



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“DETECCIÓN DE CANDIDOSIS VAGINAL EN MUJERES
ATENDIDAS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
PERINATOLOGÍA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNOSTICA

PRESENTA:

DANIELA MÉNDEZ ROMÁN

ASESORAS

M. EN C. MARIA GUADALUPE AVILÉS ROBLES

Q.B.P. GRACIELA VILLEDA GABRIEL

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Detección de Candidosis vaginal en mujeres atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

Que presenta la pasante: **Daniela Méndez Román**

Con número de cuenta: **309274360** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de Noviembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
1er. SUPLENTE	M. en C. Raquel Ma. del Refugio Tapia Romero	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Laura Gricelda Martínez Méndez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

Dedicatoria

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su infinita paciencia para inculcarme educación y valores, pero sobre todo por su gran apoyo durante toda mi formación académica.

A mis hermanos por acompañarme a lo largo del camino y demostrarme siempre su amor incondicional.

Porque cada día de esfuerzo y dedicación valió la pena, este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a las personas que participaron en la elaboración de mi tesis y que estuvieron conmigo durante todo el proceso para hacer que esto fuera posible.

A mi asesora de tesis, la Q.B.P. Graciela Villeda Gabriel, coordinadora del laboratorio de Microbiología y Parasitología del Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes, por ser parte importante de este trabajo al compartir conmigo sus conocimientos, por sus enseñanzas y consejos de vida, porque profesionalmente es un ejemplo a seguir y como persona una excelente amiga.

A mi asesora la Maestra en Ciencias María Guadalupe Avilés Robles, profesora de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por formar parte de mi vida académica, por la paciencia y entrega a su profesión, por sus clases de Microbiología inigualables y su apoyo a la elaboración de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por hacerme sentir orgullosa de pertenecer a la máxima casa de estudios, a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por permitirme estudiar en sus aulas y aprender de todos los profesores que sin duda forman una parte importante de lo que ahora soy; incluyendo también a mis sinodales de tesis por dedicarle tiempo a la revisión de este trabajo y contribuir a que concluyera exitosamente.

Al Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes por aceptarme como estudiante y darme la oportunidad de desarrollar al máximo mis capacidades como profesionista; principalmente al laboratorio de Microbiología y Parasitología donde adquirí las habilidades necesarias para desenvolverme en el ámbito laboral y donde además conocí personas maravillosas de las cuales aprendí demasiado.

A mis padres y hermanos por no dejarme caer ante las adversidades, por confiar en mí y enseñarme que todo logro requiere de esfuerzo, a mis familiares y amigos por darme fuerza para vencer los retos y a esa persona especial que con su amor incondicional me motiva a perseguir mis sueños.

Índice

1.- Resumen.....	9
2.-Introducción.....	11
3.- Objetivo general.....	21
4.- Objetivos particulares.....	21
5.- Marco teórico.....	22
5.1.- Levaduras.....	22
5.1.1.- Clasificación taxonómica de las levaduras.....	24
5.1.2.- Levaduras del género <i>Candida</i>	24
5.1.3.- <i>Candida albicans</i>	25
5.1.4.- <i>Candida glabrata</i>	26
5.1.5.- <i>Candida krusei</i>	28
5.1.6.- <i>Candida parapsilosis</i>	29
5.2.- Candidosis.....	30
5.2.1.- Candidosis vaginal.....	31
5.2.2.- Candidosis vaginal en mujeres embarazadas.....	32
5.2.3.- Epidemiología de la infección.....	33
5.2.4.- Etiología de la infección.....	34
5.2.5.- Factores de riesgo.....	36
5.2.6.- Mecanismos de patogenicidad.....	37
5.2.7.- Mecanismos de defensa del hospedero.....	39

5.3.- Diagnóstico de Candidosis vaginal.....	40
5.3.1.- Exudado cervicovaginal.....	41
5.3.2.- Examen en fresco.....	42
5.3.3.- Tinción de Gram.....	44
5.3.4.- Cultivo de la muestra de exudado cervicovaginal.....	45
5.3.5.- Medios de cultivo requeridos para sembrar una muestra de exudado Cervicovaginal.....	46
5.3.6.- Tubo germinativo.....	49
5.3.7.- Sistemas inmunológicos de aglutinación.....	49
5.3.8.- Sistema API.....	50
5.3.9.- Sistema Vitek 2 compact.....	50
5.4.- Tratamiento de la candidosis vaginal.....	53
6.- Materiales y reactivos.....	56
7.- Metodología.....	57
8.- Resultados.....	58
9.- Discusión.....	80
10.- Conclusiones.....	88
11.- Anexos.....	90
11.1.-Toma de muestra de exudado cervicovaginal según el protocolo establecido en el Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes.....	91

11.2.- Procesamiento de muestras de exudado cervicovaginal según las técnicas establecidas en el Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes.....	93
11.2.1.- Examen en fresco.....	93
11.2.2.- Tinción de Gram.....	94
11.2.3.- Inoculación y revisión de medios de cultivo.....	95
11.3.- Fundamento de los diferentes medios de cultivo que se requieren para sembrar una muestra de exudado cervicovaginal.....	96
11.3.1.- Agar gelosa chocolate.....	96
11.3.2.- Agar sangre de carnero.....	97
11.3.3.- Agar sangre humana.....	97
11.3.4. - Agar Mac Conkey.....	97
11.3.5. - Agar Thayer Martin.....	98
11.3.6.- Cromoagar orientador para levaduras.....	98
11.3.7.- Agar dextrosa papa.....	99
11.3.8.- Agar dextrosa Sabouraud.....	99
11.4.- Confirmación del diagnóstico para candidosis.....	100
12.- Referencias.....	102

Índice de tablas

Tabla 1.- Prevalencia de pacientes embarazadas y no embarazadas atendidas en el INPer, de las cuales se obtuvieron 200 muestras positivas para candidosis vaginal.....	65
Tabla 2.- Presencia de <i>Candida</i> spp. como microorganismo único o como infección mixta en muestras de pacientes embarazadas y no embarazadas con candidosis vaginal atendidas en el INPer.....	66
Tabla 3. - Prevalencia de las diferentes especies de <i>Candida</i> aisladas de muestras obtenidas de pacientes atendidas en el INPer.....	68
Tabla 4.- Especies de <i>Candida</i> que mostraron resistencia a antifúngicos a partir del panel de sensibilidad montado en sistema automatizado Vitek 2 compact.....	69
Tabla 5.- Antifúngicos indicados como tratamiento de candidosis vaginal para las diferentes especies de <i>Candida</i> aisladas en muestras de pacientes embarazadas atendidas en el INPer.....	71
Tabla 6.- Edad de pacientes embarazadas y no embarazadas atendidas en el INPer, de las cuales se obtuvieron las muestras positivas para candidosis vaginal.....	73
Tabla 7.- Padecimientos predisponentes para el desarrollo de candidosis vaginal en pacientes atendidas en el INPer.....	75
Tabla 8.- Procedencia de pacientes atendidas en el INPer.....	77

Índice de figuras

Figura 1.- Dimorfismo en levaduras.....	22
Figura 2.- Reproducción asexual de las levaduras.....	23
Figura 3.- Diagrama de micosis producidas por <i>Candida</i> en varias partes del cuerpo humano y los órganos.....	31
Figura 4.- Aspectos clínicos de utilidad para la detección de Candidosis vaginal....	32
Figura 5.- Candidosis oral y lesiones vesiculares a nivel de tronco en recién nacidos...33	
Figura 6.- Mecanismos propuestos para la unión e invasión de tejidos por <i>C. albicans</i>	39
Figura 7.- Diagnóstico de candidosis vaginal en el laboratorio de Microbiología....	40
Figura 8.- Flujo característico de infección cervicovaginal causada por <i>Candida albicans</i>	42
Figura 9.- Sistema automatizado Vitek 2 compact para la identificación de microorganismos aislados de muestras clínicas.....	51
Figura 10. Levaduras del género <i>Candida</i> en examen en fresco a partir de una muestra de exudado cervicovaginal.....	58
Figura 11. Pseudomicelio de <i>C.albicans</i> en examen en fresco a partir de una muestra de exudado cervicovaginal.....	59
Figura 12. Levaduras de <i>Candida glabrata</i> en examen en fresco con KOH al 40% a partir de una muestra de exudado cervicovaginal.....	60
Figura 13. Pseudomicelio de <i>C.albicans</i> en examen en fresco con KOH al 40% a partir de una muestra de exudado cervicovaginal.....	61
Figura 14. Levaduras del género <i>Candida</i> en tinción de Gram a partir de una muestra de exudado cervicovaginal.....	62

Figura 15. Pseudohifas y pseudomicelio de *C. albicans* en tinción de Gram a partir de una muestra de exudado cervicovaginal.....63

Figura 16. Desarrollo de colonias del género *Candida* en Cromoagar orientador para levaduras.....64

Índice de gráficas

Gráfica 1.- Frecuencia de pacientes embarazadas y no embarazadas atendidas en el INPer, de las cuales se obtuvieron 200 muestras positivas para candidosis vaginal.....65

Gráfica 2.-Presencia de *Candida* spp. en muestras de pacientes embarazadas y no embarazadas con candidosis vaginal atendidas en el INPer.....66

Gráfica 3.- Frecuencia de muestras de pacientes embarazadas y no embarazadas con candidosis vaginal atendidas en el INPer.....67

Gráfica 4.- Prevalencia de las diferentes especies de *Candida* aisladas de muestras obtenidas de pacientes atendidas en el INPer.....68

Gráfica 5.- Frecuencia de las diferentes especies de *Candida* aisladas de muestras obtenidas de pacientes atendidas en el INPer.....69

Gráfica 6.- Resistencia de *Candida* spp. a diferentes antifúngicos a partir de panel de sensibilidad montado en sistema automatizado Vitek 2 compact.....70

Gráfica 7.- Frecuencia de cepas de *Candida* spp. resistentes a antifúngicos a partir de panel de sensibilidad montado en sistema automatizado Vitek 2 compact.....70

Gráfica 8.- Antifúngicos indicados como tratamiento de candidosis vaginal para las diferentes especies de *Candida* aisladas en muestras de pacientes atendidas en el INPer.....72

Gráfica 9.- Frecuencia de antifúngicos indicados como tratamiento de candidosis vaginal en mujeres atendidas en el INPer.....	72
Gráfica 10.- Rangos de edad de pacientes embarazadas y no embarazadas atendidas en el INPer, de las cuales se obtuvieron las muestras positivas para candidosis vaginal.....	74
Gráfica 11.- Frecuencia de rangos de edad de pacientes atendidas en el INPer, de las cuales se obtuvieron las muestras positivas para candidosis vaginal.....	74
Gráfica 12.- Padecimientos predisponentes para el desarrollo de candidosis vaginal en pacientes atendidas en el INPer.....	76
Gráfica 13.- Frecuencia de padecimientos predisponentes al desarrollo de candidosis vaginal en pacientes atendidas en el INPer.....	76
Gráfica 14.- Procedencia de pacientes atendidas en el INPer.....	78
Gráfica 15.- Descripción en porcentaje de la procedencia de pacientes atendidas en el INPer.....	78

1.- Resumen

La candidosis vaginal es una infección ginecológica frecuente y en la que cada vez son más los factores que vuelven a una mujer susceptible a adquirirla. Los signos y síntomas de la candidosis vaginal suelen pasar desapercibidos por las pacientes e incluso confundirse con algún otro tipo de infección, la sintomatología común incluye: leucorrea ligeramente acuosa o muy espesa y abundante, prurito vulvar, dispareunia, disuria y enrojecimiento de las mucosas genitales debido a la inflamación en la zona. Las pacientes de las cuales se obtuvieron las 200 muestras estudiadas fueron 76.5% embarazadas y 23.5% no embarazadas, las cuales acudieron por orden medica al laboratorio de Microbiología y Parasitología del Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes, donde se les tomó una muestra de exudado cervicovaginal y se procesaron de manera habitual corroborando lo resultados obtenidos a través de ciertos criterios que se agregaron al examen en fresco, tinción de gram y cultivo en medios selectivos y diferenciales como el cromoagar orientador para levaduras.

Por lo tanto, si no existen signos y síntomas clínicos que den indicio de una infección vaginal causada por levaduras, así como evidencia diagnóstica que establezca la presencia de ellas durante el análisis de las muestras obtenidas, entonces se descarta la posibilidad de que la paciente curse por una candidosis vaginal; por esta razón no debe otorgarse un resultado apresurado y sin una evaluación de la muestra ginecológica. Debido a que esto ocurre con frecuencia, se realizó la técnica de examen en fresco por duplicado para todas las muestras ya que en la segunda revisión se agregó a la preparación Hidróxido de potasio (KOH) al 40% lo cual ayudó a clarificar la muestra y detectar fácilmente la presencia de estructuras levaduriformes en los casos positivos, siendo este el primer indicio de que la infección se encuentra activa. (Hanon, 2012)

Los resultados indicaron que la candidosis vaginal tiene mayor frecuencia en pacientes embarazadas y en edad reproductiva, entre 25 y 34 años de edad que es la etapa en la que la mujer se encuentra expuesta a más factores de riesgo para adquirir la infección; sin embargo influyó también el estado de salud de las pacientes

y hubo mayor frecuencia en pacientes con diabetes, obesidad y VIH ya que el género *Candida* se incluye dentro de los hongos oportunistas afectando principalmente a pacientes inmunocomprometidas, siendo *Candida albicans* el principal agente etiológico de la infección, seguido de *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* respectivamente.

Fue de gran utilidad el uso del sistema automatizado Vitek 2 compact para confirmar género y especie, así como panel de sensibilidad a antifúngicos donde se determinó que el 96% de ellas resultaron sensibles y el 4% restante resistentes a pesar de que no se probaron todos los antifúngicos de uso común ya que se recomienda reservarlos para casos de recidivas frecuentes, fallas terapéuticas o cuando el médico tratante lo solicite.

La mayoría de los casos de candidosis vaginal no llegan a complicaciones mayores, pero si es frecuente la resistencia a los tratamientos comunes, esto se debe principalmente al uso indebido de estos medicamentos que son de venta libre y administrados de forma empírica, por lo que es importante confirmar el diagnóstico en el laboratorio. En este trabajo de investigación, los antifúngicos con mayor relevancia en el tratamiento de la infección fueron clotrimazol, isoconazol, ketoconazol, fluconazol, nistatina e itraconazol respectivamente.

Es importante la detección correcta de candidosis vaginal porque en México existe un aumento en los casos de mujeres con esta infección, sobre todo en pacientes embarazadas, lo cual implica un riesgo mayor para la población afectada y un reto para las instituciones de salud ya que no hay estudios reelevantes que generalicen el tema a nivel nacional donde se exponga la situación epidemiológica actual, protocolos para mejorar las técnicas de diagnóstico y la importancia de administrar el tratamiento adecuado para cada situación. Por estas razones, en el presente trabajo se exponen dichos aspectos para una población en particular, pero cuyos resultados obtenidos son útiles para próximas investigaciones y para conocer aspectos importantes que deben tomarse en cuenta para la detección de candidosis vaginal.

2.- Introducción

Las infecciones vaginales por hongos levaduriformes del género *Candida* representan la causa de millones de consultas médicas por año, haciendo de los antimicóticos de venta libre contra estas infecciones de los medicamentos con mayor demanda en los últimos años. *Candida albicans* es la especie más frecuente y causa del 85 al 90% de los casos, mientras que las infecciones por otras especies como *Candida glabrata* suelen ser más resistentes a los antimicóticos por lo que producen infecciones crónicas y recurrentes. (Tortora, Funke & Case, 2013)

Debido a que la candidosis vaginal recurrente tiende al incremento, durante la práctica clínica se ha convertido en un desafío llegar al diagnóstico correcto y manejo de la misma para los profesionales de la salud, por lo que las instituciones se han dado a la tarea de innovar o ensayar con nuevos protocolos terapéuticos y enfocados a obtener un resultado confiable. (Hanon, 2012)

El contenido de este trabajo comprende los criterios diagnósticos que se evaluaron dentro del laboratorio de Microbiología y Parasitología para la detección de candidosis vaginal en mujeres atendidas por el Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes (INPer) ubicado en Montes Urales N°800, Lomas Virreyes en la Ciudad de México y cuya misión es coadyuvar en la mejora de la calidad de vida y salud de la población mediante el desarrollo de líneas de investigación y la formación de recursos humanos en el ámbito de la salud reproductiva y perinatal, apoyados en el otorgamiento de una atención integral, oportuna, eficaz y de calidad dentro del marco de las políticas nacionales de salud.

La recolección de muestras comprendió varios meses, comenzando en octubre de 2016 y culminando en enero de 2017, ya que en el laboratorio se realizó diariamente el procesamiento de todas las muestras de exudado cervicovaginal tanto de consulta externa como de pacientes hospitalizadas hasta alcanzar 200 muestras positivas a candidosis vaginal, el cual fue un número representativo para el análisis de datos y óptimo en cuanto a los recursos del laboratorio. La revisión diaria de las muestras tuvo como objetivo obtener un diagnóstico preciso que benefició tanto a

médicos como a pacientes y por supuesto contribuyó a la mejora continua del Laboratorio de Microbiología y Parasitología.

Se logró la detección a tiempo y sobre todo correcta de candidosis vaginal en mujeres tanto embarazadas como no embarazadas que son pacientes del INPer. Esto a través de evaluar cada uno de los pasos a seguir durante las técnicas utilizadas para su diagnóstico como lo fueron: examen en fresco, tinción de Gram y siembra de las muestras en medios de cultivo; cada una de ellas se realizó de la forma cotidiana por el laboratorio, sin embargo se aplicaron criterios basados en los diversos fundamentos consultados y los cuales apoyaron de manera significativa al diagnóstico con la ventaja de que se modificaron ligeramente las técnicas habituales.

La candidosis vaginal es una infección común, por la que la mayoría de las mujeres han pasado, sin embargo, no por eso toma menos fuerza a nivel clínico ya que esta puede complicarse o traer consecuencias graves en las pacientes susceptibles, sobre todo tomando en cuenta el tipo de pacientes atendidas en el INPer, las cuales en su mayoría se encuentran embarazadas y además con algún otro tipo de inmunosupresión o padecimiento que las pone en riesgo ante cualquier infección y es ahí donde la detección de candidosis cobra la importancia que se le debe dar.

De esta manera, aun cuando no existen signos y síntomas clínicos característicos de la infección debe realizarse la determinación diagnóstica en el laboratorio para descartar o confirmar la candidosis. Así, la primera prueba a realizar es el examen en fresco que ayuda a determinar si la infección se encuentra activa. (Hanon, 2012)

La tinción de Gram sirvió de apoyo al examen en fresco ya que se pudieron observar microscópicamente las mismas estructuras levaduriformes en el caso de muestras positivas, donde se habla de infección cuando el número de levaduras supera cuatro por campo o/y hay presencia de pseudohifas o pseudomicelios, así como otros criterios que comprueban las sospechas de que la infección está presente, como lo son aumento de leucocitos y descenso de lactobacilos de biota habitual.

A pesar de que los criterios ya mencionados son básicos para establecer el diagnóstico de candidosis vaginal, este no debe ser confirmado hasta obtener un desarrollo significativo de colonias pertenecientes al género *Candida* sobre los medios de cultivo necesarios para confirmar o descartar su presencia. Básicamente los medios utilizados permiten el aislamiento de las levaduras, sin embargo durante esta investigación se agregó una placa de cromoagar orientador para levaduras, cuyo uso no se había implementado de manera frecuente en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del INPer pero incluirlo en el procesamiento de muestras de exudado cervicovaginal fue de gran apoyo para orientar hacia el género y especie de la levadura que actuó como agente patógeno en cada caso ya que su fundamento se basa en el uso de compuestos cromogénicos que son utilizados como sustratos por enzimas propias de cada especie, liberando así una coloración diferente que se aprecia sobre las colonias a partir de las primeras 24 horas. (Hanon, 2012)

Un buen diagnóstico y entregado a tiempo es de suma importancia para las decisiones médicas que se toman día con día, por lo que el uso de nuevos métodos diagnósticos va a alza, sin embargo dentro de las instituciones de salud muchas veces se cuenta solo con los recursos mínimos necesarios para abastecer la gran demanda de pacientes, por lo que la optimización de recursos e innovación por parte de los profesionales de la salud es una parte importante para mantener una buena calidad en los procesos realizados por el laboratorio. (Pineda, Cortes, Uribarren, & Castañón, 2017)

Las levaduras del género *Candida* causan enfermedades en los humanos, las cuales son muy diversas en cuanto al sitio anatómico afectado ya que abarcan desde infecciones superficiales no graves, hasta sistémicas e incluso mortales. En este caso, la candidosis vaginal es una infección no considerada como incapacitante pero suele causar síntomas molestos que alteran la conducta y hábitos diarios de las pacientes que si no son tratadas a tiempo pueden persistir o incluso desaparecer pero provocar un daño mayor a largo plazo. Actualmente en México, dicha infección se considera la única micosis de reporte obligatorio ante las autoridades sanitarias

debido al incremento en los casos, sobre todo en mujeres inmunocomprometidas para las cuales existe un riesgo mayor de recidivas y complicaciones; esta es una de las razones por las cuales se efectuó el presente trabajo en el cual la revisión de libros y artículos fue relacionada a los datos obtenidos durante la práctica para dar a conocer aspectos importantes sobre la infección vaginal causada por *Candida* spp. ofreciendo información útil acerca de la frecuencia presentada por esta infección en las pacientes del Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes. (Pineda *et al.*, 2017)

Uno de los objetivos de revisar minuciosamente cada una de las muestras de exudado cervicovaginal es estudiar los aspectos a considerar, así como dificultades que se dan día a día al aplicar los diferentes métodos diagnósticos y tomando en cuenta que el laboratorio es la base para que el médico aplique el tratamiento adecuado, por lo que simultáneamente a la identificación de género y especie, también se realizó el panel de sensibilidad a fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina, anfotericina B y flucitocina por el método automatizado del sistema Vitek 2 compact, esto se efectuó para cada una de las muestras positivas a candidosis vaginal, lo cual arroja datos de utilidad para conocer la situación de esta micosis en México. (Pineda *et al.*, 2017)

Los resultados obtenidos demuestran que *C. albicans* sigue prevaleciendo como el principal agente etiológico en infecciones vaginales abarcando un 73% de los casos estudiados en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del Instituto Nacional de Perinatología, siguiéndole en frecuencia *C. glabrata* con un 25%, *C. krusei* con 1.5% y en menos cantidad de casos *C. parasilopsis* en 0.5%. En gran medida estos datos se deben a que *C. albicans* es una levadura que forma parte de la flora normal de la vagina y en pequeñas cantidades logra una interacción equilibrada con la mayor cantidad de lactobacilos que existen en la vagina. Sin embargo, cuando ese equilibrio se rompe como ocurre durante el tratamiento antibacteriano intensivo, *C. albicans* se multiplica sin restricción, causa respuesta inflamatoria y se pueden presentar los síntomas; por lo tanto, las infecciones causadas por la especie suelen ser el resultado de sobrecrecimiento del microorganismo cuando se suprime la

microflora competitiva con antibióticos u otros factores. (Nester, 2007; Tortora *et al.*, 2013)

Las especies diferentes a *C. albicans* suelen aparecer como agente etiológico de la infección en mujeres inmunocomprometidas donde el microorganismo al ser un hongo oportunista encuentra en el ambiente vaginal las condiciones óptimas para desarrollarse y aprovechar el mal estado de la paciente; sin embargo en la mayoría de los casos la inoculación es accidental, es decir a través de instrumentos ginecológicos, manos de médicos y enfermeras o algún otro material que haya estado en contacto con el microorganismo. Desafortunadamente en México son muy pocos los casos en los que se efectúa la identificación de la especie involucrada y por lo tanto es difícil darle a la candidosis vaginal la importancia epidemiológica que debería porque el conocer la especie causante de la infección y darle un seguimiento es la base para investigar las causas de la infección, los factores que aumentan el riesgo de contagio y determinar si la enfermedad es prevenible o controlable sobre todo en las especies menos frecuentes. (Pineda *et al.*, 2017)

Entre los factores que pueden explicar la mayor frecuencia de estas infecciones se incluyen principalmente el aborto, el aumento de las exploraciones diagnósticas ginecoobstétricas y de las intervenciones quirúrgicas vaginales porque es en todos estos procedimientos donde se puede alterar la biota habitual del aparato reproductor femenino en forma significativa y además existe el riesgo de introducir gérmenes patógenos externos. También existen otros factores que predisponen a la mujer a contraer la infección, tales como el uso de dispositivos intrauterinos, duchas vaginales, uso tópico vaginal o sistémico de antibióticos debido a la eliminación de bacterias vaginales comensales en mujeres previamente colonizadas, la conducta sexual promiscua y sin protección, tratamientos hormonales, estrés crónico y depresión del sistema inmunológico el cual se da ante un embarazo o enfermedades como diabetes mellitus y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. (Mondejal, 2010)

Además de los factores ya mencionados, se han reportado casos que indican múltiples factores que predisponen a la mujer a adquirir la infección, la resistencia

a la insulina y dietas con alto contenido de carbohidratos, la distancia ano-vaginal corta, la higiene vaginal con jabones perfumados, baño de burbujas, depilación genital, historia previa de vaginitis bacteriana, uso de toallas y tampones durante el periodo menstrual, dermatosis de vulva, terapia de reemplazo hormonal y uso de corticoterapia prolongada se deben considerar factores de riesgo para que se presente recurrencia de candidosis vaginal. (Pineda *et al.*, 2017)

La candidosis vaginal es una infección muy común que según diversos estudios afecta al menos al 50% de las mujeres una vez en su vida y en la mayoría de los casos existe un segundo episodio después del primer cuadro clínico. A pesar de que esta información se encuentra disponible y es ampliamente difundida, en México no existen estudios representativos de la frecuencia de la colonización vaginal por el género *Candida* en la población general porque no se le ha dado la importancia debida a pesar de que el aumento en los casos es reflejado en las diversas investigaciones realizadas por las instituciones de salud que de manera particular contribuyen con datos recientes y de importancia acerca del tema enfocando sus objetivos en diversas ramas del ámbito clínico, epidemiológico y diagnóstico como es el caso de este estudio donde su realización brinda apoyo principalmente a los químicos y demás profesionales involucrados en el diagnóstico microbiológico haciendo uso de las técnicas aquí mencionadas y obteniendo resultados parecidos a los reportados, lo cual beneficia principalmente a las pacientes ya que es una contribución más al largo camino que falta por recorrer en cuanto a la investigación del tema, que se ha convertido en un problema de salud pública en México.. (Solís *et al.*, 2014)

Debido a que la candidosis no siempre tiene el carácter de infección de transmisión sexual, resulta muy difícil distinguir dichas infecciones entre sí solo basándose en la sintomatología de la paciente; por lo tanto, en estos casos es absolutamente necesario fundamentarse en la exploración y el estudio microbiológico para establecer el diagnóstico, sobre todo cuando se trata de mujeres embarazadas ya que a pesar de la elevada prevalencia de vaginitis por *Candida* en sus diversas especies, en las mujeres embarazadas las complicaciones son de baja frecuencia; sin embargo, debe tomarse el problema con responsabilidad dado que en los casos

donde la mujer experimenta parto natural puede transmitirse la infección al neonato y progresar a una enfermedad sistémica, particularmente si es un bebé prematuro. (Jasso, 2011; Perea, 2010)

Un obstáculo común para la detección de candidosis vaginal es que todas las infecciones del aparato genital femenino presentan una sintomatología que puede ser común, como disuria, polaquiuria, prurito vulvar, dispareunia y leucorrea; sin embargo, solo la mitad de las mujeres tienen sintomatología característica de infección vaginal por *Candida* spp., la cual se caracteriza por la existencia de flujo abundante blanquecino o amarillento y con grumos, acompañado de prurito intenso e inflamación que en casos extremos llega a provocar fisuras vulvares o vaginales. Entonces, ante una mujer con sintomatología de infección del tracto urogenital inferior se debe diferenciar si existe cistitis, uretritis, vaginitis o cervicitis ya que el conocer la etiología precisa de la enfermedad permite establecer un tratamiento adecuado el cual debe ser apto para la condición de cada paciente. (Perea, 2010)

Las manifestaciones de la candidosis vaginal van desde la colonización asintomática hasta la sintomatología severa, por lo tanto la presentación de la enfermedad se clasifica en complicada o no complicada. La primera es grave y puede estar producida por especies diferentes a *C. albicans*, comúnmente ocurre en mujeres diabéticas no controladas, inmunodeprimidas y embarazadas; se puede encontrar como severa cuando en la exploración se observan eritemas, edemas o fisuras, siendo también recurrente cuando ha habido 4 o más episodios de candidosis en un periodo de un año. Mientras que la no complicada es episódica y se presenta en mujeres previamente sanas con sintomatología de leve a moderada y sin antecedentes de síntomas frecuentes. (Díaz, *et al.*, 2010; Hanon, 2012)

La candidosis vaginal aguda es la presentación clínica más usual y se caracteriza porque la paciente refiere prurito, dolor vaginal, ardor, dispareunia, disuria y olor levemente desagradable en la zona; es en estos casos donde en la exploración física se detectan fisuras, lesiones, placas amarillentas o blanquecinas en las paredes de la vagina y cuello uterino y descarga vaginal abundante que varía de acuosa a grumosa y espesa. El problema de los episodios agudos de candidosis vaginal radica en que la mayoría son auto medicados con antimicóticos comunes

comercialmente o manejados empíricamente por los médicos basándose en signos y síntomas pero sin la obtención muestra que confirme el agente etiológico de la infección a través de cultivos, lo cual repercute indudablemente en las pacientes ya que dichos factores favorecen a la aparición de candidosis vaginal recurrente donde se pueden llegar a presentar hasta cuatro episodios al año y es entonces cuando se vuelve una infección crónica mal tratada que al momento de diagnosticarse suele mostrar resistencia a antifúngicos o incluso presencia de infecciones mixtas, lo cual hacen un caso más difícil de tratar. (Pineda *et al.*, 2017)

Para establecer el diagnóstico, primeramente se requiere una exploración médica cuidadosa y posteriormente un estudio de la secreción obtenida a partir del exudado cervicovaginal que comprende: examen microscópico en fresco, prueba de las aminas (opcional, ya que normalmente se realiza cuando se sospecha de vaginosis bacteriana), tinción de Gram y cultivo microbiológico, así como una técnica de identificación para el agente etiológico en las muestras positivas. (Perea, 2010)

La recuperación de la levadura en agar dextrosa Sabouraud (SDA), sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico porque es la evidencia clara de que el microorganismo se encuentra presente en la muestra trabajada, aunque el crecimiento de las levaduras también puede ser obtenido en agar papa dextrosa, agar sangre o agar chocolate; en esos medios *Candida* spp. forma colonias de hasta 5 mm de diámetro, con poca elevación, bordes continuos, textura suave y cremosa con una coloración que va de blanco al amarillo claro, además algunos laboratorios cuentan con medios de cultivo adicionales como los cromógenos que pueden identificar desde el primer cultivo de la muestra algunas especies de *Candida*. Mientras que microscópicamente las levaduras se observan ligeramente redondas u ovals, como células únicas o en gemación ya sea única o múltiple y en múltiples ocasiones cuando la infección se encuentra activa se aprecian formando pseudohifas y pseudomicelio. (Pineda *et al.*, 2017)

Candida spp. son levaduras alargadas u ovaladas que miden de dos a seis micrómetros de ancho por tres a siete micrómetros de largo, las cuales se reproducen de forma asexual por gemación a través de blastoconidios, excepto *C. glabrata*, pero el resto de las especies asociadas a candidosis pueden formar

pseudomicelios debido a que se desarrollan de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura normalmente a 37°C en el huésped y como hongo de aspecto filamentoso a 25°C en la naturaleza; dicho dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped. El género *Candida* se comporta como biota saprofita, conviviendo en simbiosis con el huésped; mientras que en forma de hongo filamentoso las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia pseudohifas o pseudomicelio comportándose así como un parásito patógeno que produce síntomas en el huésped. (Linares & Solís, 2007; Madigan *et al.*, 2015)

Para asignar el tratamiento adecuado es importante tomar en cuenta que *C. glabrata* es conocida por su resistencia natural a los antimicóticos azólicos, mientras que cepas de otras especies como *C. albicans*, *C. krusei* o *C. parapsilosis*, muestran variabilidad ante los azólicos. Las especies diferentes a *C. albicans* son las que suelen asociarse a recidivas y resistencia al tratamiento debido al aumento en su frecuencia, la cual se asocia principalmente a tratamientos empíricos con dosis única, dosis bajas de azoles y abuso en el uso de antimicóticos profilácticos. (Pineda *et al.*, 2017)

El tratamiento intravaginal con antimicóticos como nistatina o clotrimazol es común y eficaz pero cuando se requiere de un tratamiento alternativo se considera una sola dosis de fluconazol oral u otro antimicótico de tipo azol pero la literatura refiere que algunas pacientes son susceptibles a presentar efectos colaterales molestos y se ha descrito interacción con otros medicamentos. (Nester, 2007; Tortora *et al.*, 2013)

Optimizar la atención de la salud para prevenir y tratar a las mujeres con infección vaginal es un paso necesario en todas las instituciones comprometidas al mantenimiento de la salud y como profesionales en el área es importante tomar medidas preventivas para evitar casos de enfermedad nosocomial y en la población en general el contagio por transmisión endógena, ya sea por contacto a través de la piel, las mucosas o por inoculación accidental. (Jasso, 2011; Linares & Solís, 2007)

Las infecciones del aparato genital femenino, además de los problemas físicos y emocionales que ocasionan en las pacientes, constituyen una pérdida económica de proporciones apreciables al sistema de salud, tanto en las mujeres de países industrializados como en la población femenina de países en vías de desarrollo. (León *et al.*, 2014; Mondejal, Martínez & Limia, 2010)

3.- Objetivo general

Evaluar el procesamiento de muestras obtenidas a partir de exudados cervicovaginales para el diagnóstico de candidosis vaginal en mujeres embarazadas y no embarazadas para determinar la importancia de cada técnica utilizada y mejorar el diagnóstico de esta patología.

4.- Objetivos particulares

- Obtener diferentes muestras de exudado cervicovaginal a partir de la técnica establecida para la toma de muestra en el Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes, con el fin de procesarlas y seleccionar 200 de ellas con un resultado positivo a candidosis vaginal.
- Realizar el diagnóstico de levaduras del género *Candida* como agente etiológico de proceso infeccioso, a partir de muestras de exudados cervicovaginales mediante el examen en fresco, tinción de Gram, cultivo positivo e identificación del microorganismo por técnica automatizada para conocer la frecuencia de las distintas especies de *Candida*.
- Identificar género y especie de la levadura responsable de candidosis vaginal, así como su perfil de susceptibilidad a antifúngicos en las 200 muestras positivas, a partir del sistema automatizado Vitek 2 compact con el fin de confirmar el resultado a tiempo.
- Establecer los criterios útiles para cada técnica realizada en el procesamiento de las muestras haciendo uso de nuevos recursos para seguir un método de diagnóstico en general para la detección de candidosis vaginal dentro del laboratorio de Microbiología y Parasitología del Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes.

5.- Marco teórico

5.1.- Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares, no filamentosos que varían en cuanto a su tamaño, ya que este va de uno a cinco micrómetros de ancho y entre cinco y treinta de largo. Además cada especie tiene una forma característica que aún en cultivo puro entre las células individuales existe una considerable variación de tamaño y forma que suele ser redondeada, elipsoidal o cilíndrica; estas características morfológicas se ven afectadas por la edad y el entorno. Las levaduras no poseen flagelos ni ningún otro tipo de órgano de locomoción, por lo que no son capaces de moverse. (Montoya, 2008)

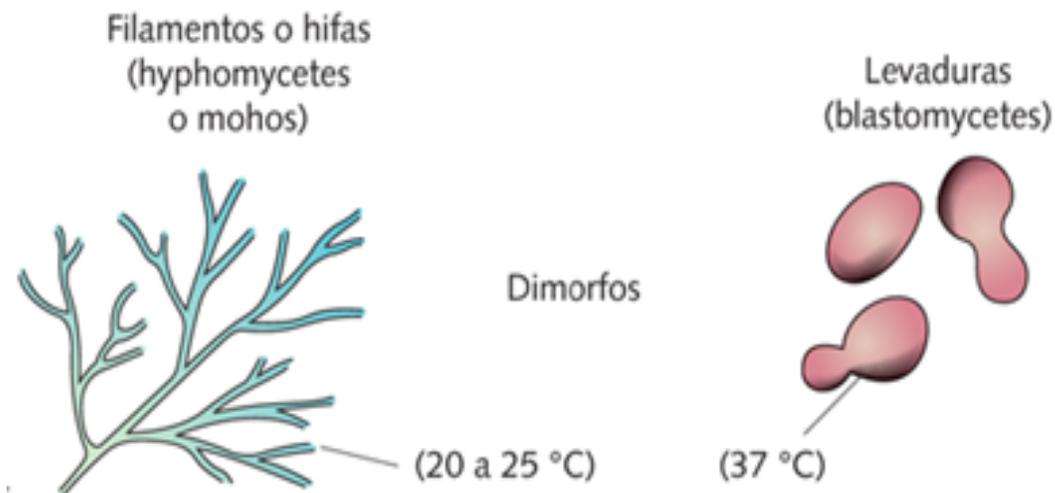


Figura 1.- Dimorfismo en levaduras.

Las levaduras son hongos dimórficos, que dependiendo de la temperatura del entorno en el cual se encuentren varían en cuanto a su forma la cual es micelial o filamentososa a temperatura ambiente y suele proliferar en su estado levaduriforme cuando es alojada en tejidos. (Arenas, 2011). Tomado del sitio web: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1448§ionid=96273214&jumpsectionID=96273231#1115453007> el día 24 de julio de 2018.

Se reproducen por un proceso llamado gemación, el cual es simple, ya que los brotes o yemas que se producen en la superficie externa de la célula madre crecen hasta separarse y formar una nueva célula, sin embargo, algunas levaduras pueden filamentosar porque producen brotes que no pueden separarse y se van alargando hasta formar una cadena corta de células llamada pseudohifa, al proliferar las pseudohifas toman el nombre de pseudomicelio. Esta fase filamentosa es una propiedad necesaria para la patogenicidad de las levaduras, como es el caso de *C.albicans* que se adhiere a las células epiteliales humanas como una levadura pero suele requerir la formación de pseudohifas para invadir los tejidos profundos y causar infecciones en la cavidad bucal, vagina, pulmones e incluso daño sistémico tisular en pacientes inmunocomprometidos. (Montoya, 2008; Tortora, Funke & Case, 2007)

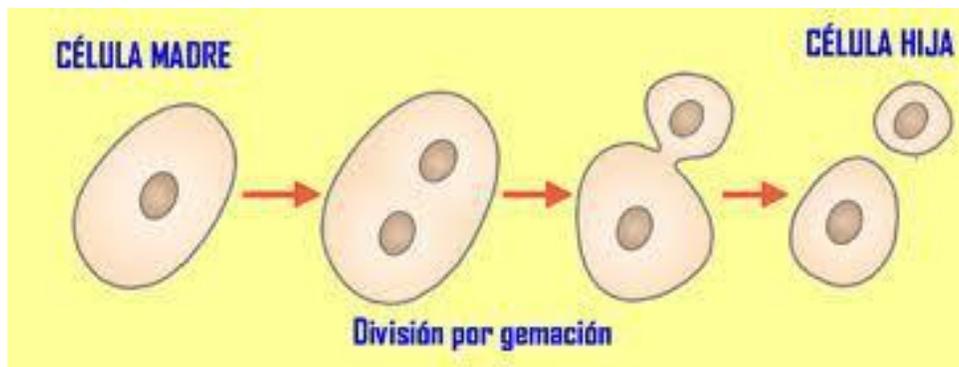


Figura 2.- Reproducción asexual de las levaduras.

Las levaduras se reproducen normalmente por gemación donde la célula madre forma un brote en su superficie externa hasta dividir el núcleo, entonces el material de la pared celular se deposita entre el brote y la célula madre dividiéndose en dos. A través de este proceso la célula de una levadura puede formar hasta 24 células hijas. Tomado del sitio web: https://www.google.com/search?q=levaduras+gemacion&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=2ahUKEwixlb792t7cAhXD-KQKHbb4BsoQsAR6BAgDEAE&biw=1280&bih=891#imgrc=eaizwi99LE_IWM: el día 15 de julio de 2018.

5.1.1.- Clasificación taxonómica de las levaduras:

Dominio: *Eucarya*

Reino: *Fungi*

División: *Eumycota*

Subdivisión: *Deuteromycota*

Clase: *Blastomycetes*

Familia: *Cryptococcaceae*

Género: *Candida*

Especies: *C. albicans*; *C. glabrata*; *C. krusei*; *C.parapsilosis*; *C. tropicalis*, etc.
(Biasoli, 2013)

5.1.2.- Levaduras del género *Candida*

En las últimas décadas se ha producido un notable incremento en la patología infecciosa de etiología fúngica, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, aquellos que recibieron trasplantes de órganos sólidos o componentes hematopoyéticos, pacientes con VIH, diabetes u otras enfermedades crónicas, así como pacientes hospitalizados en situación crítica. (Unda, Agüero, Fariñas & Martínez, 2011)

El género *Candida* pertenece a la familia *Cryptococcaceae* dentro de la subdivisión *Deuteromycota* (hongos imperfectos), el cual está compuesto por más de 200 especies diferentes, de las cuales muchas forman parte de nuestra flora normal en piel, tracto gastrointestinal, genitourinario y respiratorio pero aproximadamente el diez por ciento de éstas se relaciona con enfermedades infecciosas ya que debido a su amplia distribución, puede originar infecciones que varían en cuanto a su localización y gravedad por lo que las levaduras de este género se consideran microorganismos patógenos oportunistas debido a que se asocian a factores

predisponentes del huésped. Las manifestaciones clínicas más frecuentes asociadas a *Candida spp.* son la candidiasis superficial, estomatitis crónica, candidiasis mucocutánea, vulvovaginitis y con menor frecuencia cuadros más graves con manifestaciones invasoras en pacientes críticos o inmunodeprimidos, tales como la candidosis diseminada, candidemia, endoftalmitis y peritonitis. (Castro & Martin, 2007)

5.1.3.- *Candida albicans*

C.albicans es la especie más estudiada dentro del género, debido a que es considerado un microorganismo muy versátil, esto por su capacidad para sobrevivir como comensal en varios sitios anatómicamente distintos como son piel, intestino, cavidad oral y vagina; sin embargo puede causar enfermedad en estos sitios cuando se le presenta la oportunidad. *C.albicans* cuenta con varios mecanismos de virulencia para colonizar el huésped y ocasionar daño de forma directa al evadir los mecanismos de defensa de este, dependiendo del sitio de afección y la condición del paciente. (Castrillón, Rivera, & Padilla, 2005)

Los factores que contribuyen a la patogénesis de *C. albicans* incluyen la morfogénesis, en la cual las células levaduriformes sufren una transición a las formas de crecimiento filamentosas, las enzimas secretadas aspartil proteasas y fosfolipasas, así como las biomoléculas de reconocimiento del huésped llamadas adhesinas que le permiten iniciar el proceso de formación de biopelículas. Además de lo ya mencionado, es de suma importancia recalcar que para provocar una infección también influye el cambio de fenotipo y las alteraciones en la expresión de antígenos, así como la afinidad de *C.albicans* a los diferentes tejidos. (Castrillón *et al.*, 2005)

A pesar de que las levaduras del género *Candida* constituyen la principal causa de infecciones fúngicas invasoras en pacientes hospitalizados, diversos estudios señalan un cambio en la etiología de estas infecciones nosocomiales ya que existe una disminución de *C.albicans* como microorganismo asociado y se ha expresado un considerable aumento del resto de las especies como agente etiológico en las

diferentes infecciones. (Ochiuzzia, Cataldib, Guelfandb, Maldonadob & Arechavalab, 2014)

5.1.4.- *Candida glabrata*

Candida glabrata, al igual que las otras especies del género *Candida* pertenece a la subdivisión *Deuteromycota*, familia *Cryptococcaceae*. Con la creación del género *Torulopsis*, distinto de *Candida*, fue incluida ahí porque *Torulopsis* no presenta blastoconidios capaces de formar pseudomicelio o hifas verdaderas, ni en los tejidos que parasita ni en los cultivos, tal como sucede con *Candida glabrata*; sin embargo, actualmente estas características se consideran insuficientes para efectuar una distinción en dos géneros por lo que en algunas bibliografías siguen considerándose como sinónimos. (Torres, Morera & López, 2005)

Debido a la ausencia de algunos factores de virulencia, principalmente la producción de pseudohifas que son consideradas estructuras que incrementan la adherencia y penetración del hongo en los tejidos, se podría considerar que *C. glabrata* es menos virulenta que otras especies como *C. albicans* o *C. tropicalis*, pero se ha comprobado que esto es cierto solo cuando se utilizan modelos experimentales en animales de laboratorio ya que en los últimos años existen evidencias que han demostrado una rápida diseminación de las infecciones por *C. glabrata* en los pacientes inmunodeprimidos donde generalmente se produce una elevada tasa de mortalidad. (Torres *et al.*, 2005)

A pesar de que el conocimiento de los marcadores de virulencia en esta especie es aún insuficiente, algunas investigaciones han demostrado que *C. glabrata* produce proteinasas y que la hidrofobicidad de su superficie celular es similar a la de *C. albicans*, por lo que asegura de esta manera su capacidad de adherencia a las células del huésped; además el cambio en el fenotipo de las colonias, muy estudiado en *C. albicans*, también puede producirse en *C. glabrata*. (Torres *et al.*, 2005)

En cuanto al huésped, algunas alteraciones que contribuyen al desarrollo de las infecciones por esta especie son la disminución en los niveles de IgA secretora

vaginal, una menor respuesta inflamatoria y principalmente una disminución cuantitativa o cualitativa de los linfocitos T, esto explica su mayor frecuencia en los pacientes inmunocomprometidos, siendo aislado en 25% de las muestras de estómago y hasta un 30 % en las de origen ginecológico. (Torres *et al.*, 2005)

Las infecciones por *Candida spp.* han aumentado su incidencia en las tres últimas décadas, de las cuales *C. glabrata* se aísla cada vez con mayor frecuencia de muestras clínicas como agente de candidosis vaginal, correspondiendo así a la especie cultivada con mayor frecuencia después de *C. albicans* y a la vez es considerada patógeno nosocomial en pacientes inmunocomprometidos. (Torres *et al.*, 2005)

Candida glabrata crece con facilidad a 37 °C en el medio de agar dextrosa Sabouraud, en dicho medio origina entre 24 y 48 horas unas colonias lisas, no adherentes, de color blanco y consistencia cremosa, más o menos brillantes e indiferenciables de la mayoría de otras especies de levaduras del mismo género, por lo que en medios cromogénicos, como el cromoagar orientador se distinguen por ser colonias de color lila a púrpura. Para confirmar su identificación, se utilizan los mismos métodos que para otras levaduras del género *Candida*, así como los resultados negativos en cuanto a la presencia de pseudohifas. (Torres *et al.*, 2005)

En cuanto a la resistencia a antifúngicos, la de *C. glabrata* se basa principalmente en dos situaciones, una de ellas es la ausencia de una respuesta clínica a las dosis terapéuticas del fármaco donde la falta de respuesta terapéutica suele estar asociada al estado de inmunodepresión del enfermo o a una biodisponibilidad insuficiente del fármaco, y la otra es la presencia de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) elevadas para el antifúngico. (Torres *et al.*, 2005)

C. glabrata es generalmente sensible a los derivados poliénicos, nistatina y anfotericina B; sin embargo, desde la comercialización y el uso intensivo del fluconazol e itraconazol se han descrito casos de resistencias in vitro a estos azoles y de falta de respuesta en enfermos con VIH, pero se ha podido demostrar que en el caso de esta especie, la resistencia a los azoles se debe a un incremento en la

síntesis del ergosterol dependiente del citocromo P-450 y la existencia de una bomba de flujo activa para el fluconazol. (Torres et al., 2005)

5.1.5.- *Candida krusei*

C. krusei es un patógeno emergente en los últimos años porque se ha encontrado como responsable de cuadros graves en pacientes inmunodeprimidos y sobre todo con una elevada tasa de mortalidad donde igualmente se cree que el motivo fundamental para su elevada prevalencia en estos enfermos es la selección de antifúngicos para combatirla y principalmente el uso extendido de fluconazol como profiláctico. (Sanz, García, González & Girón del Río, 2015).

En el examen microbiológico se caracteriza por ser una levadura capaz de formar pseudohifas sin tubo germinal y con actividad ureasa-ausente, además es capaz de crecer en medios hasta a 42°C, siendo esto lo que la diferencia de otras especies de *Candida*. Por otro lado, en lo que al tratamiento respecta, el voriconazol o la anfotericina B suelen ser hasta el momento efectivas para la infección diseminada por esta especie. (Sanz et al., 2015)

En cuanto a la infección vaginal por *C. krusei*, esta surgió como una causa verdadera pero infrecuente de candidosis ya que hasta la fecha la incidencia anual estimada de candidosis vaginal por *C. krusei* es de tan solo en uno por ciento con respecto a todas las candidosis reportadas por otras especies del género. A pesar del sesgo de acumulación reconocido, todos los pacientes descritos en este informe presentaron síntomas crónicos y resistentes al tratamiento. (Singh et al, 2002)

Es importante recalcar que en pacientes con vaginosis fúngica crónica y recurrente, nunca se debe suponer que la especie de levadura responsable es siempre *C. albicans* a pesar de que los signos y síntomas de vaginosis por *C. krusei* parecen ser los mismos que se presentan cuando existe candidosis vaginal provocada por otras especies ya que partiendo del buen diagnóstico será tomada la decisión en cuanto al tratamiento. De esta manera, es de utilidad saber que en el momento de diferenciar esta especie en el laboratorio clínico, se debe tomar en cuenta que las células de *C. krusei* no tienen una forma tan ovalada, sino que son un tanto alargadas asemejándose a un grano de arroz; por otro lado, cuando presentan

pseudohifas o pseudomicelios, las células de *C. krusei* son también más alargadas con respecto a las otras especie de *Candida* y se unen a las células vecinas. Además *C. krusei* cuenta con una pared celular que se compone de seis capas con altas concentraciones del polisacárido alfa-D-manano que actúan como antígenos en la superficie celular y lo diferencian de otras especies de *Candida* que tienen diferentes tipos de mananos en sus paredes celulares; agregado a esto, la membrana celular de *C. krusei* es fuertemente hidrófoba, lo que permite una unión más fuerte a las superficies no polares en comparación con otros miembros del género *Candida*. (Singh *et al*, 2002)

5.1.6.- *Candida parapsilosis*

En los últimos años, esta especie ha emergido como agente importante de fungemia en varias regiones geográficas incluyendo a México. En el entorno clínico esta levadura oportunista se ha asociado con las infecciones nosocomiales, particularmente frecuente en infecciones sistémicas en neonatos prematuros de bajo peso, pacientes canalizados y personas bajo esquemas de hiperalimentación intravenosa ya que se ha encontrado en las manos y uñas de trabajadores del área de salud, como lo son médicos, enfermeras y laboratoristas porque forma parte de la biota normal en humanos pero como ya se sabe es un microorganismo comensal en el caso de individuos inmunocomprometidos. También se ha aislado de dispositivos médicos como catéteres y recientemente se le ha considerado como un importante patógeno emergente debido a su amplio espectro clínico de infecciones donde cabe recalcar que se incluyen las candidosis vaginales causadas por este género y a la cual nuevamente se le vinculó principalmente al uso indiscriminado de derivados azólicos. (Treviño, González, Garza., & González, 2012)

El papel de *C. parapsilosis* como un patógeno vaginal y su relevancia como agente causal de vaginosis normalmente es aún cuestionable debido a que se demostró su papel como levadura comensal, sin embargo, las cepas aisladas en exudados cervicovaginales se caracterizan por una mayor secreción de proteinasas aspárticas, lo cual conlleva una importante implicación clínica ya que estas enzimas pueden comprometer la integridad normal de la vagina porque hidrolizan a la

inmunoglobulina A contenida en la mucosa vaginal, siendo esta una de las barreras vaginales más efectivas contra las infecciones pero al verse afectada aumenta la susceptibilidad de la zona. (Treviño *et al*; 2012)

En cuanto a su diagnóstico diferencial, *C. parapsilosis* es una levadura morfológicamente caracterizada por células redondeadas que pueden ser un tanto ovaladas o ligeramente alargadas que producen pseudohifas; sin embargo al no ser estos parámetros suficientes para definirla hoy en día se utilizan métodos semi o automatizados para su correcta detección. (Treviño *et al*; 2012)

5.2.- Candidosis

Las candidosis son infecciones primarias o secundarias producidas por hongos del género *Candida* y sus diferentes especies, sumamente difundidas a lo largo del organismo afectado ya que son de origen endógeno, es decir, algunas de las especies del género tales como *C.albicans* y *C. parapsilosis* forman parte de la biota habitual en el caso del cuerpo humano pero al ser microorganismos oportunistas pueden causar daño principalmente en casos de pacientes inmunocomprometidos. (Negroni, 2009)

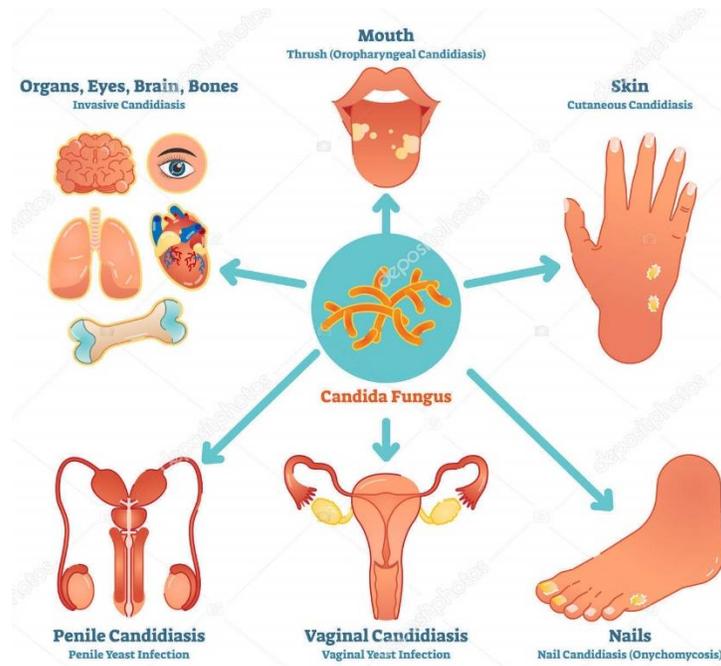


Figura 3.- Diagrama de micosis producidas por *Candida* en varias partes del cuerpo humano y los órganos.

La candidosis pueden asentarse en diversos órganos y tejidos, por lo que las manifestaciones clínicas suelen ser muy variadas dependiendo de su localización y evolución, ya sea aguda, subaguda o crónica. Tomado del sitio [web: https://www.google.com/search?biw=1280&bih=891&tbm=isch&sa=1&ei=x5ZrW7XhNYOmwQLxj4GQCg&q=tipos+de+candidiasis&oq=tipos+de+candidiasis&gs_l=img.3..0i67k1j0l3j0i30k1l5j0i8i30k1.41157.51906.0.52094.43.29.10.1.2.0.342.4351.0j11j7j2.20.0....0...1c.1.64.img..12.31.4375...0i10k1j0i5i30k1j0i10i24k1.0.BSWpovj8Zno#imgrc=KxqoSANaEP1Z7M: el día 1 de agosto de 2018.](https://www.google.com/search?biw=1280&bih=891&tbm=isch&sa=1&ei=x5ZrW7XhNYOmwQLxj4GQCg&q=tipos+de+candidiasis&oq=tipos+de+candidiasis&gs_l=img.3..0i67k1j0l3j0i30k1l5j0i8i30k1.41157.51906.0.52094.43.29.10.1.2.0.342.4351.0j11j7j2.20.0....0...1c.1.64.img..12.31.4375...0i10k1j0i5i30k1j0i10i24k1.0.BSWpovj8Zno#imgrc=KxqoSANaEP1Z7M: el día 1 de agosto de 2018.)

5.2.1.- Candidosis vaginal

La candidosis vaginal es una infección ginecológica causada por la acción patógena de levaduras del género *Candida*, el cual implica la inflamación del área vaginal frecuentemente en condiciones fisiológicas alteradas que determinan disminución de la inmunidad local acompañada de otros criterios clínicos útiles para su diagnóstico, como lo son: prurito, dolor, ardor, secreción blanquecina o amarillenta y grumosa la cual suele ser abundante y con olor fétido. Es una infección vaginal común debido a la gran cantidad de factores que influyen en su aparición, por lo que no se encuentra incluida entre las infecciones de transmisión sexual, sin embargo ataca principalmente a pacientes inmunocomprometidas ya que *Candida spp.* es un hongo oportunista. La candidosis vaginal es curable y tratada con medicamentos basados en atacar al hongo pero es de suma importancia detectarla correctamente y a tiempo porque a pesar de que en pocos casos ocurre, si puede llegar a complicarse y provocar severas lesiones o daño en las pacientes infectadas. (Guía de práctica clínica, 2008)

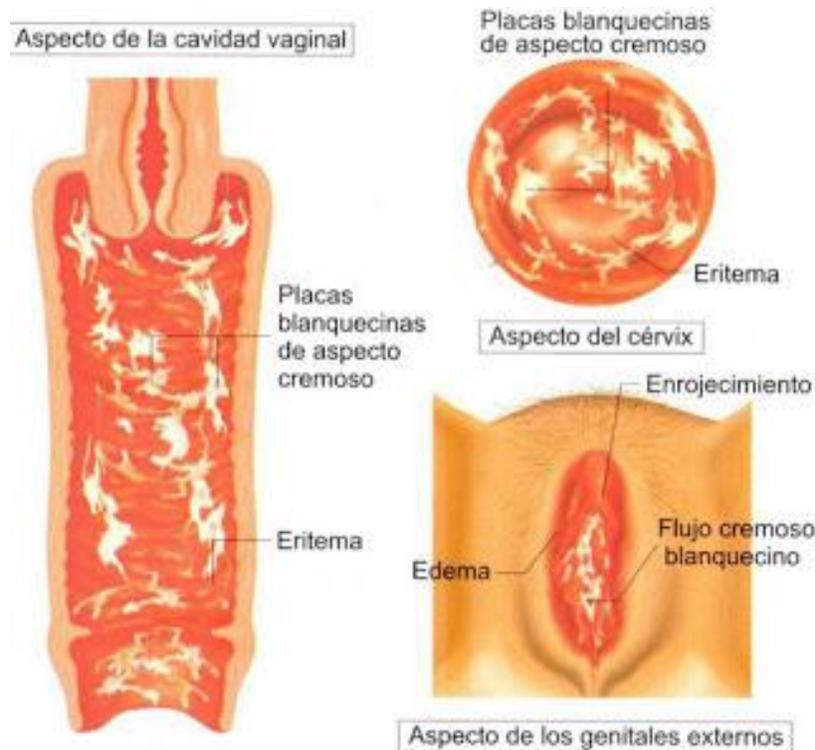


Figura 4.- Aspectos clínicos de utilidad para la detección de Candidosis vaginal.

Ante la sospecha de infección, se debe hacer una revisión de la zona genital, ya que es el indicio que conlleva al diagnóstico. Los signos importantes tanto a nivel externo como interno son edema, enrojecimiento y flujo blanquecino de aspecto grumoso, muchas veces acompañado de sintomatología que incluye prurito, ardor y dolor. Tomado del sitio web: <http://caduceodorado.blogspot.com/2016/06/candidiasis-vaginal.html> el día 4 de agosto de 2018.

5.2.2.- Candidosis vaginal en mujeres embarazadas

Este tipo de infecciones son más frecuentes en el embarazo debido a que en esa etapa el sistema inmune de la mujer se encuentra comprometido y además existe un considerable aumento en las concentraciones de hormonas como el estrógeno, lo cual se correlaciona con el aumento del glucógeno en el tejido vaginal, creando así un ambiente rico en carbono para el desarrollo de *Candida* spp. Se considera que en el embarazo la prevalencia de este microorganismo aumenta de acuerdo a las semanas de gestación y tiene su pico en el tercer trimestre debido a los cambios hormonales ya mencionados. La candidosis vaginal se ha asociado con un aumento

en el riesgo de corioamnioitis en el embarazo, con el síndrome de vestibulitis de vulva y parto prematuro, así como el riesgo de infección al neonato cuando este nace por parto natural pudiendo causar incluso candidemia en el recién nacido. (Pineda *et al*, 2017)



Figura 5.- Candidosis oral y lesiones vesiculares a nivel de tronco en recién nacidos.

Ciertos factores sistémicos en los neonatos, tales como sistema inmune debilitado, nacidos a pretermino o bajo peso al nacer pueden provocar una infección localizada o generalizada que puede llegar a ser sistémica y cuya causa pudiera presentarse al momento de pasar por el canal de parto si la madre presenta candidosis vaginal. Tomado del sitio web: <https://www.serpadres.es/bebe/salud-bebe/articulo/muguet-que-es-la-candidiasis-oral-en-ninos-831499247421> el día 2 de agosto de 2018.

5.2.3.- Epidemiología de la infección

La candidosis una infección cosmopolita, se encuentran casos a lo largo de todo el mundo y se considera una de las infecciones oportunistas más frecuente en seres humanos ya que su incidencia ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años; siendo las levaduras causantes de casi el ocho por ciento de las micosis a nivel mundial y afectan a individuos de cualquier edad, sexo o grupo étnico. Del mismo modo, las levaduras del género *Candida* existen en la naturaleza, repartidas en el suelo, agua dulce, vegetales, frutas, árboles, granos y en general toda sustancia rica en hidratos de carbono simples, así como formando parte de la biota normal en diferentes organismos, incluido el ser humano. (Biasoli, 2013)

En el caso de las infecciones vaginales en México, *Candida* spp., se presenta aproximadamente en un tercio de las pacientes diagnosticadas, mientras que entre el diez y diecisiete por ciento de las mujeres no gestantes en edad reproductiva son portadoras de la infección pero de manera asintomática y de igual manera hasta un treinta y cinco por ciento de mujeres embarazadas refieren no presentar sintomatología alguna. (Pineda *et al.*, 2017)

Candida spp. se aísla del tracto vaginal hasta en un cincuenta por ciento de mujeres embarazadas se considera aproximadamente entre el diez y el cincuenta por ciento *Candida* sp. y entre un veinte a treinta por ciento de las mujeres no embarazadas y saludables, es decir que el embarazo es un factor predisponente común para que mujeres sanas adquieran la infección y es significativo recalcar que hasta el setenta por ciento de los casos lleva seguimiento médico al menos por un periodo de un año.

Generalmente estima que hasta un setenta y cinco por ciento de las mujeres sexualmente activas y en edad reproductiva sufren de candidosis vaginal al menos una vez en la vida y entre un cinco y diez por ciento de ellas la padecen en forma recurrente, es decir tres o más episodios en el lapso de un año aun estando completamente sanas, lo cual se relaciona indudablemente con la automedicación o el uso prolongado de duchas vaginales, así como la administración de antifúngicos profilácticos sin antes constar el diagnóstico diferencial que debe realizarse siempre ante una infección vaginal. (Pineda *et al.*, 2017)

5.2.4.- Etiología de la infección

La vaginosis infecciosa se caracteriza por producir signos y síntomas que no siempre son propios de un agente etiológico por lo que es necesario llegar de forma precisa al origen de cada uno de ellos mediante un procedimiento diagnóstico en el laboratorio de Microbiología. Generalmente la sintomatología que se presenta ante cualquier infección vaginal abarca el aumento en la cantidad de la secreción vaginal acompañada de mal olor, prurito, ardor, irritación, disuria y dispareunia; mientras que en las mujeres en edad reproductiva la secreción vaginal normal es inodora,

clara y viscosa, por lo que es de suma importancia el diagnóstico diferencial ya que de esto depende la elección del tratamiento correcto y por lo tanto recuperación satisfactoria de las pacientes. (Guía de práctica clínica, 2008)

En el aparato genital femenino, la biota habitual de la vagina se ve notablemente afectada por las hormonas sexuales a lo largo de las diferentes etapas de la vida, ya que en las primeras semanas que siguen al nacimiento la vagina está poblada por lactobacilos, esta población crece porque los estrógenos que fueron transmitidos de la sangre materna provocan acumulación de glucógeno en las células que revisten la vagina y estos lactobacilos convierten el glucógeno en ácido láctico, por lo tanto el pH de la vagina se acidifica. Esta secuencia glucógeno- ácido láctico es la que proporciona las condiciones óptimas en las cuales se multiplica la biota habitual de la vagina tolerante a los ácidos. (Nester, 2007)

Los efectos fisiológicos de los estrógenos disminuyen varias semanas después del nacimiento y otras bacterias como las corinebacterias y una variedad de cocos y bacilos colonizan y dominan la biota normal de la vagina. Como resultado, el pH se torna más neutro hasta la pubertad pero cuando aumentan las concentraciones de estrógeno nuevamente vuelven a dominar los lactobacilos y la vagina se torna otra vez ácida constituida en su mayoría por *Lactobacillus* sp; sin embargo es probable encontrar *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus* del grupo B y *Candida albicans* en pocas cantidades como parte del equilibrio de la biota vaginal. (Guía de práctica clínica, 2008; Nester, 2007)

En la mujer adulta una alteración de este ecosistema provocada por el aumento de glucógeno o la eliminación de la biota normal debido al uso prolongado de antibióticos puede conducir a una infección vaginal, lo mismo ocurre cuando la mujer alcanza la menopausia ya que los niveles de los estrógenos vuelven a descender y la biota se asemeja a la de la niñez por lo que el pH se torna neutro nuevamente. (Guía de práctica clínica, 2008)

En la actualidad existen más de 100 especies de *Candida* patógenas para el ser humano, la mayoría de ellas viven como comensales y dispersas a lo largo del tracto

gastrointestinal, aparato reproductor y piel; es decir, son patógenos oportunistas que se hacen evidentes cuando el equilibrio en nuestra biota habitual se rompe o altera por algún factor, siendo además la zona vaginal un área muy sensible para contraer este tipo de infecciones ya que son muchos los factores que predisponen a la mujer a desarrollar candidosis vaginal. (Ciudad, 2007)

5.2.5.- Factores de riesgo

Es muy probable que las hormonas representen uno de los principales factores predisponentes en el caso de la candidosis vaginal por el simple hecho de que la infección es mucho menos frecuente en las niñas antes de la pubertad o en las mujeres después de la menopausia y por ende su prevalencia es mayor cuando se trata de mujeres en edad reproductiva o embarazadas, así como en aquellas que padecen diabetes no controlada. También existen otros factores de riesgo como el uso de antibióticos de amplio espectro que suprime la biota bacteriana normal, lo que conduce a infecciones micóticas oportunistas como es el caso de la candidosis vaginal. Existe reporte de otros factores que pueden ser riesgosos para las mujeres, como lo son el uso de anticonceptivos orales, uso de espermicidas que pueden inhibir los lactobacilos de la vagina, duchas vaginales, dispositivos intrauterinos y mantener relaciones sexuales sin protección, así como el uso de pantalones ajustados y ropa interior de nylon que aumentan la humedad en la zona, aunque estos han sido poco estudiados si existen casos donde se han asociado a la infección. (Ciudad, 2007; Nester, 2007)

El uso de métodos anticonceptivos orales o locales como el dispositivo intrauterino, diafragmas y condones se han vinculado con la infección porque *Candida* spp. es capaz de producir una biopelícula sobre el DIU, la cual puede servir como reservorio en la infección y también es capaz de metabolizar algunos compuestos de las sustancias espermicidas como el nonoxinol-9, lo cual altera indudablemente la biota habitual en vagina y favorece la adhesión de *Candida* spp. al epitelio vaginal. (Pineda *et al*, 2017)

A pesar de la existencia de múltiples factores de riesgo, tanto la colonización como la infección vaginal micótica son más frecuentes en el embarazo y en mujeres con otros factores predisponentes pero en la mayoría de los casos las infecciones suelen ser de origen endógeno por modificación de la biota normal vaginal, ya sea por disminución de las defensas inmunitarias del huésped o enfermedades no controladas como la diabetes, obesidad y estrés. (García *et al.*, 2006)

Se estima que la mayoría de los casos de infección vaginal la representan las vaginosis bacterianas superando un 50 por ciento de incidencia, mientras que la candidosis vaginal representa entre el 30 y 35 por ciento de los casos reportados, sin embargo estos datos podrían cambiar si realmente todas las mujeres se atendieran al presentar las molestias y se analizaran todos los casos reportados en las diversas poblaciones. Es por esto que entre las razones por las que no se conoce la real incidencia de la candidosis vaginal se encuentran la automedicación y el sobrediagnóstico ya que el flujo vaginal suele cambiar a lo largo del ciclo menstrual, lo cual podría confundirse con una recurrencia de la infección por *Candida* y si la paciente se automedica con cualquier alternativa disponible en el mercado o al acudir al médico no se hace un adecuado diagnóstico y se da tratamiento antimicótico la molestia y los síntomas pueden volver dando la equivocada idea de que el tratamiento administrado no tuvo el efecto terapéutico deseado. (Ciudad, 2007; Biasoli, 2013)

5.2.6.- Mecanismos de patogenicidad

Candida spp. obtiene acceso al lumen vaginal principalmente a partir de la región perianal adyacente y los cambios en el ambiente local así como el estado de salud del hospedero determinarán el inicio de la infección o su evasión impidiendo llegar a desarrollar la enfermedad. La colonización de la vagina requiere la adherencia de las levaduras a las células epiteliales por medio de adhesinas, mientras que la infección es mediada por enzimas proteolíticas, fosfolipasas y aspartil-proteinasas; además *Candida* spp. también produce gliotoxina, molécula que inhibe la actividad fagocítica de las células del sistema inmune innato y por lo tanto le permite seguir reproduciéndose pero también el desarrollo de pseudohifas destruye las células del

epitelio vaginal por invasión directa. Otro factor de virulencia de las levaduras es que son capaces de unirse a hierro y desplegar resistencia a diversos antifúngicos, siendo el principal mecanismo de resistencia a los antifúngicos azólicos. (Pineda *et al*, 2017)

En el caso de *Candida albicans*, la causa de resistencia a los azoles es la mutación en el gen ERG11 codificadora de una enzima esterol-desmetilasa que evita la unión de la levadura al compuesto azólico; mientras que en otras especies es debido a la mutación del gen ERG3 que codifica la enzima C5-6-esterol reductasa, lo que incrementa dicha resistencia. (Pineda *et al*, 2017)

El equilibrio que llega a darse entre el hospedero y el hongo patógeno puede convertirse en una relación parásita y resultar en enfermedad grave; a pesar de que existen diversos factores potenciales de virulencia como la morfología celular, la actividad enzimática, el cambio fenotípico y los factores de adhesión que favorecen la formación de biopelículas, no existe un factor principal o el único pueda ser considerado por sí solo como responsable de la patogenicidad, por lo que se ha propuesto una combinación de diferentes factores que contribuyen a una o más etapas de la infección y se han descrito de manera general en base a los siguientes aspectos:

- 1- La capacidad de adherencia de las levaduras a diferentes superficies: es una interacción muy fuerte entre una adhesina de la levadura y un receptor de la célula del hospedero.
- 2- Producción de enzimas extracelulares como lo son proteinasas y fosfolipasas específicas de cada cepa.
- 3- Morfogénesis o producción de hifas y pseudohifas que aumentan la capacidad invasiva de la levadura, la capacidad de adherencia y la resistencia a la fagocitosis, además de que aumenta el poder killer sobre las células del hospedero
- 4- El “Switching” o variabilidad fenotípica y antigénica es un cambio espontáneo, frecuente y reversible entre los diferentes fenotipos distinguibles por la morfología de la colonia o por la morfología celular.

5- Formación de biopelículas. (Castrillón, *et al.*, 2005; Biasoli, 2013)

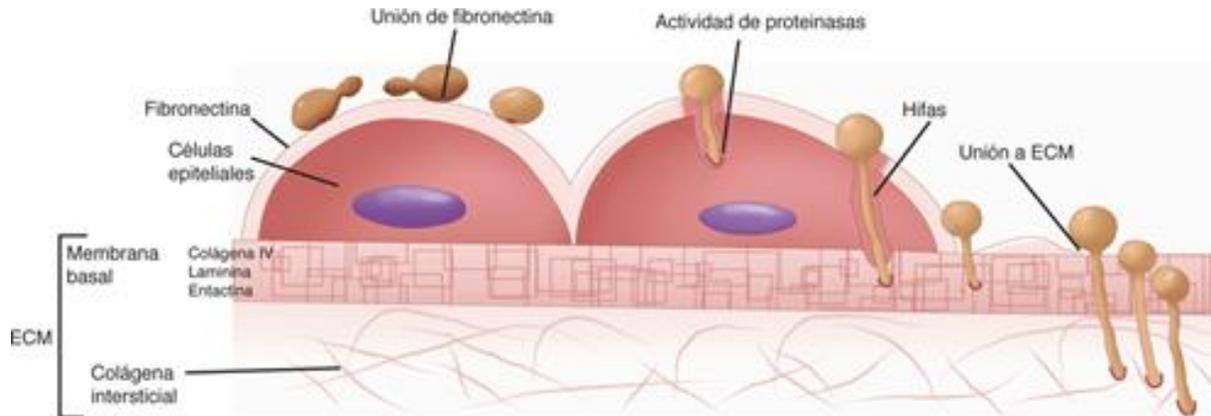


Figura 6.- Mecanismos propuestos para la unión e invasión de tejidos por *C. albicans*.

Los receptores de superficie de glucomanano en la levadura pueden unirse a la fibronectina que cubre las células epiteliales o a los elementos de la matriz extracelular (ECM) cuando *Candida* spp. ha invadido más allá de ésta. La invasión se asocia con formación de hifas y producción de proteinasas. Tomado del sitio web: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2169§ionid=162985368#1143537831> el día 2 de agosto de 2018.

5.2.7.- Mecanismos de defensa del hospedero

Debido a los factores de virulencia con los que cuenta el género *Candida*, la defensa del hospedero está dada primordialmente por el sistema inmunológico ya que la protección contra el microorganismo depende de los anticuerpos y de la adecuada activación del sistema del , aunque el género puede persistir en la mucosa vaginal de mujeres sanas sin causar problemas. Por otro lado, también influye la inhibición de las formas filamentosas, la cual es lograda por mediadores de inmunidad innata o adaptativa, evitando así el establecimiento de la enfermedad pero no la colonización. Cabe mencionar que cualquier defecto inmunológico local que implique una deficiencia en el componente secretor o en la producción de las diferentes clases de inmunoglobulinas puede debilitar la protección o evasión hacia el microorganismo y así tener gran influencia en la transición de *Candida* spp. como comensal a patógena. (Biasoli, 2013; Pineda *et al.*, 2017)

5.3.- Diagnóstico de candidosis vaginal

El diagnóstico presuntivo usualmente es clínico porque el médico se basa en la sintomatología dada por la paciente y los hallazgos clínicos que encuentra durante la revisión visual si es que se realiza; sin embargo el diagnóstico correcto es aquel que se confirma en el laboratorio clínico a través de un exudado cervicovaginal del cual se extrae una muestra de la secreción y se examina con microscopía directa, tinción, cultivo e identificación a partir de las colonias obtenidas. El diagnóstico es sencillo y se obtiene el resultado 72 horas después de tomada la muestra porque raramente se requiere de técnicas de diagnóstico distintas a las comunes o más sofisticadas. El dar un diagnóstico correcto y a tiempo es de suma importancia para tratar la infección con los antimicóticos correctos, así como descartar el que exista alguna otra enfermedad ginecológica ya que también los síntomas se pueden confundir con procesos fisiológicos que no requieren de tratamiento específico. (Ciudad, 2007)



Figura 7.- Diagnóstico de candidosis vaginal en el laboratorio de Microbiología.

La detección del patógeno involucrado en las infecciones vaginales conlleva el examen en fresco y tinción de Gram de la muestra de exudado cervicovaginal, lo que permite intuir el origen de la infección y dichos resultados acompañarán al cultivo de la muestra, las cuales dan el resultado definitivo 48 horas después de sembrarla; sin embargo para corroborar género y especie es necesario realizar pruebas bioquímicas manuales o hacer uso de sistemas automatizados. Tomado del sitio web: https://www.google.com/search?hl=es-419&biw=1280&bih=891&tbm=isch&sa=1&ei=9aFrW_SLFpHawQK4jouQBQ&q=microbiologia+diagnostico&oq=microbiologia+diagnostico&gs_l=img.3...115636.119974.0.120250.14.8.2.4.6.0.236.1023.0j2j3.5.0...0...1c.1.64.img..4.9.665...0i30k1j0i8i30k1j0i24k1.0.WnVisy4NMeQ#imgrc=AZIWhblkXVKyKM; el día 5 de agosto de 2018.

5.3.1.- Exudado cervicovaginal

El diagnóstico etiológico de las candidosis es complicado en general para el área clínica, esto se debe principalmente a la ausencia de signos y síntomas característicos para cada una de ellas, por lo que es común confundirlas en primera instancia con alguna otra patología y es por ello que es fundamental recurrir al diagnóstico microbiológico. (Unda, 2011)

Para la correcta toma de muestra del exudado vaginal se deben cumplir al pie de la letra los requisitos y procedimientos establecidos como lo son no practicarse higiene genital previa al estudio con duchas vaginales o cremas que pueda alterar las características de la flora, así como suspender la administración de antibióticos diez días antes de la realización del exudado. La toma de muestras vaginales debe hacerse ayudándose de un espéculo o espejo vaginal estéril, el cual se introduce siempre con uso de guantes y sin aplicar lubricantes porque podría alterar de igual forma el contenido de la muestra y por lo tanto el resultado. Se toma la secreción mucosa de la pared posterior del canal vaginal con ayuda de un hisopo estéril haciendo rotar el mismo por la zona de secreción más abundante, además es recomendable obtener simultáneamente exudado del área del cérvix, teniendo especial cuidado en caso de mujeres embarazadas, así como tomar las muestras por duplicado o triplicado si se quieren investigar distintos patógenos o realizar diversos estudios a una misma paciente; básicamente una de las muestras se introduce en solución salina para observación en fresco, otra es utilizada para realizar tinción de Gram y una más sirve para inocular los medios de cultivos correspondientes, sin embargo a través de esta toma de muestra se puede anexar el diagnóstico de bacterias especiales por lo que se requiere de varios hisopos dependiendo de cada laboratorio y de los exámenes solicitados por el médico (Consultar Anexo 1). (García & Hernández, 2011)



Figura 8.- Flujo característico de infección cervicovaginal causada por *Candida albicans*.

La cavidad vaginal interna, así como el cérvix se aprecian con eritema y abundante flujo blanquecino grumoso cuando existe un proceso infeccioso que está afectando el tejido. Tomado del sitio web: <http://caduceodorado.blogspot.com/2016/06/candidiasis-vaginal.html> el día 7 de agosto de 2018.

5.3.2.- Examen en fresco

La observación microscópica directa de las muestras es una técnica sencilla y recomendable sobre todo en el caso de las muestras de exudado cervicovaginal donde pueden encontrarse una gran variedad de microorganismos ya que permite obtener rápidamente un diagnóstico presuntivo que en la mayoría de los casos se confirma con el cultivo (Consultar Anexo 2.1). (Castro & Martin, 2007)

Para la detección de candidosis vaginal el examen en fresco se realiza suspendiendo parte del exudado en solución salina pero si se sustituye por azul de lactofenol se pueden apreciar mejor las levaduras y elementos como hifas, sin embargo la adición de hidróxido de potasio entre el diez y cuarenta por ciento también es de utilidad, sobre todo en aquellas muestras con abundancia de células ya que su fin es eliminar interferencias y resaltar las estructuras fúngicas presentando un efecto clarificador que disuelve los distintos elementos celulares pero manteniendo intacta la pared celular fúngica facilitando así su detección en el

microscopio ya que además las levaduras, pseudohifas y pseudomicelios refringen al enfocarlas al microscopio óptico. (Castro & Martin, 2007)

El mayor tamaño de las levaduras con respecto a las bacterias permite su observación a bajos aumentos en las muestras sin fijar, por lo que el examen en fresco es de suma importancia al establecer un diagnóstico presuntivo del agente etiológico sospechoso. Siempre que sea posible debe realizarse, por lo que la técnica se ha ido modificando y suele variar un poco de laboratorio en laboratorio principalmente en cuanto al uso de reactivos ya que actualmente se recurre a las preparaciones con colorantes como el blanco de calcoflúor que se ha vuelto común porque facilita la detección y diferenciación de las estructuras fúngicas cuando se examinan en un microscopio de fluorescencia ya que dicho reactivo se une específicamente a la quitina de las células fúngicas y emite una fluorescencia que los delimita. (García & Hernández, 2011)

En la observación microscópica de las secreciones vaginales pueden apreciarse las levaduras del género *Candida* como células alargadas con un tamaño que oscila entre dos y cuatro micrómetros, siendo de mayor tamaño en el caso de *C. glabrata* que va desde cuatro hasta seis micrómetros. Considerando estos aspectos puede predecirse el agente etiológico de la infección, sin embargo nunca debe considerarse como un diagnóstico final ya que las características de las células que se aprecian en el examen en fresco solo son de gran utilidad. También se considera que se da mayor validez al papel patógeno de *Candida* spp. cuando se aprecian más de cuatro levaduras por campo en objetivo 40x y hay presencia de hifas o pseudohifas en especies distintas a *C. glabrata* que como se sabe no forma pseudohifas. Es solo en estos casos cuando el hallazgo microscópico se da como positivo para candidosis vaginal porque dichas características indican que la infección se encuentra activa. (Pineda *et al.*, 2017)

5.3.3.- Tinción de Gram

Es sabido que las levaduras se tiñen bien con la mayoría de los colorantes bacterianos, siendo la más común la tinción de Gram, cuya ventaja es que se trata de un procedimiento rápido y de bajo costo que además es muy confiable porque si se realiza correctamente es fácil la apreciación de las estructuras; del mismo modo su principal desventaja es cuando no se respetan los tiempos de tinción o la cantidad de colorante es inadecuada ya que se pueden obtener falsos positivos o interferencias del colorante al momento de observar las laminillas al microscopio. Realizar un extendido con la muestra de exudado cervicovaginal y después teñirlo es de gran utilidad porque permite diferenciar entre levaduras y bacterias ya sean Gram positivas o negativas, así como la presencia y condición de otras células propias del epitelio vaginal, evidenciando entonces algunas características propias del tipo de infección vaginal por la que la paciente está cursando. (Castro & Martin, 2007)

Respecto a la infección por *Candida* spp., la observación al microscopio de levaduras en muestras vaginales y de cérvix tiene un valor cuestionable tanto en la tinción de Gram como en el examen en fresco porque pueden ser parte de la biota comensal, sin embargo, la presencia de leucocitos polimorfonucleares es un dato sugestivo de infección, así como la cantidad de levaduras por campo que de igual manera que en el examen en fresco debe ser mayor a cuatro y sin duda ante la presencia de pseudohifas o pseudomicelios se sabe que la infección está presente. La tinción de Gram complementa la observación en fresco y ayuda a corroborar los resultados obtenidos en primera instancia pues pueden distinguirse más fácilmente las células levaduriformes ya teñidas, las cuales se aprecian como grampositivas y con su típica forma ovoide; sin embargo, en la candidosis vaginal la microscopía presenta en general una baja sensibilidad, por lo que siempre debe ir de la mano con los otros resultados encontrados en la muestra y finalmente al cultivo para poder dar un diagnóstico certero y no apresurado. (García & Hernández, 2011)

La base para una correcta apreciación microscópica de las laminillas teñidas es una buena técnica de tinción, sobre un portaobjetos limpio se desliza el hisopo que

contiene la muestra para obtener una película delgada que se extiende a lo largo del portaobjetos, se deja secar y se fija (Consultar Anexo 2.2). (Pineda *et al*, 2017)

5.3.4.- Cultivo de la muestra de exudado cervicovaginal

En el caso de candidosis vaginal la positividad de un cultivo para levaduras debe valorarse de acuerdo con las características de los pacientes, signos y síntomas que presentan y su situación clínica porque las levaduras del género *Candida* forman parte de la biota comensal en vagina y por lo tanto su aislamiento puede tener un significado clínico cuestionable. (García & Hernández, 2011)

El cultivo es fundamental para las muestras vaginales, a partir del desarrollo obtenido en los medios de cultivo se puede establecer la etiología de la infección y efectuar pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, ya que es mediante colonias aisladas que se puede definir género y especie de las levaduras causantes de candidosis e incluso se pueden realizar estudios de tipificación molecular si así se requiriera. Después de la inoculación y siembra de las muestras en los medios de cultivo, las placas deben incubarse lo más pronto posible porque el retraso limita la capacidad de crecimiento de algunos microorganismos lábiles y favorece el desarrollo de contaminantes ya que se expone demasiado al ambiente. A pesar de que la mayoría de las levaduras crecen óptimamente a temperatura ambiente entre 25 y 30°C, los cultivos se incuban habitualmente en estufa a 37°C en atmósfera aerobia y durante un lapso de 18 a 24 horas pero antes de proceder al examen de las colonias, la incubación se prolonga hasta 48 horas para asegurar un cultivo negativo cuando es el caso (Consultar Anexo 2.3). (García & Hernández, 2011)

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se pueden observar las levaduras del género *Candida* como colonias de tamaño mediano, características de color blanco o crema, de consistencia opaca, elevadas, lisas, brillantes o mates, y con un diámetro de uno a tres milímetros; el aspecto de las colonias varía de una especie a otra y de los distintos medios de cultivo en los cuales se encuentren, sin embargo es difícil distinguir macroscópicamente una especie de otra, por lo que es importante su identificación ya sea por técnicas manuales, semiautomatizadas o automatizadas

pero después de adquirir mucha experiencia en el laboratorio es probable que a partir del color, olor y consistencia se facilite su posterior identificación. (Castro & Martín, 2007; Pineda *et al.*, 2017)

En los medios de cultivo útiles para el desarrollo bacteriano como lo son agar gelosa chocolate y agar sangre de carnero, las colonias de levaduras se aprecian de un tamaño pequeño a mediano y de un color blanquecino pudiéndose confundir con las colonias bacterianas, por lo que es necesaria la observación microscópica para su diferenciación; mientras que en agar dextrosa Sabouraud las colonias de levaduras tienen apariencia cremosa, de aspecto liso o rugoso dependiendo del género o especie y generalmente de color blanco ya que raramente se aprecian pigmentadas, esto dependerá del medio de cultivo utilizado porque actualmente existen medios diferenciales que contienen sustancias cromogénicas y en los cuales las colonias se distinguen por desarrollar color. (García & Hernández, 2011)

La mayoría de los organismos levaduriformes crecen en el laboratorio con gran facilidad en un gran número de medios de cultivo convencionales pero el agar dextrosa sabouraud es el más indicado para realizar el aislamiento y para una posterior identificación. La recuperación de la levadura en agar dextrosa Sabouraud es hasta la fecha el estándar de oro para el diagnóstico de infecciones causadas por levaduras ya que a partir de este medio de cultivo se obtienen las colonias aisladas para establecer el diagnóstico pero también es importante el uso de otros medios de cultivo tanto selectivos como diferenciales, sobre todo para distinguir el agente patógeno de otras colonias que pudieran ser de géneros bacterianos pertenecientes a biota habitual o tratarse de una infección mixta. (Pineda *et al.*, 2017)

5.3.5.- Medios de cultivo requeridos para sembrar una muestra de exudado cervicovaginal

Para la obtención de resultados confiables a partir del desarrollo de microorganismos en medios de cultivo es importante aplicar la norma general para todo tipo de muestras, la cual es que se debe realizar el envío inmediato de la muestra al laboratorio de Microbiología para el procesamiento de la misma lo más

rápido posible y asegurar la viabilidad y el aislamiento de microorganismos de crecimiento difícil, evitando además el sobrecrecimiento de bacterias de crecimiento más rápido. (Aznar, J., Blanco, M., Lepe, J., Otero, L & Vázquez F., 2007)

A pesar de todos los métodos ya mencionados para el diagnóstico de infecciones vaginales, el cultivo sigue siendo el de mayor utilidad sobre todo para la detección de candidosis ya que permite la apreciación macroscópica y el aislamiento de las levaduras, siendo estas difíciles de definir en el examen en fresco o tinción de Gram donde existe amplia posibilidad de encontrarse con falsos negativos; mientras que de forma contraria son ampliamente confiables en la detección de otro tipo de infecciones vaginales donde el cultivo no es precisamente lo que define el agente etiológico como lo es en los casos de infecciones producidas por *Trichomonas vaginalis* o *Gardnerella vaginalis*. (Aznar *et al.*, 2007)

Entre los medios de cultivo de utilidad para el diagnóstico de infecciones vaginales se encuentran los enriquecidos, selectivos y diferenciales porque estos nos sirven para el aislamiento de los diferentes microorganismos que pueden estar presentes como agente etiológico. (Consultar Anexo 3)

Para todos los casos se utilizan el agar gelosa chocolate enriquecido que es un medio altamente nutritivo en el cual se puede desarrollar prácticamente cualquier microorganismo y por lo tanto a partir de muestras vaginales se recuperan principalmente *Lactobacillus* spp, *Streptococcus* spp., enterobacterias y levaduras. (Casado, Torrico & Medina, 2012)

El uso de otros medios de cultivo como lo son el agar sangre de carnero, agar sangre humana, agar MacConkey, agar Thayer Martin son también de gran importancia para el aislamiento de patógenos en exudados cervicovaginales, sin embargo, es necesario agregar medios selectivos para hongos como lo son agar dextrosa papa (PDA) y agar dextrosa Saboroud (SDA).

Actualmente el medio de mayor utilidad para la detección de candidosis es un medio de cultivo selectivo y además diferencial llamado cromoagar orientador para el aislamiento de levaduras donde las peptonas que contiene suministran los

nutrientes necesarios para el desarrollo de las colonias y el cloranfenicol inhibe la mayoría de los contaminantes bacterianos, mientras que la mezcla cromógena que caracteriza a este medio está formada por sustratos artificiales que liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas específicas de las levaduras y así es posible diferenciar determinadas especies o detectar ciertos grupos de organismos de forma visual. (Becton Dickinson, 2014)

Al existir sustratos cromógenos en el medio, las colonias de *Candida* spp. se desarrollan de diferente color según la especie, lo que hace posible la detección directa del microorganismo en las placas, por lo que su uso cada vez es más común y práctico en el diagnóstico de diferentes candidosis, incluida la candidosis vaginal donde una gran ventaja de este medio es la fácil detección de cultivos mixtos de levaduras, gracias a los diferentes colores que presentan sus colonias. (Becton Dickinson, 2014)

Las colonias de *C. albicans* presentan un color verde claro, las colonias de *C. tropicalis* presentan un color azul que se puede tornar verdoso o metálico, *C. glabrata* se desarrolla con una coloración violeta que va de un tono claro a oscuro y las colonias de *C. krusei* presentan un color rosa claro con un borde blancuzco que puede llegar a confundirse con otras especies de levaduras que en este medio produzcan su color crema natural o presenten un color rosa pálido. (Becton Dickinson, 2014)

Las enzimas que se revelan son hexosaminidasa y fosfatasa alcalina, la primera está presente en *Candida tropicalis*, *C. albicans* y *Candida dubliniensis*, mientras que la segunda la posee *Candida krusei* pero hay otras especies que pueden presentar discreta actividad de esta fosfatasa alcalina y entonces la variación en la tonalidad dependerá del sustrato y la pigmentación natural de la levadura; mientras que los sustratos cromógenos que utiliza para evidenciar la actividad enzimática de las levaduras son el 5-bromo-4-cloro-3-indol-N-acetil bD-glucosaminidasa (X-NAG) que detecta la actividad de la enzima hexosaminidasa presente en *C. tropicalis*, en *C. albicans* y *C. dubliniensis*, así como un sustrato adicional que logra que las últimas dos especies aparezcan de color verde en lugar de azul. También cuenta

con el 5-bromo-6 cloro-3-indol fosfatasa ptoluidina (BCIP), que detecta la actividad de la fosfatasa alcalina presente en *C. krusei*. (Alfonso *et al.*, 2010)

Los medios de cultivo cromogénicos para levaduras fueron diseñados para aislar e identificar simultáneamente especies del género *Candida* después de la incubación necesaria que es de 24 a 48 horas a 37°C y existen diferentes marcas comerciales dentro del mercado pero su costo aún es poco accesible por lo que muchos laboratorios no tienen acceso a él; sin embargo es recomendable que el diagnóstico solo se base a los resultados obtenidos en este tipo de medios de cultivo y no sean confirmados hasta que se realicen otras pruebas de identificación ya que algunas especies pueden confundirse o ser parecidas en cuanto a la coloración, por lo que su uso requiere también el obtener la experiencia necesaria para diferenciar las colonias. (Castro y Martín, 2007)

5.3.6.-Tubo germinativo

La producción de tubo germinativo es una prueba muy efectiva y utilizada a lo largo de varios años para identificar *C. albicans* porque es una técnica sencilla y rápida pero con el inconveniente que pueden ser confundidos los tubos germinativos con hifas por lo que se requiere de experiencia previa para su correcta interpretación. Antes de emitir un resultado negativo se debe tener presente la existencia de aproximadamente un 5% de cepas de *C. albicans* que no producen tubo germinal, y también la posibilidad de falsos positivos en el caso de *C. tropicalis*. La producción de clamidosporas en medios como el agar harina de maíz, agar Czapeck adicionado de Tween 80, agar arroz o agar patata-zanahoria es más rentable para la confirmación de *C. albicans* cuando la prueba del tubo germinativo es negativa. (Castro y Martín, 2007)

5.3.7.- Sistemas inmunológicos de aglutinación

El mercado ofrece sistemas inmunológicos de aglutinación con partículas de látex de identificación para *Candida* spp., en los cuales se busca la identificación rápida de levaduras mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas. Particularmente en el

panel se aplican sobre un medio sintético diferentes nutrientes como azúcares, alcoholes, peptona, asparagina, urea, sulfato de amonio y nitrato de potasio, todos ellos por separado para apreciar el crecimiento de la levadura basándose en la utilización de dichos nutrientes y dependiendo de su requerimiento nutricional se realiza la identificación. Este es un método poco utilizado en la actualidad, debido a lo laborioso que resulta su realización en un laboratorio de Microbiología, por lo que la mayoría optan por métodos basados que faciliten la identificación de las levaduras. (Castro y Martín, 2007)

5.3.8.-Sistema API

Se trata de un sistema que incluye 20 pruebas bioquímicas colocados en 20 cúpulas o pozos que contienen los sustratos carbonados deshidratados y se inoculan con la levadura. El crecimiento se produce si la levadura presenta la capacidad de utilizar dicho sustrato en un medio mínimo semisólido donde la lectura de cada prueba genera un código numérico dependiendo del resultado, el cual facilita la identificación de 34 especies de levaduras distintas las cuales se pueden consultar en el manual o inserto de cada casa comercial. (Castro y Martín, 2007)

5.3.9.- Sistema Vitek 2 compact

Es un sistema automatizado para la identificación de microorganismos, incluidas levaduras, así como el estudio de sensibilidad antimicrobiana que incluye 64 pozos con pruebas bioquímicas basadas en la utilización de carbohidratos y compuestos nitrogenados que brindan la posibilidad de identificar 51 especies del género *Candida* en aproximadamente 15 horas. (Jordá *et al.*, 2005)

La identificación del microorganismo se realiza con la inoculación de una suspensión problema en tarjetas con paneles que contienen las reacciones bioquímicas determinadas para cada tipo de microorganismo; mientras que la sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de los distintos antibióticos o antifúngicos

correspondientes según sea el caso a los puntos de corte de sensibilidad establecidos (Consultar Anexo 4). (Jordá *et al.*, 2005)

El equipo maneja un sistema que utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, las cuales son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática ya que las tarjetas reactivas tienen en sus 64 pozos un sustrato diferente con los cuales se miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibitoras. (Ochiuzzia *et al.*, 2014)

Las tarjetas se encuentran selladas en ambos lados por una película clara que evita el contacto entre las diferentes mezclas del sustrato con el microorganismo y a la vez permite la transmisión del nivel de oxígeno apropiada. Cada tarjeta tiene un tubo delgado de transferencia preinsertado para la inoculación y además cada una cuenta con códigos de barras que contienen información sobre el tipo de producto, número de lote, fecha de caducidad y un identificador único que puede ser ligado a la muestra ya sea antes o después de cargar la tarjeta al sistema, lo cual evita errores y confusiones en las lecturas y emisión de resultados. (Jordá *et al.*, 2005)

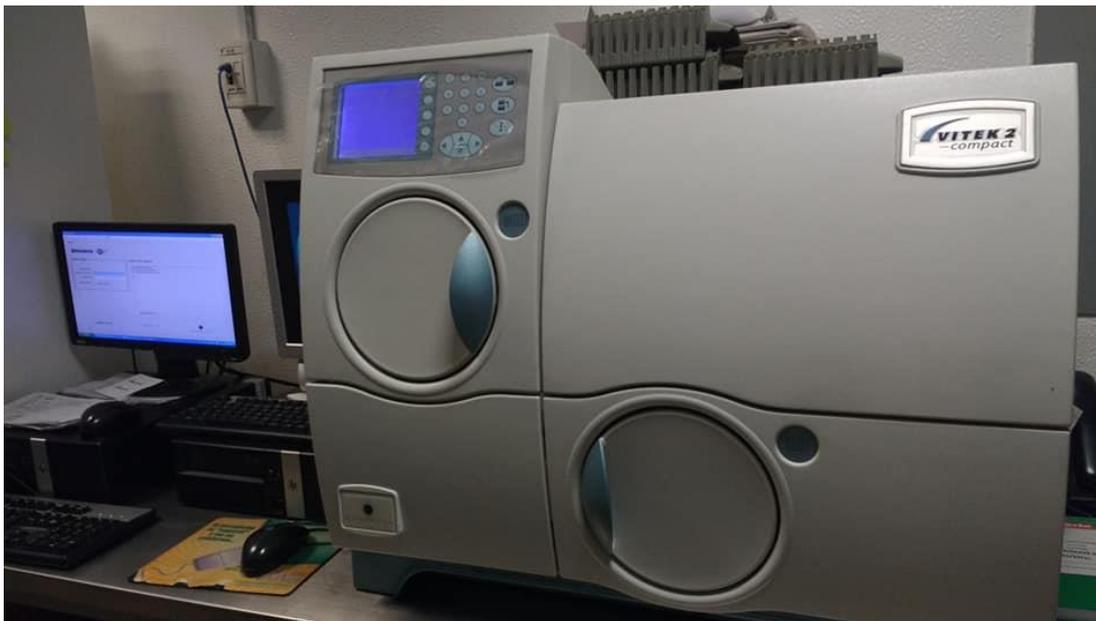


Figura 9.- Sistema automatizado Vitek 2 compact para la identificación de microorganismos aislados de muestras clínicas.

El equipo automatizado Vitek 2 compact brinda resultados rápidos y confiables a partir de un sistema que determina género y especie de microorganismos como bacterias y levaduras aislados de diversas muestras, pero principalmente su utilidad se basa en el área clínica ya que también es capaz de realizar el panel de sensibilidad correspondiente al tipo de microorganismo. (Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del INPer, Isidro Espinosa de los Reyes)

Para un resultado confiable es importante realizar la técnica de la mejor forma posible y con las medidas de seguridad necesarias para evitar contaminación de las muestras. El inóculo siempre se debe transferir con asa estéril, a partir de un cultivo puro desarrollado durante 24 horas en agar nutritivo en una cantidad suficiente para ajustar la turbidez de 0.80 a 1.2 para el caso de levaduras; a partir de dichas suspensiones se obtiene el género del microorganismo problema ya que se colocan en un cassette especial con sus respectivas tarjetas de identificación que se inserta al sistema Vitek 2 compact. (Jordá *et al.*, 2005)

Una vez que las muestras se encuentran dentro del equipo, son sometidas al proceso de identificación de forma automática ya que primeramente son transportadas a una cámara en la que se aplica vacío y en seguida se reintroduce nuevamente el aire, esto se lleva a cabo para lograr que la suspensión bacteriana pase a través del tubo de transferencia hacia los microcanales que llenan todos los pozos de la tarjeta de identificación. Posteriormente las tarjetas inoculadas pasan por un mecanismo que corta los tubos de transferencia y las sella para después incubarlas a $35.5 \pm 1^\circ$ C., y a partir de ahí cada tarjeta es removida del carrusel incubador en lapsos de 15 minutos y transportada al sistema óptico de transmitancia que usa diferentes longitudes de onda del espectro visible para interpretar las reacciones de turbiedad o el color de los productos metabólicos y así los resultados de cada prueba aparecen como “+”, “-”, o “?” cuando las reacciones son débiles. Después la base de datos interpreta y guarda los resultados con respecto al gran número de cepas de microorganismos que han sido guardados y probados bajo varias condiciones de cultivo cuyas cepas provienen de una variedad de fuentes clínicas e industriales, así como de colecciones de cultivo perfectamente estandarizadas como lo son las cepas ATCC. (Jordá *et al.*, 2005)

El sistema Vitek 2 compac también brinda resultados de sensibilidad a antibióticos y antifúngicos cuando así se requiere, solo hace falta realizar una dilución a partir de la suspensión del microorganismo y colocar la tarjeta de sensibilidad correspondiente, así el proceso se lleva a cabo de la misma forma que ocurre con la identificación de género y especie y de esta forma la base de datos guarda los resultados obtenidos, indicando si existe sensibilidad o resistencia al antibiótico o antifúngico, así como la concentración mínima inhibitoria para cada una de ellos, lo cual ha sido de gran utilidad a nivel clínico al momento de dar el tratamiento indicado. A lo largo de mucho tiempo se sembró incertidumbre respecto al valor del antifungigrama para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de los antifúngicos y por lo tanto para orientar al tratamiento pero en los últimos años se ha mostrado un progreso en la estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y esto ha permitido que los laboratorios y médicos confíen cada vez más en los resultados obtenidos, ya que de esta manera se ha facilitado la interpretación in vitro en relación a la eficacia del antifúngico con respecto al tratamiento indicado ante los casos de micosis. (Jordá *et al.*, 2005)

5.4.- Tratamiento de la candidosis vaginal

Para determinar el tipo y duración del tratamiento de la candidosis vaginal es importante conocer primeramente la especie de *Candida* involucrada, posteriormente los hábitos generales de la paciente como lo son de higiene, prácticas sexuales riesgosas y condiciones de salud en las que se encuentra ya que a partir de estos aspectos se puede llegar a las causas por las cuales se adquirió la infección, sobre todo en casos de infecciones recurrentes. En mujeres con infección vaginal por *Candida albicans* tanto los azoles como la nistatina son medicamentos efectivos, pero no son prácticos en infecciones vaginales causadas por especies de diferentes a *albicans* ya que son poco eficaces, sobre todo en el caso de *C. glabrata*. (Pineda *et al.*, 2017)

Debido a que no hay fundamentos que evidencien de forma significativa el hecho de que algún azólico sea mejor que otro para tratar las infecciones vaginales, se sabe que las tasas de cura oscilan entre el 80 y el 90 por ciento de los casos en los

que se administra este tipo de medicamentos; sin embargo se sabe que los azoles vía oral muestran tasas de curación más elevadas que por otra vía pero el potencial tóxico del fármaco aumenta por lo que la búsqueda de otras alternativas de tratamiento sigue poniéndose a discusión en las diferentes instituciones de salud. (García et al., 2006)

A partir del surgimiento de aislamientos resistentes a los antifúngicos en el género *Candida*, se ha planteado como parte del protocolo identificar además del género la especie de la levadura que se encuentra como agente etiológico de la infección ya que a partir de esto se puede decidir si es necesario o no determinar la sensibilidad a antifúngicos, esto es prácticamente esencial en casos de fracasos terapéuticos o recidivas. Es importante recalcar que los procedimientos para determinar la sensibilidad a los antifúngicos no deben realizarse de forma rutinaria en las levaduras aisladas de muestras genitourinarias como lo es el caso de los exudados cervicovaginales en las cuales no se tienen datos acerca de recurrencia o tratamiento anterior fallido, por lo que es mejor reservar insumos para las infecciones causadas por especies diferentes a *C. albicans* cuyo patrón de sensibilidad no esté bien establecido y para aquellas especies que suelen presentar resistencia a algunos antifúngicos de uso habitual o se hayan agotado estos como alternativa de tratamiento. (García & Hernández, 2011)

En las pacientes con candidosis vaginales recurrentes o complicadas es de suma importancia efectuar una identificación correcta del agente causal y realizar estudios de sensibilidad para confirmar el diagnóstico ya que de esto depende la elección del tratamiento más adecuado, el cual debe ser dado por el médico a partir del informe microbiológico expedido por el laboratorio de Microbiología. (Pineda *et al.*, 2017)

Según datos en México, para tratar la candidosis vaginal de leve a moderada ha sido común el uso de regímenes farmacológicos cortos o de dosis única porque han mostrado eficacia y han sido bien aceptados por las pacientes por el hecho de ser rápidos y cómodos; los tratamientos más comunes se basan en la ingesta de fluconazol en tabletas de 150 miligramos o tabletas de itraconazol de 600 miligramos vía oral, así como la administración de óvulos vaginales de isoconazol

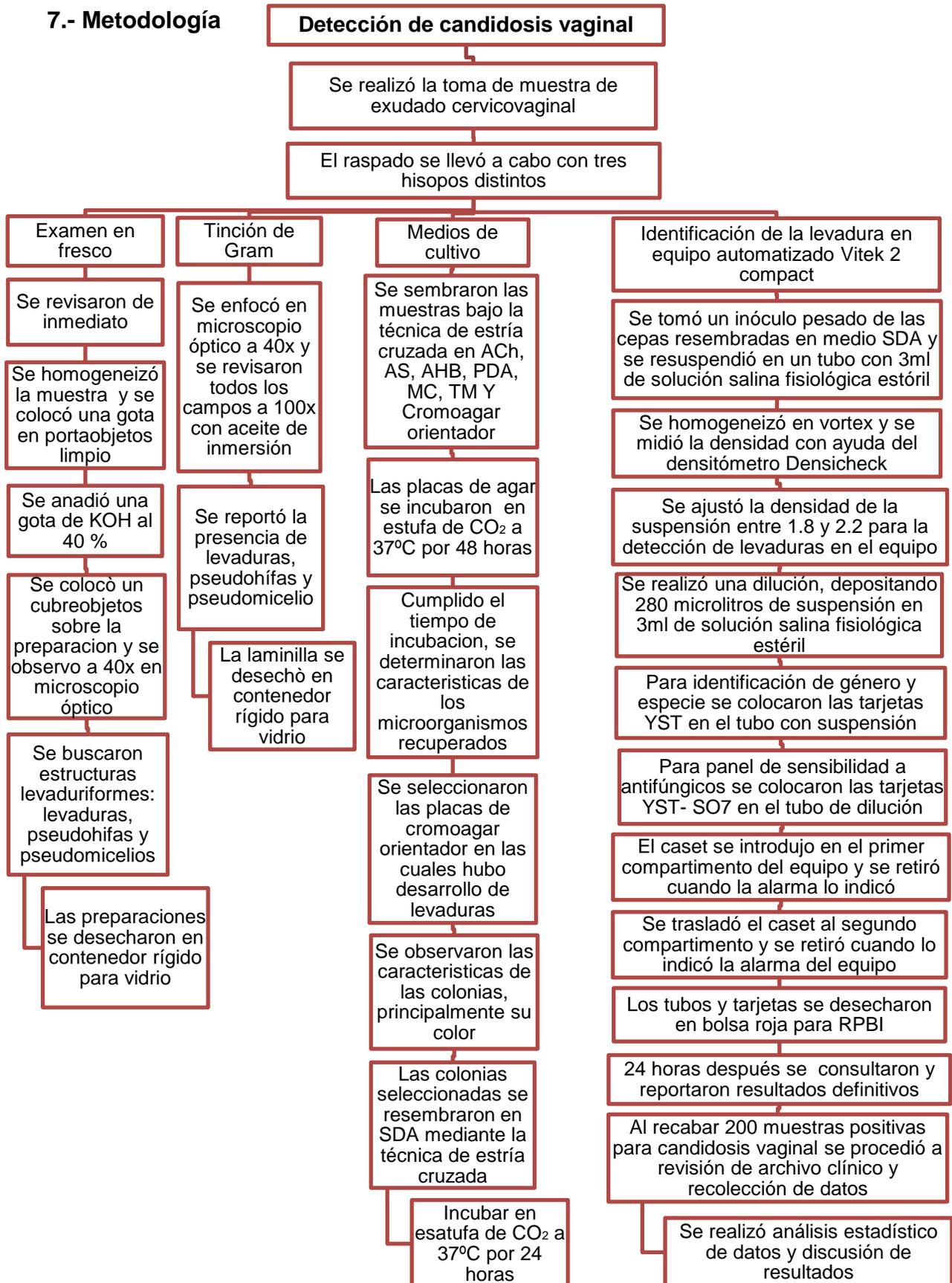
de 600 miligramos. En el caso de las candidosis vaginales no complicadas se sabe que tanto los azoles tópicos y orales, así como la nistatina local tienen una efectividad alrededor del 80 por ciento, mientras que en pacientes que presentan una infección severa o complicada se requiere de un tratamiento más largo que consta hasta de siete días ya que no ha sido establecido un régimen óptimo, se basan en la ingesta de tabletas de ketoconazol en dosis de 400 miligramos por día, itraconazol que va de 50 a 100 miligramos diarios, e incluso tratamientos que se extienden hasta 6 semanas administrando fluconazol vía oral en dosis de 100 miligramos por semana y óvulos vaginales de clotrimazol en dosis de 500 miligramos una vez por semana hasta concluir con la prescripción. En las mujeres embarazadas el tratamiento debe ser por vía vaginal y evitarse el uso de azoles orales debido a los efectos teratogénicos que pueden producir. (Pineda *et al.*, 2017)

Para tratar la candidosis vaginal recurrente, primero deben conocerse todos aquellos factores predisponentes con los que cuenta la paciente ya que a partir de ellos se puede llegar a la raíz del problema sabiendo que la infección vaginal por *Candida* spp. es una enfermedad multifactorial que debe manejarse con especial cuidado en las pacientes con diabetes, VIH, embarazadas o alguna otra condición de inmunocompromiso debido a las restricciones que puedan existir en cuanto a los diferentes tratamientos. En estos casos, el tratamiento consta normalmente de tres fases comenzando con la de inducción donde la administración es tópica u oral de un compuesto azólico hasta que se obtenga un cultivo negativo entre los siete y catorce días posteriores al inicio del tratamiento; posteriormente se inician las fases de mantenimiento y supresión donde se puede administrar ketoconazol en dosis de 100 miligramos diarios o clotrimazol de 500 miligramos una vez por semana, ambos en presentación de óvulos vaginales para finalmente extender el tratamiento siguiendo un régimen de dosis bajas de fluconazol vía oral, lo cual ha mostrado un alto porcentaje de efectividad en pacientes que son susceptibles a adquirir infecciones vaginales y las presentan en forma recurrente. (Pineda *et al.*, 2017)

6.- Materiales y reactivos

- Microscopio óptico Axiostar plus - ZEISS
- Asas bacteriológicas
- Equipo automatizado Vitek 2 compact - bioMérieux
- Densitometro Densi check - bioMérieux
- Tarjetas de identificación YST y sensibilidad YST-S07 para levaduras - bioMérieux
- Hidróxido de potasio al 40%
- Agar chocolate – MCD Lab
- Agar sangre de carnero – MCD Lab
- Agar Mc Conkey – MCD Lab
- Agar Thayer Martin – MCD Lab
- Agar sangre humana – MCD Lab
- Cromoagar orientador para levaduras – MCD Lab
- Agar dextrosa Sabouraud – MCD Lab
- Agar dextrosa papa – MCD Lab
- Colorantes para tinción de Gram

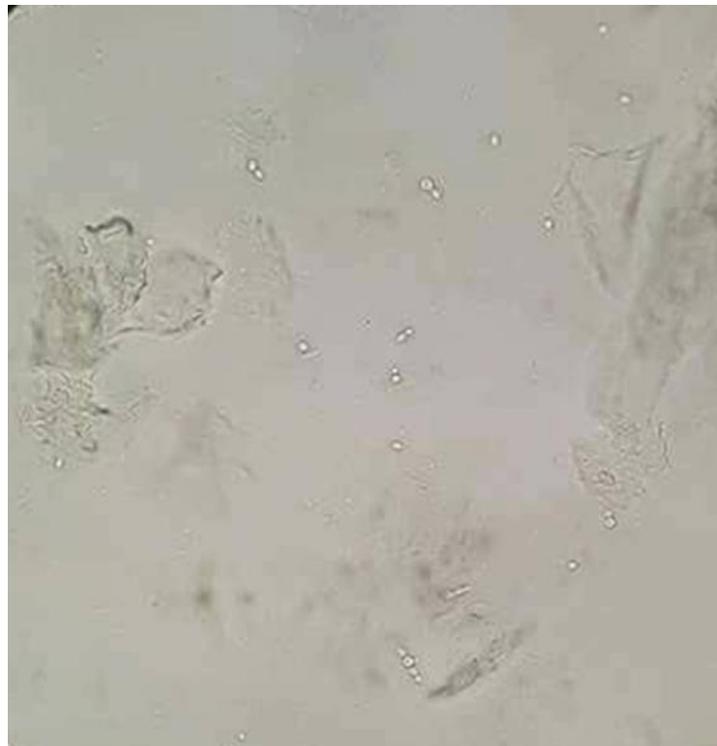
7.- Metodología



8.- Resultados

Durante 4 meses, en el Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes, se tomaron exudados cervicovaginales a 1800 pacientes embarazadas y no embarazadas. Estas muestras se procesaron de la misma manera, trabajando con técnicas que son fundamentales para dar un diagnóstico de infección vaginal como lo fueron el examen en fresco, tinción de Gram y desarrollo en medios de cultivo, obteniendo así 200 muestras que resultaron positivas a infección micótica producida por levaduras del género *Candida*, cuya especie se confirmó a través del sistema automatizado Vitek 2 compact y de las cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

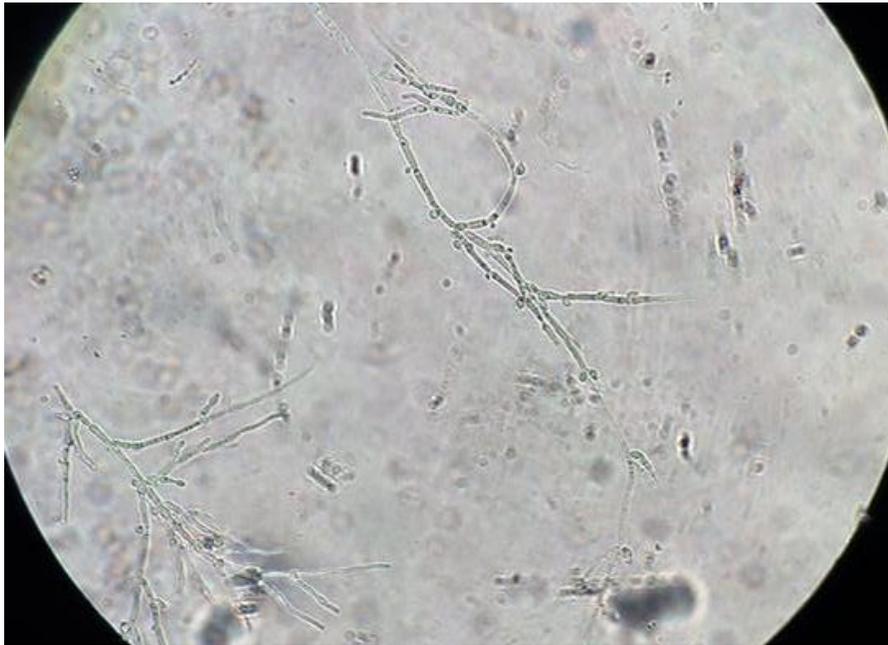
Figura 10. Levaduras del género *Candida* en examen en fresco a partir de una muestra de exudado cervicovaginal.



Examen en fresco de una muestra de exudado cervicovaginal montado en microscopio óptico a 40x, (Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del INPer, Isidro Espinosa de los Reyes)

En la fotografía se aprecia un campo con levaduras en gemación correspondientes a una muestra positiva para candidosis vaginal, la cual estuvo acompañada también por células epiteliales y leucocitos, propios del proceso infeccioso; dichas estructuras fueron apreciadas debido a que la muestra se montó de forma directa, siendo este el primer indicio a nivel laboratorio de que el microorganismo está presente en la zona, por esta razón es importante la realización de la técnica, ya que la presencia de más de cuatro levaduras por campo es un indicio de candidosis vaginal.

Figura 11. Pseudomicelio de *C.albicans* en examen en fresco a partir de una muestra de exudado cervicovaginal.



Examen en fresco de una muestra de exudado cervicovaginal montado en microscopio óptico a 40x. (Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del INPer, Isidro Espinosa de los Reyes)

La imagen corresponde a un examen en fresco, donde se encontraron gran cantidad de levaduras y formación de pseudomicelios pertenecientes a *Candida albicans*, ya que la presencia de dichas estructuras indica que la infección se encuentra activa debido a que la levadura desarrolla dicha morfología cuando se encuentra alojada en el tejido afectado y a temperatura óptima como lo es la corporal, así como abundantes células de descamación propias del proceso infeccioso que se estaba

llevando a cabo. Fue necesario revisar mínimo 20 campos en esta técnica para localizar las estructuras de interés.

Figura 12. Levaduras de *Candida glabrata* en examen en fresco con KOH al 40% a partir de una muestra de exudado cervicovaginal.



La imagen corresponde a un examen en fresco de una muestra de exudado cervicovaginal con KOH al 40% en microscopio óptico a 40x. (Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del INPer, Isidro Espinosa de los Reyes)

En la fotografía se pueden observar levaduras correspondientes a *Candida glabrata* debido a que no se encontraron pseudohifas y como se mencionó anteriormente, este género no es capaz de desarrollarlas. La modificación a la técnica original fue acertada porque al agregar una gota de KOH al 40% y observar toda la preparación se pudo clarificar la muestra y apreciar de una mejor manera las estructuras levaduriformes ya que se notó la ausencia de células epiteliales y biota acompañante. También es importante recalcar que la presencia de más de cuatro levaduras por campo es un indicio de candidosis vaginal cuando se hace la preparación en fresco tal y como se ve en la imagen.

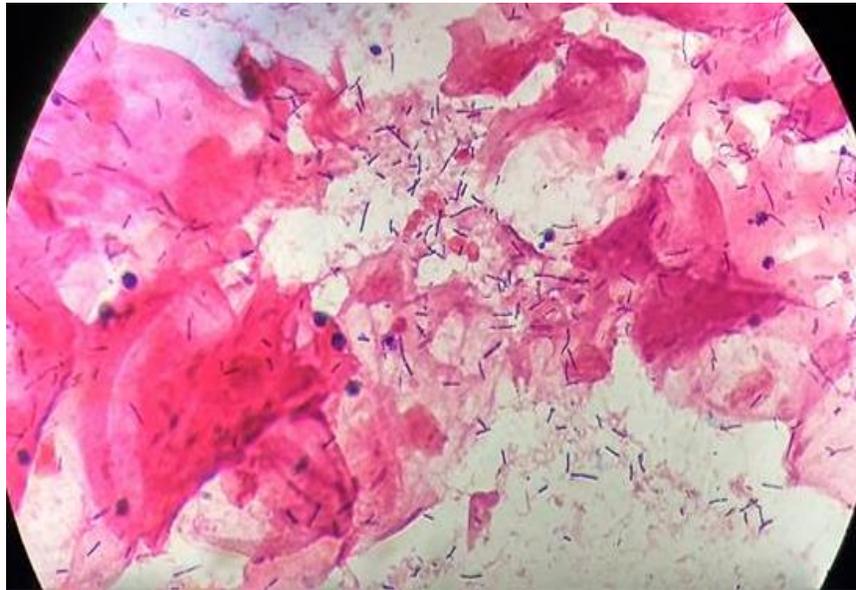
Figura 13. Pseudomicelio de *C.albicans* en examen en fresco con KOH al 40% a partir de una muestra de exudado cervicovaginal.



Examen en fresco de una muestra de exudado cervicovaginal, al cual se le agregó una gota de KOH al 40% para clarificar la preparación al ser montado en microscopio óptico a 40x. (Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del INPer, Isidro Espinosa de los Reyes)

La imagen pertenece a un examen en fresco tomado a partir de una paciente con flujo blanco abundante y grumoso característico de candidosis. En el campo enfocado no hubo presencia de células epiteliales ni biota acompañante ya que fueron degradados por el KOH que se agregó y gracias a esto fue posible detectar con facilidad la gran cantidad de pseudohifas formando pseudomicelio a partir de levaduras de la especie *C.albicans*. Los resultados que da el examen en fresco son primordiales para la continuación del procedimiento hacia un diagnóstico porque a partir de él se tiene una sospecha de la infección.

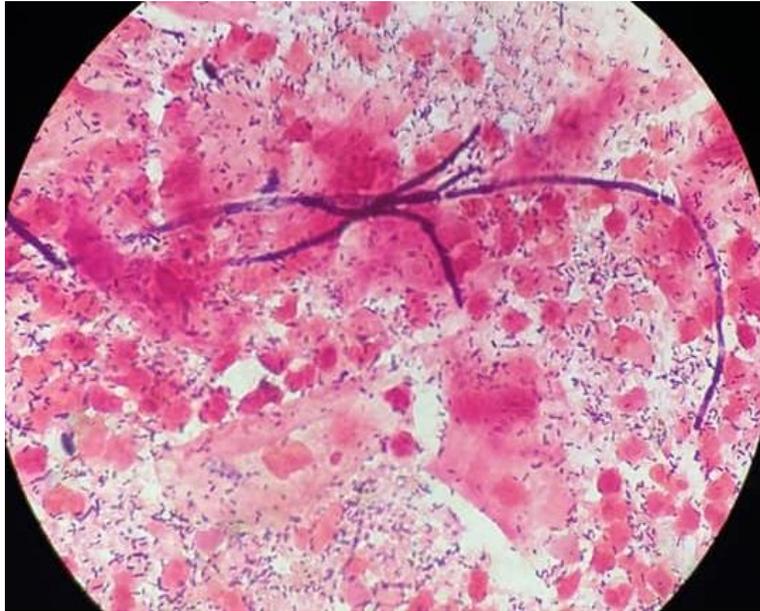
Figura 14. Levaduras del género *Candida* en tinción de Gram a partir de una muestra de exudado cervicovaginal.



Tinción de Gram de una muestra de exudado cervicovaginal donde se aprecian más de cuatro levaduras en el campo enfocado a 100x en microscopio óptico. (Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del INPer, Isidro Espinosa de los Reyes)

En la fotografía tomada en el laboratorio se observa un extendido de exudado cervicovaginal teñido a partir de la técnica de Gram, en la cual las levaduras normalmente se aprecian de color violeta debido a que su pared retiene el colorante primario, sin embargo pueden sufrir decoloración y tomar una coloración rojiza al agregar safranina. En los casos donde la infección es causada por *Candida* es notoria la presencia de sus estructuras y principalmente se detectan en promedio más de 4 levaduras por campo al revisar la muestra microscópicamente. Esta prueba sirvió como apoyo para comparar los resultados obtenidos en el examen en fresco ya que permitió apreciar el tipo de bacterias y confirmar la presencia de levaduras que teñidas se pudieron apreciar de una mejor manera.

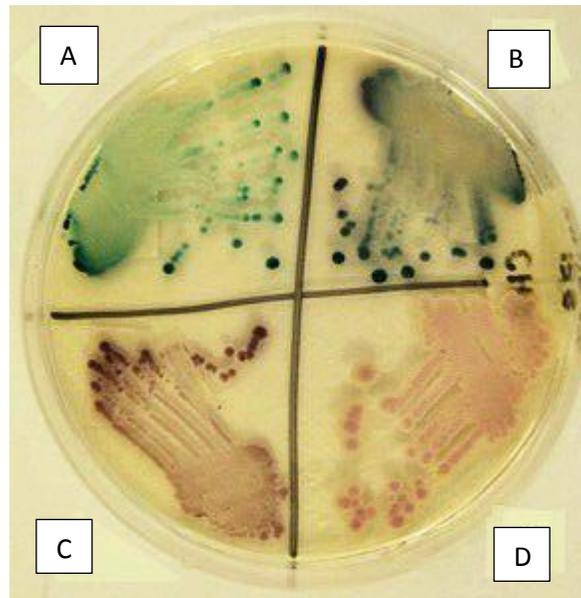
Figura 15. Pseudohifas y pseudomicelio de *C. albicans* en tinción de Gram a partir de una muestra de exudado cervicovaginal.



La imagen corresponde a una muestra de exudado cervicovaginal teñida con Gram y positivo para candidosis vaginal enfocado a 100x. (Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del INPer, Isidro Espinosa de los Reyes)

La fotografía muestra levaduras, pseudohifas y pseudomicelios que fueron detectados a partir de la tinción de Gram realizada a una muestra con las características propias de candidosis vaginal. Cuando *Candida* se encuentra en su fase parasitaria es posible encontrar dichas estructuras, excepto cuando el agente etiológico es *Candida glabrata* y es muy probable que la paciente presente signos y síntomas que apoyan al diagnóstico. Realizar la tinción de Gram fue de suma importancia porque gracias a la coloración se pudieron apreciar con claridad las estructuras levaduriformes y además el tipo de bacterias acompañantes, lo que ayudó a determinar si se trataba únicamente de muestras con candidosis o combinada con vaginosis bacteriana.

Figura 16. Desarrollo de colonias del género *Candida* en Cromoagar orientador para levaduras.



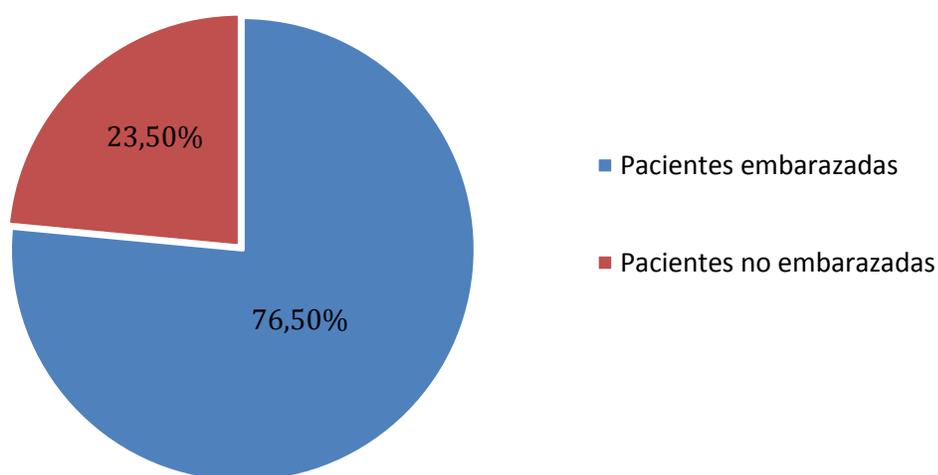
Se observa una placa de cromoagar orientador para levaduras con colonias aisladas de diferentes especies de levaduras del género *Candida*: A) Colonias de *Candida albicans* se desarrollan de color verde; B) *Candida tropicalis* se caracteriza por colonias azules en este medio de cultivo; C) Colonias moradas o violeta pertenecientes a *Candida glabrata*; D) Para *Candida krusei* se aprecian colonias en color rosa o lila en cromoagar orientador. (Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del INPer, Isidro Espinosa de los Reyes)

El uso de cromoagar orientador ha sido de gran utilidad en el diagnóstico de candidosis, en la fotografía se observa el crecimiento de las especies de *Candida* que se aislaron con mayor frecuencia en muestras clínicas de exudado cervicovaginal: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*, las cuales se diferencian fácilmente gracias a que su coloración es distinta, esto se debe a que cada una de ellas cuenta con enzimas específicas que utilizan como sustrato a los diferentes agentes cromogénicos contenidos en el medio de cultivo. El desarrollo de las diferentes levaduras en este medio de cultivo fue importante para el diagnóstico definitivo de candidosis, sin embargo la especie de todas las levaduras se confirmó a través del sistema automatizado Vitek 2 compact cuyos resultados obtenidos coincidieron con los del cromoagar orientador, demostrando así que su uso es confiable.

Tabla 1.- Prevalencia de pacientes embarazadas y no embarazadas atendidas en el INPer, de las cuales se obtuvieron 200 muestras positivas para candidosis vaginal.

Pacientes	Número de pacientes	%
Embarazadas	143	76.5
No embarazadas	44	23.5
TOTAL	187	100

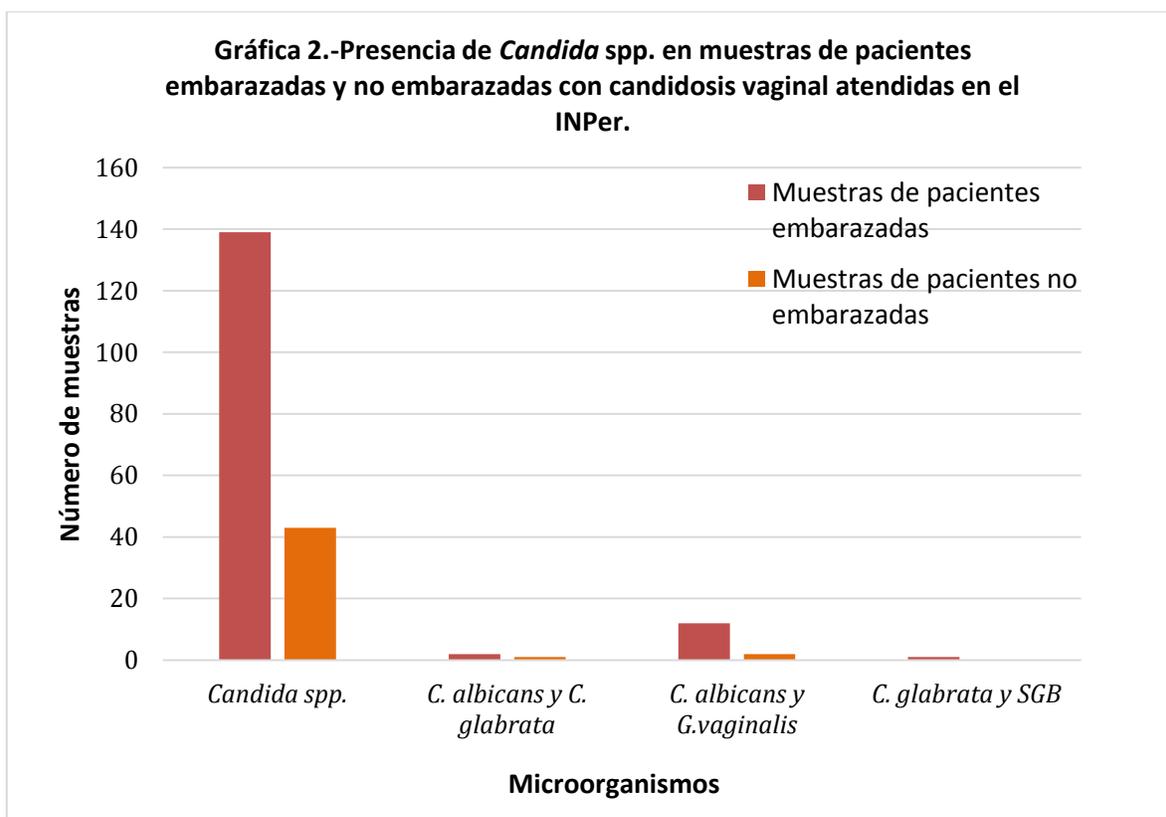
Gráfica 1.- Frecuencia de pacientes embarazadas y no embarazadas atendidas en el INPer, de las cuales se obtuvieron 200 muestras positivas para candidosis vaginal.



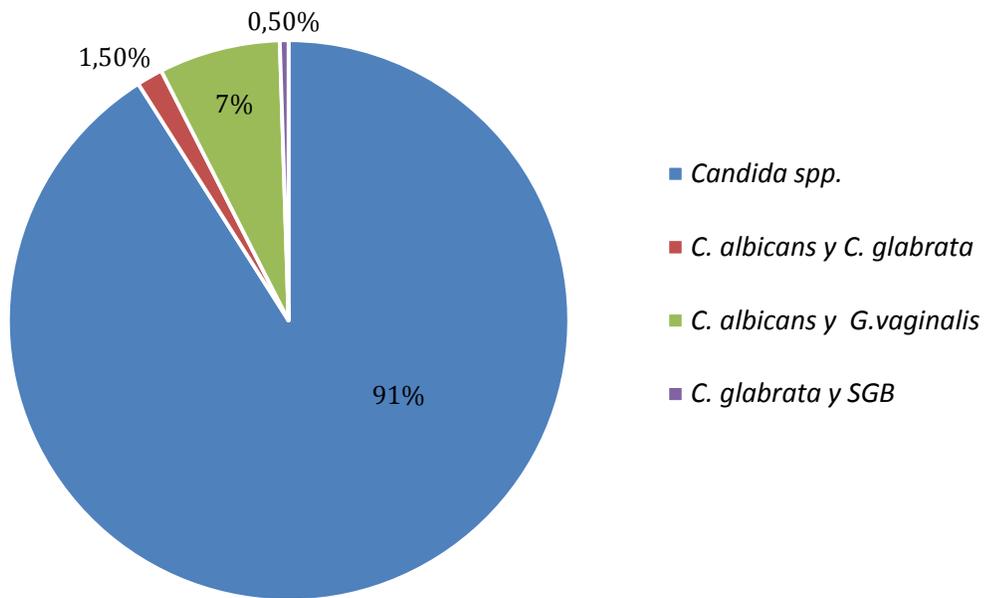
La gráfica 1 representa el total de pacientes que obtuvieron un cultivo cervicovaginal positivo para alguna de las diferentes especies de *Candida*, de las cuales 143 fueron mujeres embarazadas representando un 76.5% y el 23.5% restante correspondió a 44 mujeres no embarazadas, siendo así un total de 187 mujeres que contribuyeron a la recolección de 200 muestras diferentes. Esto se debe a que 13 de las muestras pertenecieron a mujeres con infecciones recurrentes que volvieron al laboratorio para una nueva toma, probablemente después de un tratamiento médico, pero obtuvieron nuevamente un resultado positivo.

Tabla 2.- Presencia de *Candida* spp. como microorganismo único o como infección mixta en muestras de pacientes embarazadas y no embarazadas con candidosis vaginal atendidas en el INPer.

Microorganismos	Muestras de pacientes embarazadas	Muestras de pacientes no embarazadas	TOTAL	%
<i>Candida</i> spp.	139	43	182	91
<i>Candida albicans</i> y <i>Candida glabrata</i>	2	1	3	1.5
<i>Candida albicans</i> y <i>Gardnerella vaginalis</i>	12	2	14	7
<i>Candida glabrata</i> y <i>Streptococcus</i> del grupo B	1	0	1	0.5
TOTAL	154	46	200	100



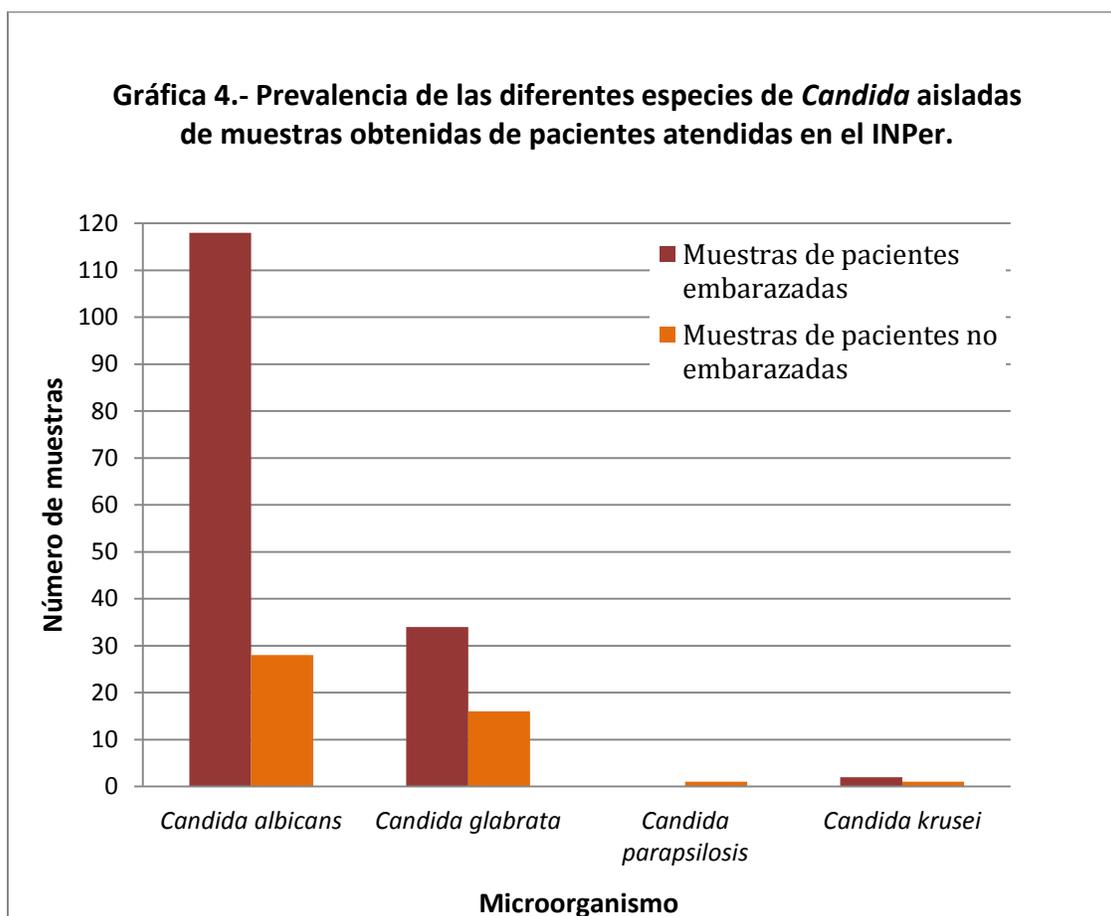
Gráfica 3.- Frecuencia de muestras de pacientes embarazadas y no embarazadas con candidosis vaginal atendidas en el INPer.



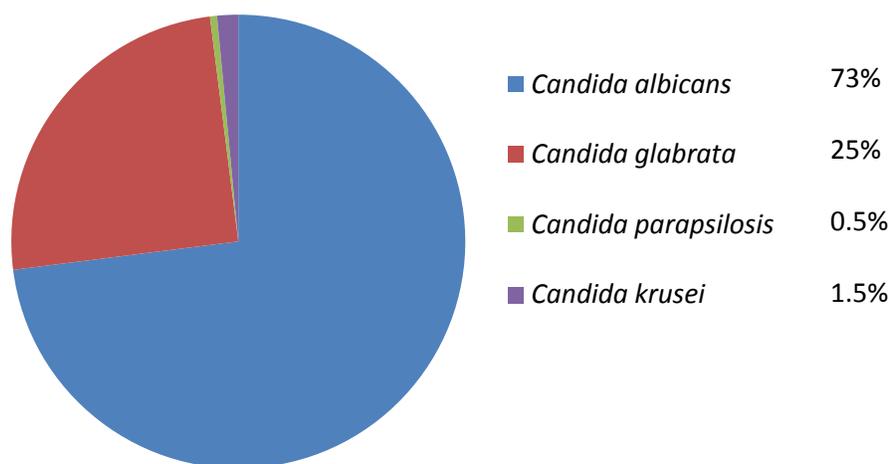
En la gráfica 2 se observa la presencia de *Candida* como único agente patógeno causante de infección vaginal, la cual se detectó en 182 de las 200 muestras analizadas, representando el 91% de ellas; mientras que las infecciones mixtas ocuparon un porcentaje menor como se puede apreciar en la gráfica 3. El 7% en el caso de *Candida albicans* y *Gardnerella vaginalis*, 1.5% para *Candida albicans* y *Candida glabrata* y el 0.5% restante en infección por *Candida glabrata* y *Streptococcus* del grupo B; sin embargo, en todos los casos se obtuvo una mayor frecuencia en muestras de pacientes embarazadas como se desglosó en la tabla 2.

Tabla 3. - Prevalencia de las diferentes especies de *Candida* aisladas de muestras obtenidas de pacientes atendidas en el INPer.

Microorganismo	Muestras de pacientes embarazadas	Muestras de pacientes no embarazadas	TOTAL	%
<i>Candida albicans</i>	118	28	146	73
<i>Candida glabrata</i>	34	16	50	25
<i>Candida parapsilosis</i>	0	1	1	0.5
<i>Candida krusei</i>	2	1	3	1.5
TOTAL	154	46	200	100



Gráfica 5.- Frecuencia de las diferentes especies de *Candida* aisladas de muestras obtenidas de pacientes atendidas en el INPer.

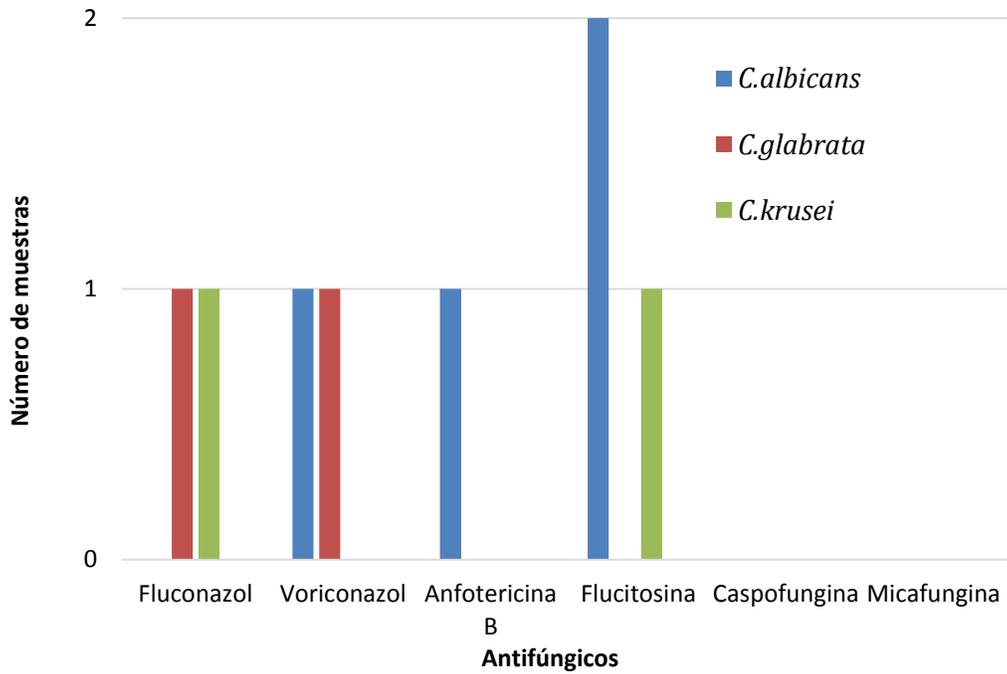


La tabla 3 muestra las cuatro especies de *Candida* aisladas a partir de 200 muestras positivas para candidosis, de las cuales *C. albicans* fue la especie que tuvo mayor prevalencia tanto en muestras de pacientes embarazadas como no embarazadas, seguido de *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* como se muestra en la gráfica 4; mientras que en la gráfica 5 se aprecia la frecuencia de cada una de ellas.

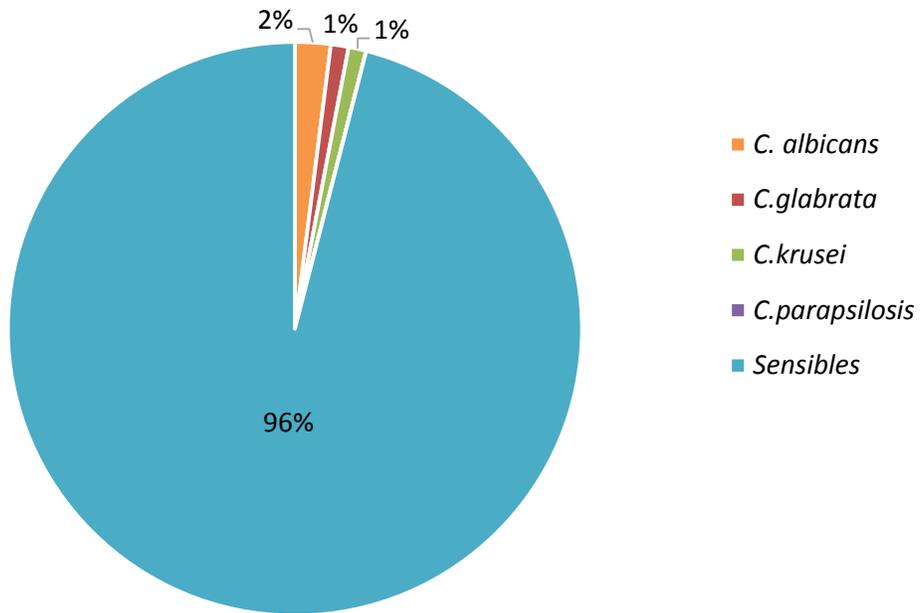
Tabla 4.- Especies de *Candida* que mostraron resistencia a antifúngicos a partir del panel de sensibilidad montado en sistema automatizado Vitek 2 compact.

Especie	Fluconazol	Voriconazol	Anfotericina B	Flucitosina	Caspofungina	Micafungina	TOTAL	%
<i>C.albicans</i>	0	1	1	2	0	0	4	2
<i>C.glabrata</i>	1	1	0	0	0	0	2	1
<i>C.krusei</i>	1	0	0	1	0	0	2	1
<i>C.parapsilosis</i>	0	0	0	0	0	0	8	4

Gráfica 6.- Resistencia de *Candida* spp. a diferentes antifúngicos a partir de panel de sensibilidad montado en sistema automatizado Vitek 2 compact.



Gráfica 7.- Frecuencia de cepas de *Candida* spp. resistentes a antifúngicos a partir de panel de sensibilidad montado en sistema automatizado Vitek 2 compact.

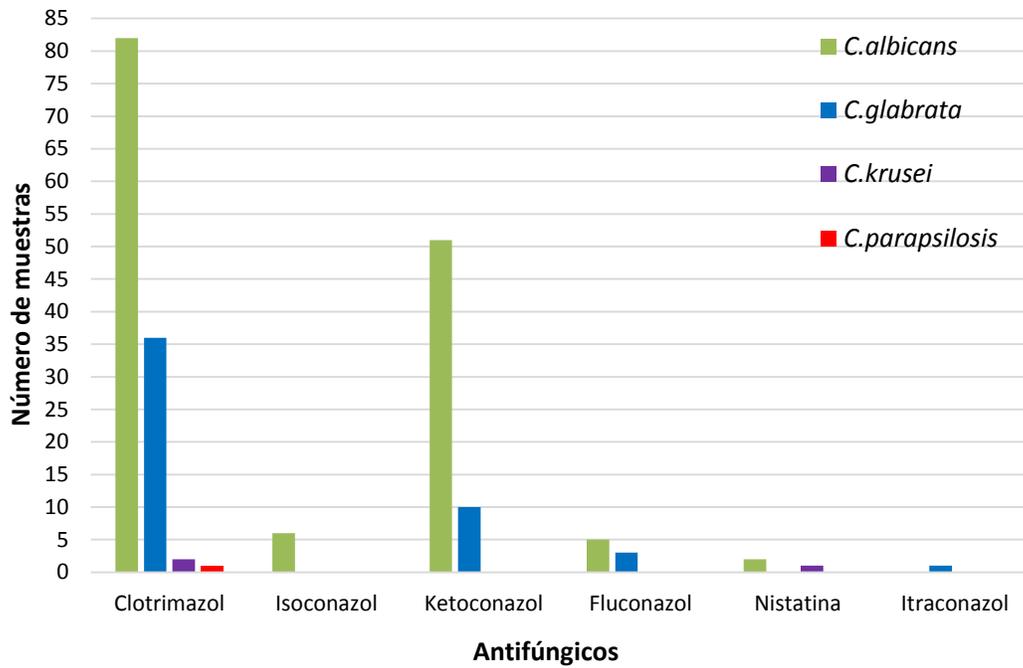


En la tabla 4 se describen los seis antifúngicos probados en el panel de sensibilidad Vitek 2 para levaduras, los cuales se utilizaron para cada uno de los cultivos positivos en los cuales se identificó la especie y se obtuvieron los resultados mostrados en la gráfica 6, donde se aprecia que la especie que tuvo mayor resistencia fue *C. albicans*, tanto a Flucitosina como a Voriconazol y Anfotericina B, seguido de *C. glabrata* y *C. krusei* a Fluconazol, Voriconazol y Flucitosina; mientras que *C. parapsilosis* no mostró resistencia a ninguno de estos antifúngicos. De esta manera se dedujo que el 4% de las cepas obtenidas de los cultivos tuvieron resistencia por uno o más de los antifúngicos probados y por lo tanto el 96% restante pertenece a cepas sensibles a los mismos como se aprecia en la gráfica 7.

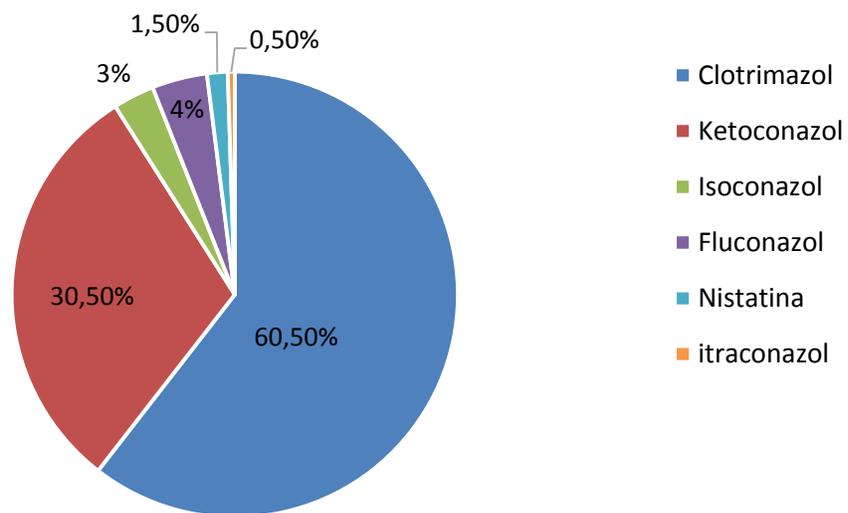
Tabla 5.- Antifúngicos indicados como tratamiento de candidosis vaginal para las diferentes especies de *Candida* aisladas en muestras de pacientes embarazadas atendidas en el INPer.

Antifúngico	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	TOTAL	%
Clotrimazol	82	36	2	1	121	60.5
Isoconazol	6	0	0	0	6	30.5
Ketoconazol	51	10	0	0	61	3
Fluconazol	5	3	0	0	8	4
Nistatina	2	0	1	0	3	1.5
Itraconazol	0	1	0	0	1	0.5

Gráfica 8.- Antifúngicos indicados como tratamiento de candidosis vaginal para las diferentes especies de *Candida* aisladas en muestras de pacientes atendidas en el INPer.



Gráfica 9.- Frecuencia de antifúngicos indicados como tratamiento de candidosis vaginal en mujeres atendidas en el INPer.

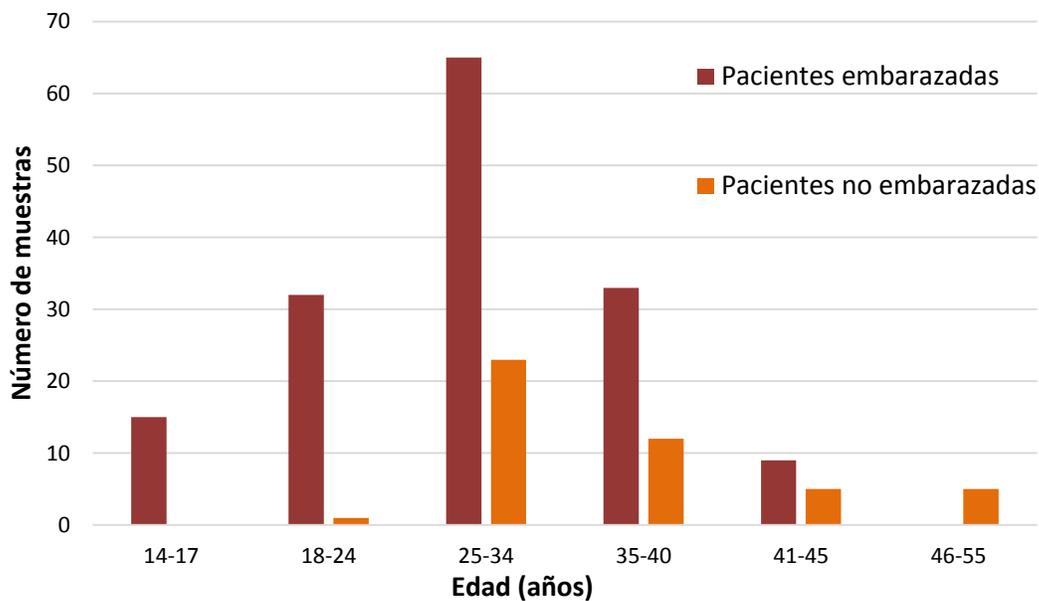


Para cada una de las muestras trabajadas se identificó el tratamiento médico que fue indicado a la paciente, observando en la tabla 5 que son seis los antifúngicos de mayor elección; Clotrimazol fue utilizado en los casos de candidosis causada por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* como se aprecia en la gráfica 8, mientras que Isoconazol solo fue indicado para *C. albicans* e Itraconazol para *C. glabrata*. Por lo tanto, Clotrimazol fue el tratamiento que obtuvo una mayor frecuencia para las diferentes especies causantes de infección vaginal ocupando un 60.5%, mostrado en la gráfica 9, seguido de Isoconazol con el 30.5%, Fluconazol con el 4%, Ketoconazol obtuvo un 3% de elección, Nistatina 1.5% e Itraconazol fue el antifúngico menos indicado con solo un 0.5% de prescripción médica.

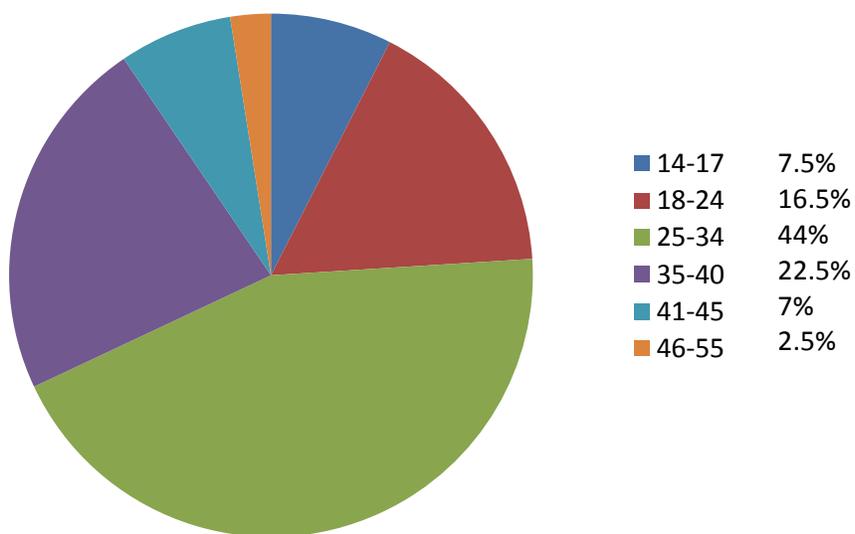
Tabla 6.- Edad de pacientes embarazadas y no embarazadas atendidas en el INPer, de las cuales se obtuvieron las muestras positivas para candidosis vaginal.

Edad (años)	Muestras de pacientes embarazadas	Muestras de pacientes no embarazadas	TOTAL	%
14-17	15	0	15	7.5
18-24	32	1	33	16.5
25-34	65	23	88	44
35-40	33	12	45	22.5
41-45	9	5	14	7
46-55	0	5	5	2.5
TOTAL	154	46	200	100

Gráfica 10.- Rangos de edad de pacientes embarazadas y no embarazadas atendidas en el INPer, de las cuales se obtuvieron las muestras positivas para candidosis vaginal.



Gráfica 11.- Frecuencia de rangos de edad de pacientes atendidas en el INPer, de las cuales se obtuvieron las muestras positivas para candidosis vaginal

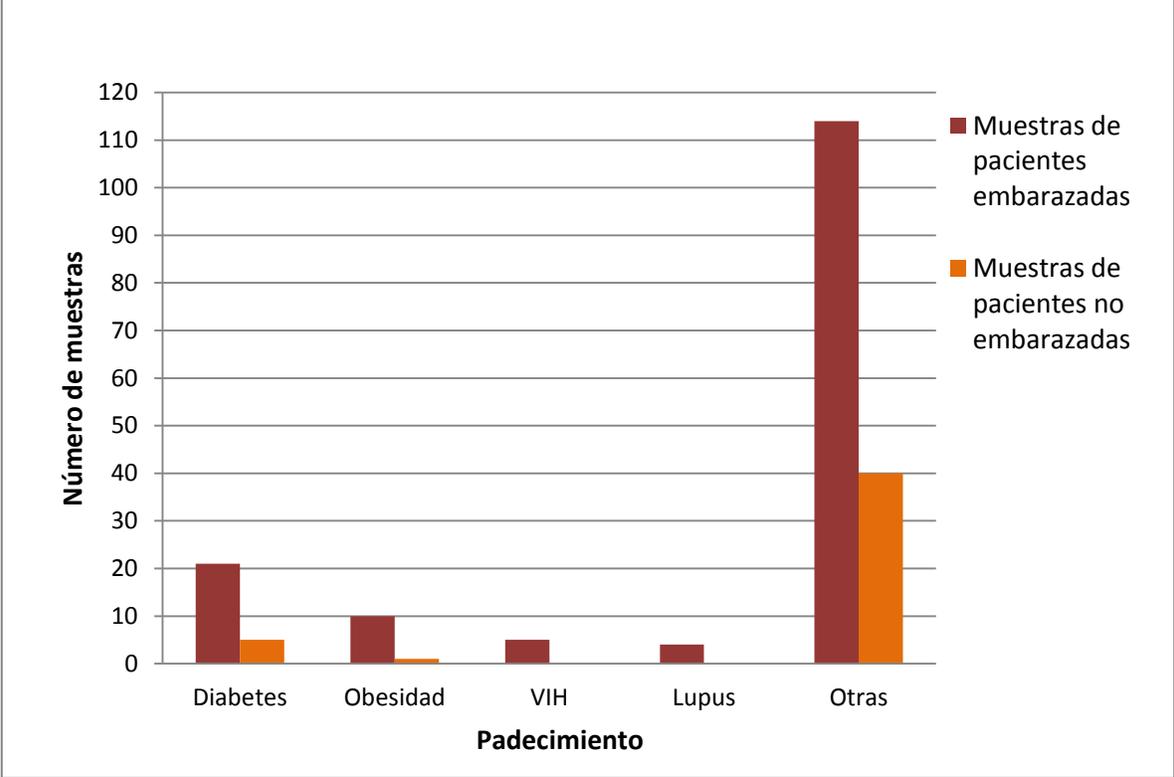


La edad de las pacientes de las cuales se obtuvieron las muestras fue desde los 14 hasta los 55 años, las cuales fueron agrupadas en seis diferentes rangos como se describe en la tabla 6, mientras que en la gráfica 10 se aprecia que las muestras obtenidas de pacientes entre 14 y 17 años de edad fueron solo de embarazadas y a las pacientes de entre 46 y 55 años se les tomo la muestra debido únicamente a problemas ginecológicos. En la mayoría de los casos las muestras pertenecieron a pacientes en edad más fértil, es decir entre 25 y 34 años, lo cual correspondió al 44% de muestras, seguido de un rango entre 35 y 40 años con el 22.5%, el 16.5% correspondió a pacientes entre 18 y 24 años, así como un 7% a pacientes entre 41 y 45 años como se muestra en la gráfica 11.

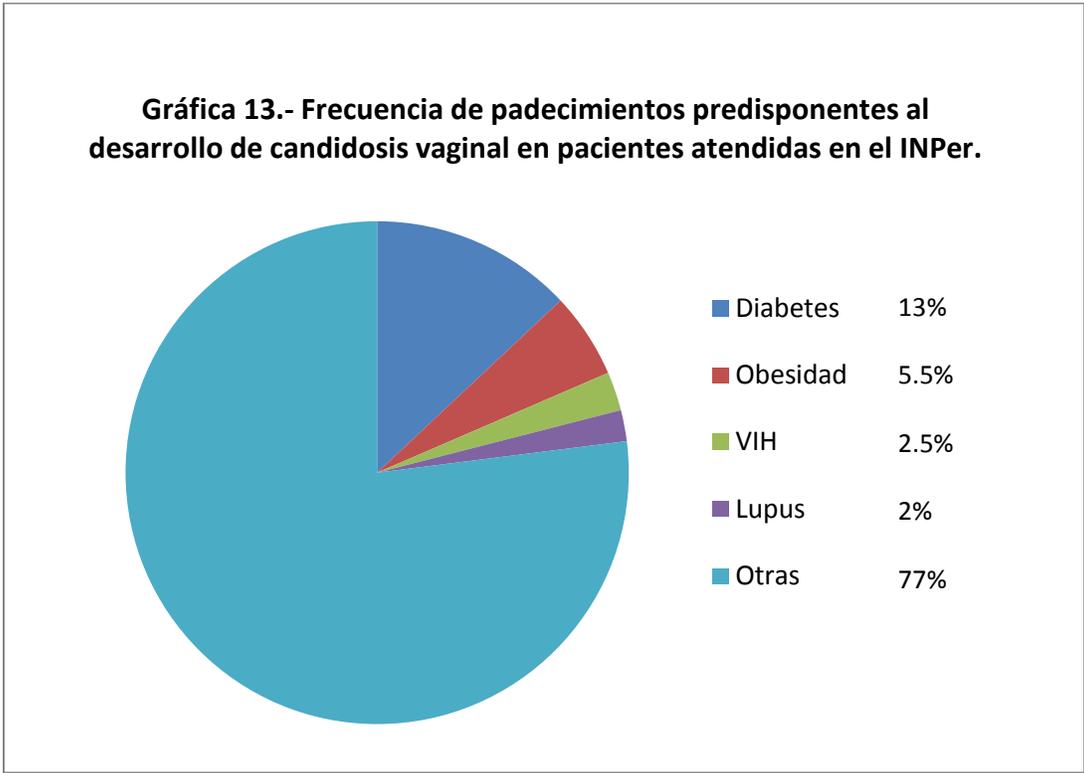
Tabla 7.- Padecimientos predisponentes para el desarrollo de candidosis vaginal en pacientes atendidas en el INPer.

Padecimiento	Muestras de pacientes embarazadas	Muestras de pacientes no embarazadas	TOTAL	%
Diabetes	21	5	26	13
Obesidad	10	1	11	5.5
VIH	5	0	5	2.5
Lupus	4	0	4	2
Otras afecciones	114	40	154	77
TOTAL	154	46	200	100

Gráfica 12.- Padecimientos predisponentes para el desarrollo de candidosis vaginal en pacientes atendidas en el INPer.



Gráfica 13.- Frecuencia de padecimientos predisponentes al desarrollo de candidosis vaginal en pacientes atendidas en el INPer.

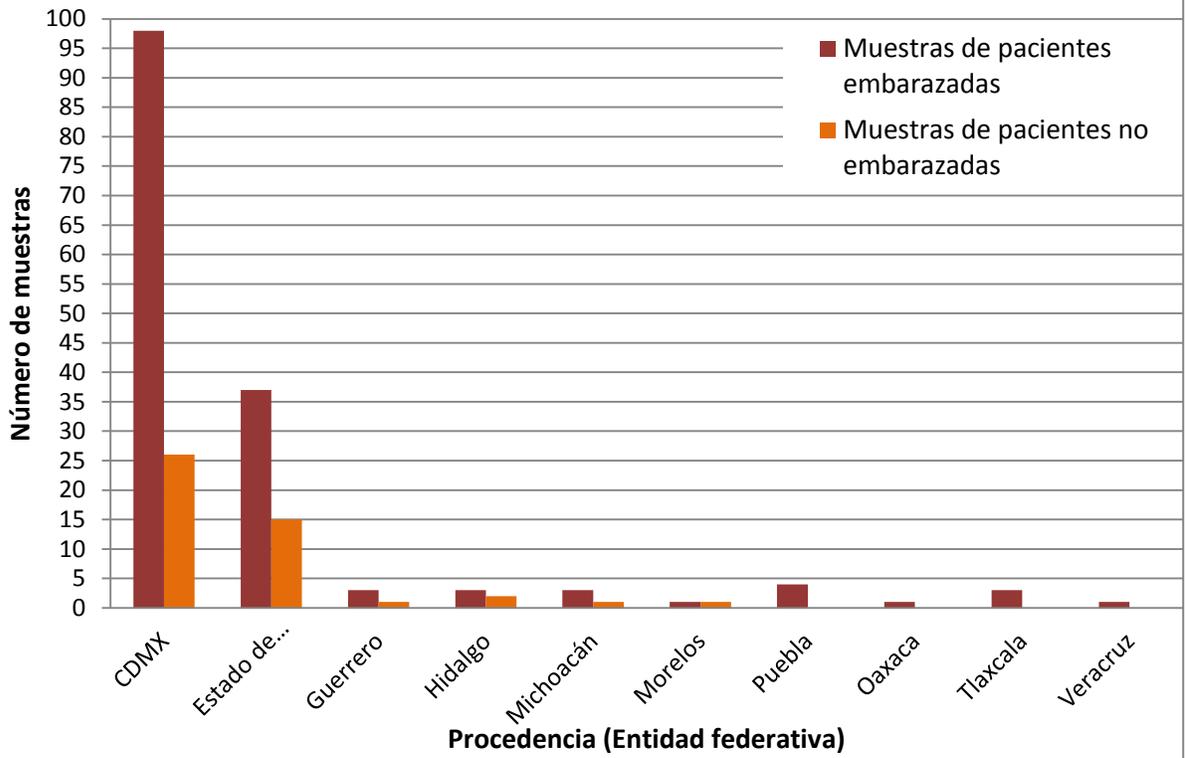


Existen factores que predisponen a las mujeres a padecer uno o varios cuadros de candidosis vaginal a lo largo de la vida, entre ellas algunas enfermedades como lo son la diabetes, obesidad, VIH y lupus principalmente; en la tabla 7 se desglosaron de acuerdo al estado de las pacientes de las cuales se obtuvieron las muestras. En la gráfica 12 se observa que la mayoría de las muestras trabajadas pertenecieron a pacientes que no padecían alguna de estas enfermedades predisponentes pero si contaban con alguna otra afección de salud. En la gráfica 13 se aprecia que entre las enfermedades predisponentes la que obtuvo mayor frecuencia fue la diabetes ocupando un 13% de las muestras, seguido de la obesidad con el 5.5%, posteriormente VIH con el 2.5% y finalmente lupus fue la enfermedad que tuvo menor relevancia entre las muestras positivas a candidosis vaginal.

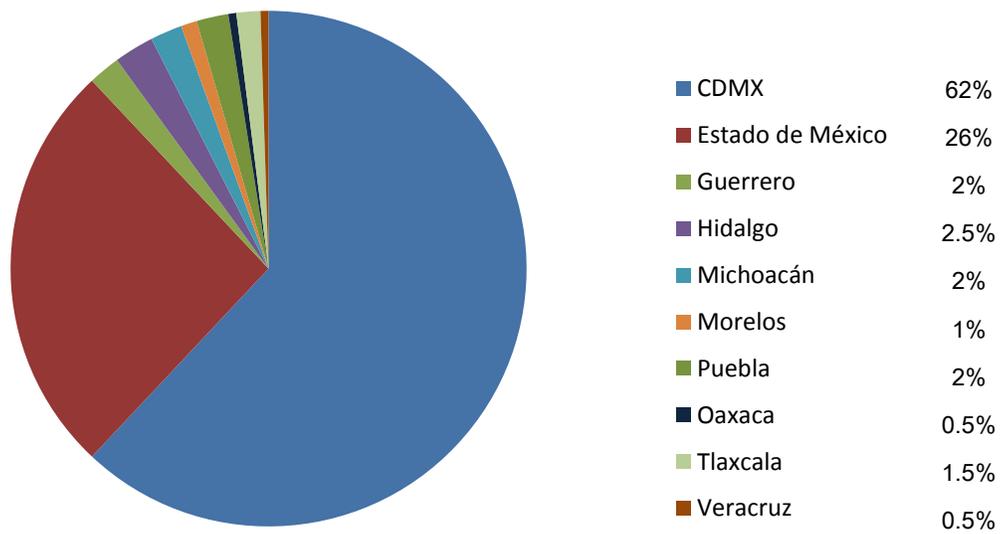
Tabla 8.- Procedencia de pacientes atendidas en el INPer.

Procedencia (Entidad federativa)	Muestras de pacientes embarazadas	Muestras de pacientes no embarazadas	TOTAL	%
CDMX	98	26	124	62
Estado de México	37	15	52	26
Guerrero	3	1	4	2
Hidalgo	3	2	5	2.5
Michoacán	3	1	4	2
Morelos	1	1	2	1
Puebla	4	0	4	2
Oaxaca	1	0	1	0.5
Tlaxcala	3	0	3	1.5
Veracruz	1	0	1	0.5
TOTAL	154	46	200	100

Gráfica 14.- Procedencia de pacientes atendidas en el INPer.



Gráfica 15.- Descripción en porcentaje de la procedencia de pacientes atendidas en el INPer.



La mayoría de las mujeres atendidas en el INPer tienen residencia en la Ciudad de México (CDMX), por lo tanto las muestras obtenidas fueron también en su mayoría pertenecientes a pacientes locales y algunas otras en menor proporción pertenecieron a pacientes foráneas como se describe en la tabla 8. Después de la Ciudad de México, fue el Estado de México el que contó con más cantidad de pacientes que los demás estados de la república como se ve en la gráfica 14, mientras que en la gráfica 15 se describe la frecuencia de cada uno de ellos, la Ciudad de México aportó un 62% de las muestras, seguido del Estado de México con el 26%, Hidalgo con el 2.5%, Guerrero, Michoacán y Puebla con el 2%, Tlaxcala el 1.5%, Morelos 1% y por último Oaxaca y Veracruz con solo el 0.5% de muestras.

9.- Discusión

Se realizó la toma de muestra de exudado cervicovaginal a las pacientes que acudieron al laboratorio de Microbiología y Parasitología del Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes presentando su orden médica, así como la confirmación de datos personales y corroborar que contaran con los requisitos previos a la toma de muestra ya que existen criterios de exclusión para dicho procedimiento, los cuales no permitieron que las pacientes fueran atendidas. Los criterios de exclusión para una toma de muestra de exudado cervicovaginal son:

- Haber mantenido relaciones sexuales 48 horas previas a la toma de muestra
- Ingesta de antibióticos 10 días previos
- Uso de cremas o duchas vaginales
- Presentar sangrado vaginal o encontrarse en su periodo menstrual

Una vez que la paciente refirió estar lista para el procedimiento se inició la toma de muestra (Anexo1), donde se observó el aspecto, cantidad y color de la secreción producida; además durante la toma se incluyó un breve cuestionario verbal donde la paciente respondió acerca de los signos y síntomas que se pueden presentar ante una infección tales como ardor, prurito, inflamación o dolor, lo cual es de gran utilidad ya que esta información da indicios para la detección de candidosis vaginal y otras infecciones. (Hanon, 2012)

Debido a la importancia que a nivel clínico representa la identificación de la levadura en los casos de candidosis vaginal, sobre todo dentro del INPer donde se atienden únicamente mujeres con diversas complicaciones ginecológicas, se decidió realizar este trabajo donde se logró detectar la infección en todos los casos donde existía sospecha médica, esto a través de la evaluación de cada una de las técnicas diagnósticas utilizadas.

El diagnóstico dentro del laboratorio es fundamental para la detección del agente causal de candidosis, por lo que después de revisar todos los resultados se determinó cuáles de las muestras fueron positivas a candidosis vaginal, para lo cual

debieron cumplir con los siguientes criterios: secreción vaginal grumosa y blanquecina, examen en fresco y tinción de Gram con presencia de pseudohifas, pseudomicelios o detección de cuatro o más levaduras por campo, así como desarrollo característico de colonias en los medios de cultivo y la confirmación de género y especie mediante un sistema automatizado. (Pineda *et al.*, 2017; Unda, 2011)

Se estudiaron así 1800 muestras de exudado cervicovaginal, de las cuales 200 fueron positivas para candidosis vaginal que pertenecieron a 187 pacientes debido a que algunas de ellas presentaron recidivas y volvieron a realizarse el estudio. Un 76.5% de las pacientes eran mujeres embarazadas, de las cuales se obtuvieron 154 muestras, mientras que el 23.5% de pacientes restantes fueron mujeres no embarazadas pero tratadas dentro del INPer debido a problemas ginecológicos o infertilidad contribuyendo con 46 muestras positivas como se describió en la tabla 1 (Prevalencia de pacientes embarazadas y no embarazadas atendidas en el INPer, de las cuales se obtuvieron 200 muestras positivas para candidosis vaginal).

La primera técnica realizada fue el examen en fresco (Anexo 2.1) porque permitió apreciar estructuras que no se fijan en la laminilla para la tinción de Gram como lo son *Trichomonas vaginalis* y eritrocitos, por lo tanto esta prueba sirvió de base para continuar con el estudio de la muestra y detectar en primera instancia si era una probable biota habitual o incluso una infección mixta. La decisión de repetir la prueba en cada una de las muestras fue relevante debido a la adición de KOH al 40% que degradó las estructuras acompañantes y clarificó la muestra, este reactivo es de gran apoyo en el área de Micología para la búsqueda intencionada de hongos, en este caso levaduras que en algunos casos no se apreciaron en la primera revisión del examen en fresco y cuyos resultados se pueden ver en las figuras 12 (Levaduras de *Candida glabrata* en examen en fresco con KOH al 40% a partir de una muestra de exudado cervicovaginal) y 13 (Pseudomicelio de *C.albicans* en examen en fresco con KOH al 40% a partir de una muestra de exudado cervicovaginal). (Castro & Martin, 2007)

La tinción de Gram (Anexo 2.2) se revisó con objetivo de inmersión en al menos 20 campos, sin embargo se realizó por duplicado y revisando todos los campos para confirmar la presencia de levaduras y pseudomicelios los cuales fueron visibles también en algunas muestras que no lo presentaron en el examen en fresco, esto debido a que en el fresco la muestra se diluye dentro de la solución salina y en un extendido para la tinción la muestra se concentra en ciertas partes de la laminilla permitiendo de manera más frecuente el hallazgo; así mismo pudieron determinarse bacterias Gram+ o - en el caso de infecciones mixtas. Por esta razón, es importante realizar esta técnica y complementarla con el examen en fresco, ya que el resultado se confirma una vez que se obtiene el desarrollo en medios de cultivo. Además al observar las levaduras tanto en fresco como en Gram, se pudo hacer un conteo de las mismas y detectar si en promedio existían más de cuatro levaduras por campo entonces se sospechó de candidosis como se muestra en las figuras 14 (Levaduras del género *Candida* en tinción de Gram a partir de una muestra de exudado cervicovaginal) y 15 (Pseudohifas y pseudomicelio de *C. albicans* en tinción de Gram a partir de una muestra de exudado cervicovaginal). (García & Hernández, 2011)

En todos los casos seleccionados como sospechosos de candidosis hubo crecimiento de levaduras en los medios de cultivo utilizados (Anexo 3) y principalmente en el cromoagar orientador que gracias al desarrollo de color en las colonias permitió detectar la especie causante de la infección como se observa en la figura 16 (Desarrollo de colonias del género *Candida* en cromoagar orientador para levaduras) donde *C. albicans* aparece en color verde y *C. tropicalis* en azul debido a que poseen la enzima hexosaminidasa que utiliza como sustrato al agente cromógeno X-NAG presente en el medio, mientras que *C. glabrata* es color violeta y *C. krusei* rosa debido a que poseen fosfatasa alcalina que toma como sustrato al agente BCIP y así logran desarrollar tonalidades que varían dependiendo de la cantidad de enzima y color natural de cada especie. (Alfonso *et al.*, 2010)

Esto pudo confirmarse a través de la técnica establecida para el sistema automatizado Vitek 2 compact (Anexo 4) que en menos de 24 horas fue capaz de

obtener género y especie porque utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos y sustratos en cada una de las pruebas individuales para determinar las actividades metabólicas características de cada microorganismo y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática. Gracias a esta técnica se obtuvo también el panel de sensibilidad para cada una de las diferentes cepas donde el 96% de las muestras mostraron sensibilidad a los antifúngicos probados: fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina, anfotericina B y flucitosina. Como se muestra en la gráfica 6 (Frecuencia de cepas de *Candida* spp. resistentes a antifúngicos a partir de panel de sensibilidad montado en sistema Vitek 2 compact) solo un 2% de las muestras positivas a *C. albicans* fueron resistentes a alguno de los antifúngicos ya mencionados, mientras que *C. glabrata* y *C. krusei* lo hicieron solo en 1% cada una, obteniendo una mayor frecuencia de resistencia a Flucitosina. (Jordá *et al.*, 2005)

El comportamiento de resistencia se da cuando el hongo continúa creciendo y produciendo sintomatología a pesar de que la concentración del antifúngico es máxima en el lugar de infección pero si la paciente tiene compromiso grave de la respuesta inmune no va a ser capaz de eliminar el patógeno; aunque también influye el uso de estos fármacos como profilaxis, de manera empírica y la automedicación. Sin embargo en este caso los resultados obtenidos son útiles a nivel epidemiológico debido a que en el panel de sensibilidad no se incluyen todos los antifúngicos de uso común de los cuales se puede obtener dicha información realizando las pruebas de forma manual en casos donde el médico lo requiera. (Ochiuzzia *et al.*, 2014)

La determinación en conjunto sirvió para evaluar las 2 técnicas de confirmación del diagnóstico ya que en todos los casos los resultados obtenidos por el cromoagar coincidieron con los reportados por el Vitek 2 compact, por lo tanto el uso de cualquiera de ellos puede dar un resultado certero y definitivo siempre y cuando el color de las colonias en cromoagar no sea dudoso.

Las muestras obtenidas para la realización del estudio se tomaron a pacientes de entre 14 y 55 años de edad, resultando una edad promedio de 30 años debido a que los casos de infección prevalecen durante la edad reproductiva que es la etapa en la cual se ve más alterada la biota habitual vaginal debido a los diversos factores

que alteran el pH ácido vaginal como lo son el uso de anticonceptivos, duchas vaginales, ropa ajustada que aumenta la humedad en la zona, tampones o toallas sanitarias y una vida sexual activa. (Guía de práctica clínica, 2008)

La frecuencia de candidosis vaginal fue mayor en pacientes embarazadas porque *Candida* spp. es un hongo oportunista y su proliferación no solo depende de cambios en el pH vaginal sino prioritariamente del estado inmune ya que el embarazo es una etapa en la cual hay un marcado aumento en las concentraciones de hormonas como el estrógeno, lo cual se correlaciona con el aumento del glucógeno en el tejido vaginal y produce un ambiente rico en carbono para el desarrollo de candidosis. (Pineda *et al*, 2017)

En el 91% de las muestras se encontró *Candida* spp. como único agente causal de la infección, el resto correspondió a infecciones mixtas principalmente por *C. albicans* con *G. vaginalis* en un 7%, *C. albicans* con *C. glabrata* correspondieron al 1.5% y la infección mixta menos frecuente fue *C. glabrata* y *Streptococcus* del grupo B como se describió en la tabla 2 (Presencia de *Candida* spp. como microorganismo único o como infección mixta en muestras de pacientes embarazadas y no embarazadas con candidosis vaginal atendidas en el INPer) y gráfica 3 (Frecuencia de muestras de pacientes embarazadas y no embarazadas atendidas en el INPer); esto ocurre principalmente en casos donde las pacientes se encuentran mayormente expuestas a los factores de riesgo o el desajuste en la biota habitual vaginal permite la colonización de otros microorganismos. (Ciudad, 2007; Nester, 2007)

C. albicans es la especie que apareció con mayor frecuencia debido a su facilidad para adherirse al epitelio vaginal y de reproducirse en un ambiente cálido y húmedo, además al ser un microorganismo que forma parte de la biota normal vaginal es fácil que su proliferación se lleva a cabo ante algún factor que altere la zona como lo son el cambio de pH y descenso de *Lactobacillus* sp., o estados de inmunocompromiso tales como el embarazo, o enfermedades como SIDA, obesidad y diabetes.

C. albicans estuvo presente tanto en mujeres embarazadas como en no embarazadas como puede verse en la gráfica 4 (Prevalencia de las diferentes especies de *Candida* aisladas en las 200 muestras obtenidas de pacientes atendidas en el INPer), ocupando un 73% del total de las muestras representado en la gráfica 5 (Frecuencia de las diferentes especies de *Candida* aisladas de muestras obtenidas de pacientes atendidas en el INPer); mientras que *C. glabrata* ocupó un 25% del total de muestras obtenidas, siendo la segunda especie más frecuente ya que es cada vez más común encontrarla en casos de candidosis en general. La candidosis vaginal originada por *C. krusei* mostró un 1.5% de frecuencia y *C. parapsilosis* solo un 0.5% del total de las muestras estudiadas, siendo estas difíciles de encontrar a nivel vaginal. Ambas especies tuvieron una menor frecuencia debido a que no forman parte de la biota habitual vaginal, por lo tanto son adquiridas de forma exógena. (Castrillón et al., 2005)

Las opciones de tratamiento para la candidosis vaginal es amplia debido a que la mayoría son causadas por *C. albicans* cuyas cepas son en su mayoría sensibles a antifúngicos y normalmente este tipo de infección no suele complicarse al menos que las pacientes se encuentren en un estado de salud grave. En la gráfica 9 (Frecuencia de antifúngicos indicados como tratamiento de candidosis vaginal en mujeres atendidas en el INPer) se muestran las frecuencias de los antifúngicos indicados a las pacientes del INPer de las cuales se obtuvieron las muestras trabajadas; en el 60.5% de las muestras se optó por clotrimazol, seguido de isoconazol con el 30.5%, fluconazol en un 4%, ketoconazol 3%, nistatina con el 1.5% y el menos frecuente fue itraconazol con el 0.5%, notando que los de mayor elección fueron los azoles que inhiben al citocromo P-450 a través de la inactivación de la enzima C-14- α -demetilasa, interrumpiendo la síntesis del ergosterol en la membrana celular y el crecimiento del hongo, además dichos fármacos son de venta libre y sus presentaciones farmacéuticas se prestan a tratamientos cortos facilitando su uso contra infecciones genitales, mientras que los antifúngicos menos prescritos fueron los polienos cuyas presentaciones farmacéuticas son muy variadas y con tratamientos largos donde su acción es unirse al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de

la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes, causando así la muerte celular. (García et al., 2006)

Así como el embarazo es un factor predisponente para desarrollar infección vaginal por el género *Candida*, existen también otros padecimientos que se vieron involucrados entre las posibles causas o factores que comprometen el estado de salud de las pacientes, haciendo que las levaduras proliferaran produciendo una infección. Un 13% de las muestras obtenidas pertenecieron a mujeres con diabetes, de las cuales 21 de correspondieron a pacientes embarazadas, como se muestra en la gráfica 12 (Padecimientos predisponentes para el desarrollo de candidosis vaginal en pacientes atendidas en el INPer) y ambos factores generaron una mayor probabilidad de padecer candidosis vaginal. Seguido de la diabetes, se encontró que un 5.5% de las muestras estudiadas fueron tomadas a pacientes con obesidad en sus diferentes grados, incluso dicha enfermedad obtuvo una frecuencia por encima de la generada por pacientes con VIH que fue de 2.5% y lupus con el 2%, deduciendo así que la obesidad es un factor predisponente a la infección que cada vez toma mayor fuerza en el ámbito epidemiológico y existen ahora más evidencias del porque se ha convertido en un problema de salud en México. (García et al., 2006; Pineda et al, 2017)

El padecer alguna enfermedad crónica degenerativa o alguna otra que genere inmunocompromiso es una situación que eleva las posibilidades de presentar candidosis vaginal, ya que como se observa en la gráfica 13 (Frecuencia de padecimientos predisponentes al desarrollo de candidosis vaginal en pacientes atendidas en el INPer), el 77% de las muestras se obtuvieron de pacientes con padecimientos distintos a los que normalmente se conocen como predisponentes para el desarrollo de la infección por *Candida* spp. Esto significa que existen otras patologías que pudieran estar relacionadas a la infección, en esta investigación algunas de ellas fueron problemas en la glándula tiroides, enfermedades renales y miomatosis uterina. (Ciudad, 2007; Nester, 2007)

Las pacientes del INPer proceden de diversos estados de la República mexicana debido a que requieren atención médica especializada y según los resultados obtenidos, un 62% de las muestras correspondieron a mujeres con residencia en la Ciudad de México, seguidas de un 26% del Estado de México, mientras que es más difícil el acceso a mujeres con residencia en los estados aledaños, tales como Veracruz o Oaxaca donde el porcentaje de muestras obtenidas de mujeres que viven ahí fue muy bajo, cómo se observa en la gráfica 15 (Descripción en porcentaje de la procedencia de pacientes atendidas en el INPer). Aunado a esto, es probable que muchas pacientes de provincia que requieren ser tratadas no cuenten con atención médica o los recursos necesarios para los servicios de salud y por lo tanto disminuye el número de mujeres procedentes de otros estados del país.

10.- Conclusión

Se anexaron criterios importantes al protocolo de trabajo establecido por el laboratorio de Microbiología y Parasitología del INPer para la detección de candidosis vaginal ya que en el caso del examen en fresco se añadió KOH al 40% que fue de gran apoyo al momento de la revisión microscópica ya que facilitó el hallazgo de levaduras y pseudomicelios; además con la tinción de Gram se pudo corroborar el resultado obtenido del fresco porque las estructuras teñidas se detectaron más fácilmente en el microscopio, se implementó el uso de cromoagar orientador para levaduras y se confirmó el resultado en equipo automatizado Vitek 2 compact, lo que implica un gran aporte al personal de laboratorio en el procesamiento diario de las muestras, comprendiendo así que todas las técnicas aplicadas son importantes y deben realizarse en conjunto para obtener un resultado definitivo y confiable.

La decisión de incluir al cromoagar en la técnica de diagnóstico clínico para la detección de candidosis vaginal fue acertada porque a partir de ahora sirve para otorgar un diagnóstico a tiempo sobre todo cuando la cantidad de muestras recibidas es demandante o cuando existe poca disponibilidad de utilizar el equipo automatizado; sin embargo el sistema automatizado Vitek 2 compact resultó ser un equipo confiable, rápido y de fácil manejo que además maneja panel de sensibilidad a antifúngicos.

Se determinó que *C. albicans* es el principal agente etiológico de la candidosis vaginal en las pacientes del INPer, mientras que otros géneros como *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* pueden aparecer con menor frecuencia ya que a candidosis vaginal se debe a diversos factores, pero en este caso se dió principalmente en pacientes embarazadas, siendo esta situación la que toma mayor fuerza en la población estudiada, mientras que la obesidad fue el segundo en la lista, aun por encima de diabetes y VIH, por lo que la relación que existe entre ambos factores lo convierte en un problema de salud pública.

Se logró obtener una descripción detallada de pacientes con candidosis vaginal, en la que cada una de las muestras provenía de mujeres en diferentes situaciones y por lo tanto los factores que desencadenaron la infección eran también diversas en cada una de ellas. La evaluación de las técnicas y datos obtenidos muestran la importancia de los exámenes de laboratorio en el diagnóstico y por lo tanto en la elección de un tratamiento adecuado.

11.- ANEXOS

11.1.- Toma de muestra de exudado cervicovaginal según el protocolo establecido en el Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes.

Una vez que la paciente refiere estar lista para la toma de muestra, se le indica que se recueste en la camilla del consultorio y se coloque en posición ginecológica para comenzar primeramente con una rápida revisión física en busca de lesiones vulvares, así como el aspecto, cantidad y color de la secreción producida, marcando como sospechosas de candidosis aquellas secreciones con coloración blanquecina o ligeramente amarillenta y aspecto grumoso; además durante la toma se incluye un breve cuestionario verbal donde la paciente responde acerca de los signos y síntomas que se pueden presentar ante una infección tales como ardor, prurito, inflamación o dolor, lo cual es de gran utilidad ya que esta información da indicios para la detección de candidosis vaginal y otras infecciones.

Para cada una de las pacientes se requiere un espejo ginecológico de plástico, tamaño mediano, desechable y estéril, el cual se introduce cuidadosamente por el orificio vaginal a partir de los siguientes pasos:

- Con los dedos pulgar e índice de la mano izquierda se separan los labios mayores para exponer y entreabrir la cavidad vaginal.
- Con la mano derecha se empuña el espejo vaginal para hacer que las valvas coincidan y se cierre correctamente.
- El espejo debe introducirse sin lubricar y disponiendo el ancho de la punta de las hojas o valvas en sentido anteroposterior al orificio vaginal.
- Se dirigen las valvas del espejo cerrado dentro de la vagina a un ángulo de 45°, siguiendo el contorno natural de la pared vaginal posterior.
- Cuando las valvas se hayan introducido casi por completo, se retiran los dedos y se toma el espejo por el mango para poder realizar un doble movimiento de penetración y rotación del espejo en sentido de las manecillas del reloj, de manera que las valvas queden orientadas horizontalmente.

- Se acciona el mecanismo para abrir las valvas parcialmente presionando el elevador del espéculo con el dedo pulgar y apoyando los demás dedos en el mango del espejo.
- Una vez que las valvas se encuentran abiertas se busca el cérvix o cuello uterino que debe estar completamente visible.
- Se toma un hisopo estéril y se introduce para retirar el exceso de secreción en caso de ser necesario.
- Posteriormente se introducen tres hisopos más y se realiza un suave raspado exocervical girando los hisopos y recorriendo toda la superficie para tomar una cantidad de muestra suficiente.
- Una vez que se obtuvo la secreción cervicovaginal en los tres hisopos estériles, uno de ellos se deposita dentro del tubo de ensaye que contiene solución salina fisiológica estéril para la realización del examen en fresco, uno más es útil para el extendido sobre portaobjetos para la tinción de Wright y el último de ellos se requiere para inoculación de los medios de cultivo en las cajas Petri correspondientes a cada uno de ellos: agar gelosa chocolate, agar sangre de carnero, agar sangre humana, agar Mc Conkey, agar Tayer Martin y Chromoagar para levaduras.
- Las observaciones pertinentes al cuestionario, exploración física y características de la secreción obtenida; se reportaron de manera escrita en la papeleta o formato que contenía la información de cada una de las pacientes, separando aquellas que mostraron secreción blanquesina o amarillenta con aspecto grumoso.

11.2.- Procesamiento de muestras de exudado cervicovaginal según el protocolo establecido en el Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes.

2.1.- Examen en fresco

Una vez que se obtiene la muestra para el examen en fresco, los tubos de ensaye se incuban en estufa de CO₂ a 37°C hasta el momento de su revisión, la cual se debe realizar lo más rápido posible de la siguiente manera:

- Se homogeniza muy bien la muestra agitando el hisopo dentro de la solución salina.
- Con ayuda del hisopo se coloca una gota de la mezcla sobre un portaobjetos nuevo y limpio.
- Se cubre con un cubreobjetos nuevo y se observa en microscopio óptico a 40x.
- Se revisan 20 campos recorriendo toda la preparación en forma de zig-zag
- En la muestra se buscan estructuras tales como células epiteliales, células guía, leucocitos, bacilos largos o cortos, eritrocitos y levaduras, las cuales se reportan con cruces dependiendo del número de células por campo; es decir de una a cinco células correspondió una cruz, de seis a diez se colocan dos cruces, de once a quince fueron tres cruces y de quince células en adelante se reporta con cuatro cruces.
- También se reporta la presencia o ausencia de otras estructuras tales como *Trichomonas vaginalis*, espermatozoides y pseudohifas o pseudomicelios correspondientes a levaduras.
- La preparación se desecha en contenedor rígido para vidrio.

Para la búsqueda específica de estructuras levaduriformes se realiza una segunda revisión de las muestras para corroborar los primeros resultados pero añadiendo una gota de hidróxido de potasio al 40% para clarificar la preparación y detectar fácilmente levaduras y pseudohifas.

11.2.2.- Tinción de Gram.

Una vez que se obtiene la muestra, la secreción contenida en uno de los hisopos se dispersa a lo largo de un portaobjetos nuevo y limpio para realizar la tinción de Gram a través de los siguientes pasos:

- Se deja secar al aire la preparación durante 10 minutos.
- Se colocan de forma horizontal todos los portaobjetos sobre el puente de tinción.
- Se coloca a cada una de las muestras de tres a cuatro gotas de colorante cristal violeta hasta cubrir toda la preparación y se activó el cronometro de inmediato hasta llegar a 60 segundos.
- Una vez que transcurrió un minuto, se decanta el colorante y se eliminó el exceso del mismo con ayuda de una piseta con agua de la llave.
- Posteriormente se colocan de tres a cuatro gotas de lugol activando nuevamente el cronometro inmediatamente después de haber cubierto todas muestras.
- Transcurridos 60 segundos se decanta el lugol y se elimina el exceso con agua de la llave.
- Para la decoloración se agregaron de dos a tres gotas de la mezcla alcohol-acetona 1:1 y se enjuaga de inmediato con agua de la llave.
- Por último se añaden de tres a cuatro gotas del colorante safranina activando el cronometro hasta llegar a un minuto.
- Después de haber transcurrido el minuto se decanta y se retira el exceso de colorante con agua de la llave.
- Se colocan todas las preparaciones en una gradilla, acomodándolas de forma horizontal para permitir su secado al aire.
- Aproximadamente 15 minutos después la tinción se encuentra lista para su revisión.
- Se observa una por una en microscopio óptico, enfocando primeramente con el objetivo 40x y posteriormente a 100x colocando una gota de aceite de inmersión sobre la laminilla.
- Se revisan 20 campos recorriendo toda la laminilla en forma de zig-zag.

- En las muestras se buscan estructuras tales como células epiteliales, células guía, polimorfonucleares, bacilos largos gram negativo, bacilos cortos gram variable, cocos gram positivo y levaduras, las cuales se reportan con cruces dependiendo del número de células por campo; es decir de una a cinco células corresponde a una cruz, de seis a diez se colocan dos cruces, de once a quince son tres cruces y de quince células en adelante se reportan con cuatro cruces.
- También se reporta la presencia o ausencia de otras estructuras tales como espermatozoides y pseudohifas o pseudomicelios correspondientes a levaduras.

Si es necesario, se realiza una segunda revisión de las laminillas para corroborar los primeros resultados, revisando todos los campos de la muestra.

11.2.3.- Inoculación y revisión de medios de cultivo

Durante la toma de muestra de exudado cervicovaginal, uno de los hisopos en los cuales se recolecta dicha muestra es útil para inocular las diferentes placas de los medios de cultivo necesarios para el desarrollo de los diferentes agentes patógenos que se encuentran en la muestra, tales como agar gelosa chocolate, agar sangre de carnero, agar sangre humana, agar Mc Conkey, agar Tayer Martin y Chromoagar para levaduras. Dicho procedimiento se realiza de la siguiente manera:

- Se inoculan todas las placas con el hisopo que contiene la muestra, rotando y frotando todo el hisopo sobre el agar.
- Una vez que se inoculan todas las placas, se estrían y extienden las muestras sobre el agar.
- Después de estriar todas las placas, se incuban en estufa de CO₂ a 37°C durante 48 horas.
- Una vez que transcurren las primeras 24 horas se realiza una revisión previa de todas las placas y al cumplir con las 48 horas de incubación, las placas se revisan nuevamente de la misma forma y se determina si se obtuvo desarrollo bacteriano o de levaduras según el caso.

- Conforme se revisan las placas, se retoman los resultados previos tanto del examen en fresco como de la tinción de Gram, verificando que correspondan al crecimiento obtenido en los medios de cultivo.
- En las placas de Chromoagar orientador para levaduras se detectan las colonias principalmente por el color de las mismas, donde colonias color verde corresponden a *Candida albicans*, color rosa a *Candida glabrata*, color violeta a *Candida krusei* y color azul a *Candida tropicalis*.
- Las placas de Cromoagar orientador correspondientes a las muestras positivas se separan del resto para resembrar en agar dextrosa Sabouraud y se incuban en estufa de CO₂ a 37°C durante 24 horas para poder confirmar género y especie de las levaduras mediante un equipo automatizado.

11.3.- Fundamento de los diferentes medios de cultivo requeridos para sembrar una muestra de exudado cervicovaginal.

11.3.1.- Agar gelosa chocolate enriquecido

El agar gelosa chocolate enriquecido es un medio altamente nutritivo donde la peptona de carne y la peptona de caseína son la fuente de nutrientes para el desarrollo de microorganismos, el almidón adsorbe sustancias tóxicas indeseables para el desarrollo de ciertos microorganismos, las sales de fosfato forman un sistema buffer y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Este medio de cultivo puede ser utilizado como base y ser suplementado con otros nutrientes o con antimicrobianos para lograr un medio enriquecido o selectivo según el aditivo, para el caso de las muestras de exudado cervicovaginal se requiere agregar una solución de hemoglobina al dos por ciento y polienriquecimiento para obtener un medio en el cual se puede desarrollar prácticamente cualquier microorganismo como lo son las diferentes especies del género *Streptococcus*, pero a partir de muestras vaginales se recuperan también *Lactobacillus* spp, enterobacterias y levaduras. (Casado, Torrico & Medina, 2012)

11.3.2.- Agar sangre de carnero

El agar sangre es una combinación de un agar base o agar nutritivo con una fuente proteica, al cual se le agrega un cinco por ciento de sangre ovina. Este agar es de suma importancia para apreciar la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos que actúa como factor de virulencia y la cual se observa en este medio de cultivo cuando se forman halos hemolíticos alrededor de las colonias y de esta forma se determina el tipo de hemólisis que posee el microorganismo recuperado. Este medio de cultivo es de utilidad en el proceso de muestras vaginales ya que se desarrollan prácticamente todos los microorganismos involucrados en la biota habitual vaginal pero gracias a que permite detectar el tipo de hemólisis se puede demostrar la presencia de *Streptococcus agalactiae* beta hemolítico el cual es de suma importancia a nivel clínico y si se localiza en vagina es principalmente asociado a ruptura prematura de membranas en mujeres embarazadas y a problemas de infertilidad en algunos casos. (Casado, Torrico & Medina, 2012)

11.3.3.- Agar sangre humana

El agar sangre humana es una combinación de un agar base o agar nutritivo con una fuente proteica, al cual se le agrega un cinco por ciento de sangre humana para el aislamiento e identificación de *Gardnerella vaginalis* ya que esta bacteria es hemolítica en sangre humana, por lo que no es posible apreciar la hemólisis en agar con sangre de animales. *G. vaginalis* es el principal patógeno asociado a infecciones vaginales bacterianas y puede provocar fuertes lesiones en el cérvix, por lo que su detección es de suma importancia. (Casado, Torrico & Medina, 2012)

11.3.4.- Agar MacConkey

El agar MacConkey es un medio ligeramente selectivo, donde la concentración de sales biliares que contiene inhiben los microorganismos gram positivos. El uso de este medio es común en muestras clínicas porque es de gran utilidad cuando se quiere aislar un microorganismo patógeno de zonas con flora microbiana mixta, como lo son las muestras procedentes del sistema respiratorio, de heridas y genitourinarias porque permite la agrupación preliminar de bacterias gram negativas

como lo son las enterobacterias que en algunos casos son causantes de infección vaginal y a la vez estas las diferencia en organismos fermentadores y no fermentadores de lactosa lo cual es de utilidad para llegar al diagnóstico. (Casado, Torrico & Medina, 2012)

11.3.5.- Agar Thayer Martin

Este es un medio selectivo que permite el crecimiento de bacterias patógenas del género *Neisseria*, en el caso de exudados cervicovaginales es *N. gonorrhoeae* el microorganismo de importancia que debido a sus exigencias nutricionales es más difícil aislarlo por lo que este medio de cultivo es ampliamente nutritivo y se logra obtener del mismo modo que el agar gelosa chocolate con el suplemento de polienriquecimiento, mientras que su selectividad para la recuperación de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* se debe a la presencia de el inhibidor V.C.N.T. constituido por vancomicina, colistina, nistatina y trimetoprima que impide el desarrollo de microorganismos gram positivos, negativos y levaduras. (Casado, Torrico & Medina, 2012)

11.3.6.- Cromoagar orientador para levaduras

Es un medio de cultivo selectivo y además diferencial para el aislamiento de hongos donde las peptonas que contiene suministran los nutrientes necesarios para el desarrollo de las colonias y el cloranfenicol inhibe la mayoría de los contaminantes bacterianos, mientras que la mezcla cromógena que caracteriza a este medio está formada por sustratos artificiales que liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas específicas de las levaduras y así es posible diferenciar determinadas especies o detectar ciertos grupos de organismos de forma visual. (Becton Dickinson, 2014)

Al existir sustratos cromógenos en el medio, las colonias de *Candida* spp. se desarrollan de diferente color según la especie, lo que hace posible la detección directa del microorganismo en las placas, por lo que su uso cada vez es más común y práctico en el diagnóstico de diferentes candidosis, incluida la candidosis vaginal donde una gran ventaja de este medio es la fácil detección de cultivos mixtos de

levaduras, gracias a los diferentes colores que presentan sus colonias. (Becton Dickinson, 2014)

Las colonias de *C. albicans* presentan un color verde claro, las colonias de *C. tropicalis* presentan un color azul que se puede tornar verdoso o metálico, *C. glabrata* se desarrolla con una coloración violeta que va de un tono claro a oscuro y las colonias de *C. krusei* presentan un color rosa claro con un borde blancuzco que puede llegar a confundirse con otras especies de levaduras que en este medio produzcan su color crema natural o presenten un color rosa pálido. (Becton Dickinson, 2014)

11.3.7.- Agar dextrosa papa

Este medio es utilizado para el cultivo de hongos pero es recomendado principalmente para microorganismos como levaduras y mohos de importancia clínica ya que puede ser suplementado con ácidos o antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano. La base (infusión de papa) nutricionalmente rica, estimula la esporulación de los mohos y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos, mientras que la dextrosa fomenta el crecimiento exuberante de los hongos. Las levaduras crecen como colonias cremosas que van de un color crema a un color blanco y los mohos se desarrollan como colonias filamentosas que varían en color. (Becton Dickinson, 2014)

11.3.8.- Agar dextrosa Sabouraud

Es un medio no selectivo para el cultivo y mantenimiento de hongos patógenos y no patógenos, en especial dermatofitos. Su pH de entre 5 y 6, así como la dextrosa favorecen el crecimiento de hongos y además tiene un efecto ligeramente inhibitorio para las bacterias contaminantes en muestras clínicas porque contiene cloranfenicol que es un antibiótico de amplio espectro con efecto inhibitorio para una amplia variedad de bacterias gram negativas y positivas. Las levaduras son recuperadas como colonias cremosas que van de una tonalidad blanca a crema según la especie. (Becton Dickinson, 2014)

11.4.- Confirmación del diagnóstico para candidosis en equipo automatizado Vitek 2 compact.

Para hacer uso del equipo automatizado Vitek 2 compact se requieren cepas de 24 horas y con desarrollo en medios de cultivo no diferenciales, por lo que es necesario resembrar las colonias en agar dextrosa Sabouraud y después se determina el microorganismo de la siguiente forma:

- Se requirieron tubos de ensaye de 100x10mm nuevos y limpios los cuales se marcan con el número de muestra correspondiente, se utilizan 2 tubos por muestra.
- Los tubos ya marcados se colocan por pareja en una gradilla y se depositan tres mililitros de solución salina fisiológica estéril en cada uno.
- Se trabaja en todo momento cerca del mechero tomando un inculo pesado de la primera cepa con un asa bacteriológica desechable y estéril, el cual se deposita en el tubo de ensaye correspondiente y se homogeneiza en vortex.
- Una vez obtenida la suspensión del microorganismo, se determina su densidad de acuerdo a la escala del nefelómetro de Mc Farland con ayuda del instrumento Densicheck.
- La suspensión requerida por el equipo Viteck 2 compact para levaduras es de 1.8 a 2.2 en la escala del nefelómetro de Mc Farland, por lo que cada una de las cepas se ajusta a este parámetro pero solo en uno de los tubos correspondientes a esa muestra.
- Una vez que se realiza la suspensión adecuada para todas las cepas, se colocaron los tobos sobre los casets con los que cuenta el equipo, ordenados nuevamente por pareja, es decir cada suspensión de levaduras seguido por el tubo sobrante con solución salina fisiológica estéril.
- Después de colocar todos los tubos sobre los casets del equipo, se realiza una dilución para cada una de las suspensiones donde se depositan 280 microlitros de la suspensión en el tubo con solución salina fisiológica estéril la cual se homogeneiza con la misma propipeta.

- Al terminar las diluciones se colocan las tarjetas YST para identificación dentro de los tubos con suspensión de levaduras y las tarjetas YST-S07 para panel de sensibilidad en los tubos con dilución.
- Una vez colocadas todas las tarjetas dentro de los tubos se introduce el primer caset en el primer compartimento del equipo, se cierra perfectamente y se oprime el botón de inicio.
- Transcurridos pocos segundos el equipo indica el retiro del caset y este se trasladado al segundo compartimento donde nuevamente después de pocos segundos el equipo indica retirar el caset.
- El contenido final dentro del caset son todos los tubos prácticamente vacíos y el canal de llenado de las tarjetas, estos desechos son colocados también en la bolsa roja de PRBI.
- Cada una de las cepas que se introducen al equipo automatizado se registran en el software que maneja la información del mismo y en cual se otorgan datos como número y tipo de muestra, mes y año de recepción.
- Los resultados definitivos se obtienen 24 horas después de que se realiza la introducción de cepas en el equipo, otorgando así género y especie de la levadura causante de la infección.

12.- Referencias

1.- Alfonso, C., López, M., Arechavala, A., Perrone, m., Guelfand, L., & Bianchi, M. (2010).

Identificación presuntiva de Candida spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance Candida Agar. Agosto 18, 2018. Revista Iberoamericana de Micología, 27, pp. 90-93.

2.- Arenas, R. (2011). *Micología médica ilustrada.* México: Editorial Mc Graw Hill.

3.- Aznar, J., Blanco, M., Lepe, J., Otero, L., & Vázquez F. (2007). *Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales.* Marzo 19, 2018, de Procedimientos en Microbiología Clínica, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Sitio web: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>.

4.- Becton Dickinson. (2014). *CHROMagar™ Candida Medium.* Febrero 25, 2018, de Becton Dickinson instrucciones de uso – medios en placa listos para usar, Sitio web: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8810>.

5.- Biasoli, M. (2013). *Candidiosis.* Marzo 20, 2018, de Centro de referencia de Micología, Sitio web: www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIALES_2013/TEORICOS_2013/CANDIDIASIS_2013-1.pdf.

6.- Casado, C., Torrico, G., & Medina, M. (2012). *Medios de cultivo en un laboratorio de Microbiología.* Marzo 2, 2018, de Libros de laboratorio, Sitio web: <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>.

- 7.- Castrillón, L., Rivera, A., & Padilla, C. (2005). *Factores de virulencia en Candida sp.* Dermatología Revista mexicana, 49, pp. 12-27.
- 8.- Castro, C., & Martín, E. (2007). *Diagnóstico de la infección fúngica por levaduras del género Candida: Candida dubliniensis.* Marzo 18, 2018., de Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario de Valme, Sitio web: Sevilla <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/Cdubli nien.pdf>.
- 9.- Ciudad, A. (2007). *Infecciones vaginales por candida: diagnóstico y tratamiento.* Revista peruana de ginecología y obstetricia, 53, pp. 159-1.
- 10.- Díaz, P., Gaona, V., Hernández, J., & Sandoval, M. (2010). *Diagnóstico y tratamiento de candidiasis vulvovaginal en mujeres mayores a 12 años de edad.* Julio 9, 2017, de Secretaria de salud, Sitio web: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/IMSS_609_13_CANDIDOSISVULVOVAGINAL/609GER.pdf.
- 11.- García, H., García, S., Copolillo, M., Cora, E., Barata, A., Vay, C., Torres, R., Tiraboschi, N., & Famiglietti, A. (2006). *Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas: Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos.* Revista Argentina de Microbiología, 38, pp. 9-12.
- 12.- García, P., & Hernández, J. (2011). *Procesamiento de las muestras genitourinarias.* Revista Iberoamericana de Micología, 84, pp.607-611.
- 13.- Guía de práctica clínica. (2008). *Diagnóstico y tratamiento de la vaginitis infecciosa en mujeres en edad reproductiva, en el primer nivel de atención.* Enero 25, 2018., de Secretaria de salud, Sitio web: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html>
- 14.- Hanon, H. (2012). *Candidiasis Vulvovaginal Recurrente: Nuevos protocolos terapéuticos.* Archivos Médicos de Actualización en Tracto genital Inferior. AMATGI, 6, pp.12-15.

- 15.- Jasso, L. (2011). *Infecciones congénitas de baja frecuencia en los neonatos. Algunos aspectos relevantes*. Boletín médico del Hospital Infantil de México, 68, pp.7-20.
- 16.- Jordá, L., Vargas, A., Lanza, A., Bonvehi, P., Nazar, J., Mikietuk, A., Labat, R., & Smayevsky, J. (2005). *Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana*. Acta Bioquímica clínica latinoamericana, 39, pp.19-25.
17. - Koneman, E., Winn, W., Allen, S., Procop, G., Schreckenberger, P., Janda, W., & Woods, G. (2008). *Diagnostico microbiológico*. México: Editorial Medica Panamericana.
- 18.- León, W., Velasco, S., González, F., & Yopez, E. (2014). *Diagnóstico y tratamiento de la infección vaginal en obstetricia. Guía de Práctica Clínica*. Septiembre 6, 2017, de Ministerio de Salud Pública, Sitio web: http://instituciones.msp.gob.ec/documentos/Guias/guias%202014/GPC%20Infeccion_vaginal_obstetrica.pdf
- 19.- Linares, M., & Solís, F. (2007). *Identificación de levaduras*. Agosto 5, 2017, de Revista Iberoamericana de Micología, Sitio web: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>.
20. - Madigan, M., Martinko, J., Bernder S. Kelly., Bucley, D., & Stahi, D. (2015). *Biología de los microorganismos*. Madrid, España: Pearson educación, S.A.
- 21.- Mondejal, L., Martínez, Ca., & Limia, O. (2010). *Diagnóstico y prevalencia de infecciones vaginales*. Junio 3, 2017, de Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología, Sitio web: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X201000020000.
- 22.- Montoya, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Colombia: Universidad de Antioquia.

- 23.- Negroni, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. México: Editorial Medica Panamericana.
- 24.- Nester, E. (2007). *Microbiología humana*. México: El manual moderno.
- 25.- Ochiuzzia, M., Cataldib, S., Guelfandb, L., Maldonadob, I., & Arechavalab, A. (2014). *Evaluación del sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género Candida*. Revista argentina de Microbiología, 47, pp.107-110.
- 26.- Perea, J. (2010). *Infecciones del aparato genital femenino: vaginitis, vaginosis y cervicitis*. Revista Actualización, 10, pp. 3910-3914.
- 27.- Pineda, J., Cortes, A., Uribarren, T., & Castañon, R. (2017). *Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos*. Marzo 21, 2018. Revista Médica Risaralda, 1, pp.38-43.
- 28.- Prats, G. (2008). *Microbiología clínica*. Editorial medica panamericana.
- 29.- Sánchez, J., León, B., Rojas, J., & Muñoz, G. (2017). *Prevalencia de Candida albicans y su relación con cambios en el pH vaginal*. Marzo 22, 2018. Aten Fam, 24, pp.18-22.
- 30.- Sanz, F., García M., González, I., & Girón del Río, R. (2015). *Dermatomicosis por Candida krusei simulando herpes cutáneo*. Marzo 15, 2018. Pediatría Atención Primaria, Sitio web: <https://dx.doi.org/10.4321/S1139-7632201500010001>.
- 31.- Singh, S., Sobel, J., Bhargava, P., Boikov, D., & Vázquez, J. (2002). *Vaginitis por Candida krusei: Epidemiología, aspectos clínicos y terapia*. Febrero 24, 2018. Enfermedades infecciosas clínicas, 35, pp. 1066-1070.
- 32.- Solís, M., Moreno, M., Dávalos, M., Fernández, R., Díaz, O., & Arenas, R. (2014). *Colonización vaginal por Candida spp. Frecuencia y descripción de las especies aisladas en mujeres asintomáticas*. Marzo 18, 2018. Revista de Ginecología y Obstetricia Mexicana, 82, pp. 1-8.

- 33.- Torres, M., Morera, Y., & López, O. (2005). *Candida glabrata: un patógeno emergente*. Marzo 15, 2018. Grupo de Recerca en Micología Experimental y Clínica. Instituto Municipal de investigación Médica. Instituto Municipal de Asistencia Sanitaria. Universidad Autónoma de Barcelona, Sitio web: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/cglabra.pdf>.
- 34.- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- 35.- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2013). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- 36.- Treviño, R., González, J., Garza, E., & González, G. (2012). *Candida parapsilosis, una amenaza desafiante*. Febrero 19, 2018, 14, pp. 157-165.
- 37.- Unda, F., Agüero, J., Fariñas, C., & Martínez, L. (2011). *Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares*. Marzo 17, 2018. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29, pp. 282-285.