [mgvizoso@fm.unt.edu.ar](mailto:mgvizoso@fm.unt.edu.ar)

**RESUMEN**

Las candidiasis son micosis oportunistas causadas por levaduras del género *Candida* que se desarrollan en individuos con compromiso inmunológico. La frecuencia de esta patología ha ido en aumento con el advenimiento de terapias inmunosupresoras, el uso indiscriminado de antibióticos que modifican la microbiota natural de las mucosas y el empleo de catéteres y prótesis. Algunas levaduras del género *Cándida* son capaces de formar biopelículas o biofilms que aumentan su adherencia a las superficies y su resistencia a desinfectantes y antifúngicos.

En este trabajo demostramos que concentraciones subletales de ClO<sub>2</sub> aplicadas por cortos períodos de tiempo, tienen un efecto contra productivo ya aumentan la producción de biofilm.

Sin embargo, la exposición del biofilm al ClO<sub>2</sub> (100 ppm como mínimo) por un tiempo más prolongado (10 y 15 minutos), produjo su disminución a niveles significativamente menores que aquellos del control.

El ClO<sub>2</sub> podría ser usado como un agente para la desinfección de superficies de trabajo en nosocomios, pero también para la desinfección de prótesis dentales y elementos de consultorios odontológicos que podrían estar contaminadas con levaduras de *Candida* debido a su facilidad de uso, bajo costo y efectividad.

**ABSTRACT**

Candidiasis is an opportunistic mycose caused by yeast belonging to genus *Candida*, which affects immunocompromised individuals. Novel immune suppressive therapies, the indiscriminate use of antibiotics affecting the normal microbiota at mucosal sites, and the

presence of catheters and prothesis has increased the frequency of appearance of this pathology. Some of the yeast belonging to this genus is able to build biofilms, which enhance their adherence to surfaces and their resistance to disinfectant and antifungal substances.

In this study, we show that the use of sublethal concentrations of ClO<sub>2</sub> for short periods of time increase biofilm production. On the contrary, the use of higher concentrations of ClO<sub>2</sub> up to 100 ppm for longer periods of time (10 to 15 minutes) significantly reduce biofilm formation.

Considering its easy application, low cost and effectivity, ClO<sub>2</sub> should be considered as a disinfectant agent in working surfaces in hospitals, or for its use for treatment of dental prothesis and certain odontologic material which may be contaminated with *Candida* yeast.

**INTRODUCCIÓN**

Las candidiasis son micosis producidas por hongos saprófitos oportunistas pertenecientes al género *Candida*, siendolas especies encontradas con más frecuencia: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*[1]. Estas levaduras pueden producir desde infecciones mucocutáneas hasta cuadros invasivos, pudiendo afectar cualquier órgano. La incidencia de micosis intrahospitalarias es cada vez mayor; y debido a la elevada prevalencia en individuos que cursan con inmunodeficiencias y a la severidad de los cuadros clínicos producidos en ellos, estos microorganismos considerados

normalmente comensales, pueden causar enfermedad [2]. Por otra parte, los procedimientos médicos modernos, como el uso de fármacos inmunosupresores o citotóxicos, antibióticos potentes que suprimen la flora bacteriana normal o dispositivos implantados, como por ejemplo catéteres, favorecen el desarrollo de infecciones recurrentes. En adultos mayores, la candidiasis oral es un padecimiento frecuente[3].

Algunas especies del género *Candida* poseen capacidad de formar biopelículas o biofilms, los cuales les permiten sobrevivir en situaciones de estrés ambiental y les otorgan resistencia frente a las defensas del huésped. El biofilm les confiere además mayor resistencia a los antifúngicos, dificultando el tratamiento de estas infecciones. Por ello, se considera a la capacidad de formar biofilm como un factor importante de virulencia [4, 5].

El dióxido de cloro es un gas manufacturado de color que va del amarillo al amarillo rojizo. Cuando se lo agrega al agua, el dióxido de cloro forma el ion clorito, que es altamente reactivo y presenta propiedades biocidas[6], cuya eficacia se da en un amplio rango de pH (3-9), a diferencia del hipoclorito de sodio. Se demostró que el dióxido de cloro destruye bacterias (*E. coli*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Clostridium sp.*), virus (Rotavirus, Coronavirus, Poliovirus, Adenovirus, Influenza), protozoos (*Cryptosporidio*, *Giardia*, *amebas*[7]) y hongos (*Aspergillus sp.*, *Mucor sp.*), incluyendo sus esporas[8-10].

En el 2004, Mohammed et al. reportaron el uso de  $\text{ClO}_2$  para el tratamiento de la candidiasis oral atrófica crónica en pacientes geriátricos [3]. En dicho estudio, el  $\text{ClO}_2$  se usó como desinfectante de superficies (para prótesis dentales) y como agente desinfectante tópico

(para la mucosa oral). Los pacientes adultos mayores debían hacer buches diarios durante 10 días y sumergir sus dentaduras en una solución que liberaba  $\text{ClO}_2$ , la cual se obtenía a partir de mezclar dos soluciones conocidas comercialmente como Dioxident (Frontier Pharmaceutical, New York, USA). Dicho tratamiento resultó efectivo para controlar la candidiasis en 10 días de tratamientos sin efectos secundarios.

A partir de estos antecedentes, el objetivo del siguiente trabajo fue evaluar la capacidad desinfectante del óxido de cloro y su capacidad para disrumpir el biofilm desarrollado por especies de *Candida sp.*

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Microorganismos

Se utilizó la cepa *Candida albicans* IBL 007 previamente aislada de vulvovaginitis y conservada a  $-20^\circ\text{C}$  en medio YPD adicionado con glicerol al 20%. Previo a comenzar los ensayos, la cepa fue activada en Agar Saboureaud Glucosado (SDA: 40 g/L glucosa, 10 g/L peptona, 15 g/L agar, 0,05 g/L cloranfenicol, pH 5.6) y luego en caldo YPD (dextrosa 0,02 g/ml, peptona 0,02 g/ml, agar bacteriológico 0,02 g/ml, extracto de levadura 0,01 g/ml).

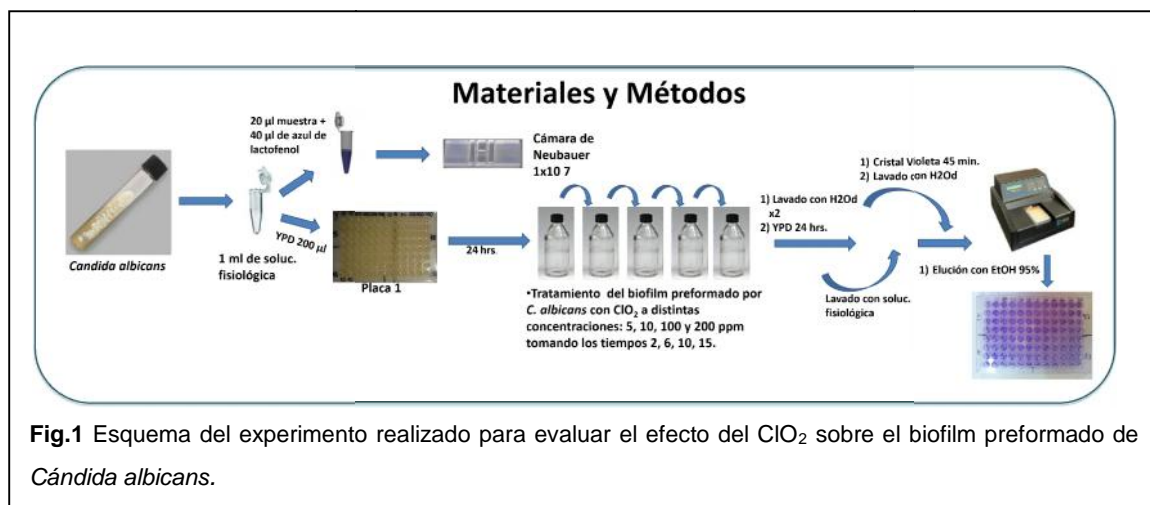
### 2. Óxido de Cloro.

El  $\text{ClO}_2$  se produce *in situ*, cuando se mezclan dos soluciones de HCl y de clorito de sodio como elemento activo, se libera 800 ppm de  $\text{ClO}_2$ . La misma fue adicionada inmediatamente al medio de cultivo para obtener las concentraciones finales correspondientes a 5, 10, 100 y 200 ppm de  $\text{ClO}_2$  producido.

### 3. Tratamiento de biofilm con Óxido de Cloro

La Fig.1 muestra esquemáticamente el protocolo que se siguió para inducir la formación de biofilm, el tratamiento con óxido de cloro y la cuantificación del biofilm resultante con el colorante cristal violeta.

incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente y finalmente se lavó con agua destilada y se diluyó el colorante fijado al biofilm con etanol 96°. La absorbancia a 595nm es directamente proporcional a la cantidad de biofilm formado. El control negativo se realizó en pocillos que fueron tratados con agua destilada en lugar de óxido de cloro, los cuales corresponden al 100% del biofilm formado.



**Fig.1** Esquema del experimento realizado para evaluar el efecto del ClO<sub>2</sub> sobre el biofilm preformado de *Cándida albicans*.

Brevemente, se preparó un inóculo de  $1 \times 10^7$  UFC/ml en YPD caldo ajustándolo por recuento en cámara de Neubauer. Se sembraron 200 µl de la suspensión en cada pocillo de una placa de poliestireno estéril de 96 pocillos de fondo plano y se incubó toda la noche a 37°C. El medio fue eliminado cuidadosamente invirtiendo las placas sobre papel absorbente. Se trató el biofilm con diluciones de óxido de cloro preparadas en el momento (10 a 800 ppm) durante 2, 6, 10 y 15 minutos. Los pocillos se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se completaron con 200 µl de caldo YPD. La placa se incubó nuevamente a 37°C toda la noche. El medio se eliminó por inversión de la placa y los pocillos se lavaron con agua destilada estéril. La tinción de biofilm se hizo agregando 200 µl de 0,1% de cristal violeta en etanol por pocillo, se

### 4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente con ANOVA, Dunnett's test.  $P < 0.05$  con el programa Graph Prism 6.0.

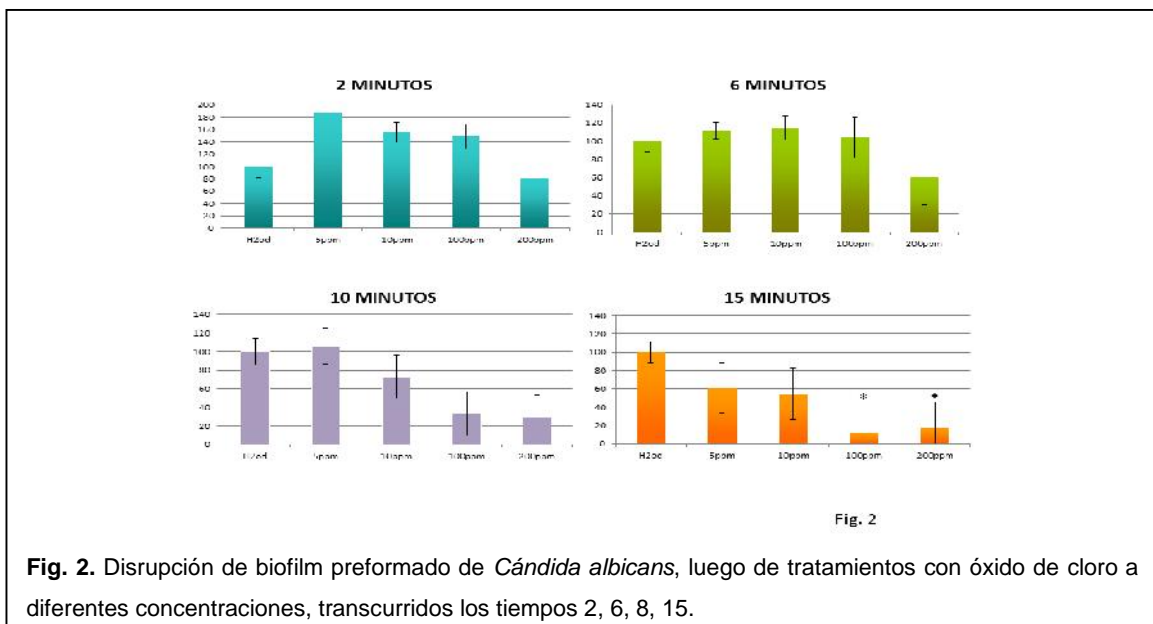
### RESULTADOS

Se observó que luego del tratamiento con ClO<sub>2</sub> durante 2 y 6 minutos la disrupción del biofilm fue baja, con valores de porcentaje de biofilm superiores a 100% en promedio, para todas las concentraciones probadas. Tomando como referencia el biofilm tratado solamente con agua destilada, se observó un ligero aumento en la cantidad de biofilm formado cuando se incubó con ClO<sub>2</sub> (5-100 ppm) por poco tiempo (2 y 6 minutos). El mismo efecto se observó al aplicar bajas concentraciones de ClO<sub>2</sub> durante 10 minutos. Sin embargo, después de un tratamiento más

prolongado, de 10 y 15 minutos, se observó una disminución significativa del porcentaje de biofilm directamente proporcional a la concentración de óxido de cloro. En base a nuestros resultados, el tratamiento ideal para obtener una reducción significativa de biofilm preformado, consiste en tratar el mismo con 100-200 ppm durante por lo menos 15 minutos.

En los casos de infecciones nosocomios es importante el desarrollo de procedimientos efectivos que aseguren no sólo la muerte de las células planctónicas sino también la disrupción de los biofilms[13].

En base a los resultados de este trabajo podemos concluir que bajas concentraciones de ClO<sub>2</sub> aplicadas por cortos períodos de tiempo, no solo no son capaces de disrumpir el biofilm



## DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Cuando los microorganismos se adhieren a una superficie y forman un biofilm, disminuye su susceptibilidad a los desinfectantes. Las células que constituyen estos biofilms se encuentran sumergidas en una matriz de material extracelular que las protege de numerosas sustancias tóxicas [11, 12]. De esta manera, los biofilms sirven como reservorios de patógenos en hospitales y son difícilmente removibles. Se estima que estos reservorios son responsables de aproximadamente el 65% de las infecciones nosocomiales. Por este motivo, para poder controlar las infecciones adquiridas en

preformado, sino que incluso aumentan su formación. Esto podría deberse a que el estrés causado a las células en contacto con bajas concentraciones de ClO<sub>2</sub> por breves períodos de tiempo podría inducir la formación de biofilm como un mecanismo de protección y resistencia. Estos resultados son similares a lo observado en el caso de *B. subtilis* cuando es tratado con concentraciones subletales de ClO<sub>2</sub>. Shemesh et al. [14] demostraron que dosis subletales activan la transcripción de genes que codifican para proteínas que participan de la síntesis de la matriz extracelular. Sería interesante en un futuro evaluar si la inducción de biofilm de candida con

concentraciones subletales de ClO<sub>2</sub> se debe a un mecanismo semejante.

Sin embargo, la exposición del biofilm al ClO<sub>2</sub> por un tiempo más prolongado (10 y 15 minutos), produjo su disminución a niveles significativamente menores que el control. Se observó que a mayores concentraciones de ClO<sub>2</sub> el porcentaje de biofilm decrece en forma inversamente proporcional a las concentraciones testeadas.

El ClO<sub>2</sub> podría ser tenido en cuenta como un agente para la desinfección de superficies de trabajo en nosocomios, pero también para la desinfección de prótesis dentales y elementos de consultorios odontológicos que podrían estar contaminadas con levaduras de *Candida* debido a su facilidad de uso, bajo costo y efectividad. La concentración y tiempo necesario para la desinfección y disrupción de biofilm preformado es de acuerdo a nuestros ensayos de un mínimo de 100 ppm durante 15 minutos. Es importante destacar que el uso inapropiado de este químico produce un efecto contrario, ya que estimula la formación de biofilm.

En nuestro conocimiento, este es el primer reporte del efecto del ClO<sub>2</sub> sobre biofilms del patógeno oportunista *Candida albicans*. Más estudios son necesarios para dilucidar el mecanismo de acción del ClO<sub>2</sub> sobre biofilms de *Candida* y de otros microorganismos.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Interuniversitario (CIN) por becas de estímulo a las investigaciones científicas para las estudiantes A.C.R.M. y E.I.

L.A, F.A. y M.G.V.P son personal de CONICET (becaria, CPA e investigadora, respectivamente).

#### REFERENCIAS

- [1] Mujica MT, Finquelievich JL, Jewtuchowicz V, Iovannitti CA. "Prevalence of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in clinical samples during 1999-2001". *Revista Argentina de microbiología*. 2004;36:107-12.
- [2] Davel G, Canteros CE. "Epidemiological status of mycoses in the Argentine Republic". *Revista Argentina de microbiología*. 2007;39:28-33.
- [3] Mohammad AR, Giannini PJ, Preshaw PM, Alliger H. "Clinical and microbiological efficacy of chlorine dioxide in the management of chronic atrophic candidiasis: an open study". *International Dental Journal*. 2004;54:154-8.
- [4] Perea S, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect Dis*. 2002;35:1073-80.
- [5] Kontoyiannis DP, Lewis RE. "Antifungal drug resistance of pathogenic fungi". *Lancet*. 2002;359:1135-44.
- [6] Shi Y, Ling W, Qiang Z. "A comparison of disinfection by-products formation during sequential or simultaneous disinfection of surface waters with chlorine dioxide and chlor(am)ine". *Environmental technology*. 2013;34:1191-8.
- [7] Ogata N, Sakasegawa M, Miura T, Shibata T, Takigawa Y, Taura K, et al. "Inactivation of Airborne Bacteria and Viruses Using Extremely Low Concentrations of Chlorine Dioxide Gas". *Pharmacology*. 2016;97:301-6.
- [8] Sy KV, Murray MB, Harrison MD, Beuchat LR. "Evaluation of gaseous chlorine dioxide as a sanitizer for killing *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and yeasts and molds on fresh and fresh-cut produce". *J Food Prot*. 2005;68:1176-87.
- [9] Hsu CS, Lu MC, Huang DJ. "Application of chlorine dioxide for disinfection of student health centers". *Environmental Monitoring and Assessment*. 2012;184:741-7.
- [10] Donlan RM. "Biofilms: microbial life on surfaces". *Emerg Infect Dis*. 2002;8:881-90.
- [11] Wang T, Wu J, Qi J, Hao L, Yi Y, Zhang Z. "Kinetics of Inactivation of *Bacillus subtilis* subsp. *niger* Spores and *Staphylococcus albus* on Paper by Chlorine Dioxide Gas in an Enclosed Space". *Appl. Environ. Microbiol*.
- [12] Donlan RM, Costerton JW. "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms". *Clin. Microbiol Rev*. 2002;15:167-93.
- [13] Song L, Wu J, Xi C. " ". *American Journal of Infection Control*. 2012;40:926-30.