

Hernández, Sonia Daniela

Diagnóstico de tricomoniasis urogenital : microscopía vs. cultivo

2019

Instituto de ciencias de la Salud
Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

**Documento descargado de RID - UNAJ (Repositorio Institucional Digital de la
Universidad Nacional Arturo Jauretche)**

Cita recomendada:

Hernández, S. D. (2019). Diagnóstico de tricomoniasis urogenital: Microscopía vs. Cultivo. Universidad Nacional Arturo Jauretche, Florencio Varela.

Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ

[<https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>](https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj)

TRABAJO FINAL



**“DIAGNÓSTICO DE TRICOMONIASIS UROGENITAL:
MICROSCOPIA VS. CULTIVO”**

- **Estudiante:** Hernández, Sonia Daniela.
- **Directora:** Villagra, Andrea Patricia Magdalena.
- **Codirectora:** Togneri, Ana María.
- **Fecha de entrega:** 1 de Julio de 2019.

Instituto de Ciencias de la Salud.

Carrera de Bioquímica.

Año 2019.



▪ Resumen

La tricomoniasis urogenital es la infección de transmisión sexual (ITS) curable más frecuente y la única causada por un parásito. Afecta mayoritariamente a mujeres causando vaginitis, aunque presenta una alta tasa de casos asintomáticos. Constituye un factor de riesgo para la co-infección con otras ITS y de complicaciones maternas y perineonatólogicas durante el embarazo. Los objetivos del trabajo fueron comparar el desempeño metodológico de una técnica de cultivo *in house* respecto al examen microscópico y conocer la frecuencia de la infección en la población estudiada. Se realizó la búsqueda de *Trichomonas vaginalis* en 291 muestras con solicitud de estudio de flujo vaginal. El examen microscópico detectó el parásito en 23 de ellas obteniéndose una sensibilidad de 92% .Mediante la técnica de cultivo se diagnosticaron dos casos adicionales de tricomoniasis, obteniéndose 100% de sensibilidad. La frecuencia de la infección en la población estudiada por ambas técnicas fue de 8,6 %, y utilizando solo microscopía de 7,9 %, mientras que en el mismo período pero del año anterior y solo por microscopía, la frecuencia fue de 4,8%. A pesar del ligero aumento observado en la sensibilidad y la ventaja de detectar el parásito independientemente de la rapidez en el transporte y procesamiento de la muestra, la técnica de cultivo *in house* es laboriosa, costosa, y requiere muchos días de revisión, por lo cual su implementación conlleva demora en el diagnóstico y en consecuencia retraso en la entrega de resultados respecto a la técnica microscópica, que es sencilla, económica y brinda un diagnóstico rápido.

P Á G I N A S

▪ Introducción -----	4
▪ Objetivos -----	6
▪ Nutrición microbiana y medios de cultivo -----	7
▪ Características del parásito <i>T. vaginalis</i> -----	10
▪ Epidemiología -----	13
▪ Fisiopatología de la infección -----	14
▪ Sintomatología y complicaciones -----	17
▪ Asociación con otros patógenos -----	19
▪ Tricomoniasis y embarazo -----	21
▪ Métodos diagnósticos -----	22
▪ Materiales y métodos -----	25
▪ Resultados -----	37
▪ Discusión -----	42
▪ Conclusión -----	44
▪ Referencias bibliográficas -----	45
▪ Anexo -----	47

▪ Introducción

Trichomonas vaginalis es un parásito protozoario unicelular, flagelado y anaerobio, agente etiológico de la infección de transmisión sexual (ITS) de mayor incidencia mundial denominada tricomoniasis urogenital. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el mundo ocurren 143 millones de casos por año, no se ve afectada por variaciones climáticas ni estacionales, y mayoritariamente se halla en poblaciones con niveles socioeconómicos bajos. Esta cifra la posiciona como la ITS curable más frecuente, con el 40% de los casos reportados (1, 2,3).

El varón frecuentemente es portador asintomático del parásito, el cual habita la zona de la uretra sin generar ningún tipo de síntoma, siendo transmitido durante el acto sexual a su pareja. En la mujer, cuando el ambiente vaginal se torna levemente alcalino fisiológica o patológicamente, *T. vaginalis* encuentra el nicho óptimo tanto para su colonización, proliferación, infección y posteriormente transmisión. En muchos casos, este parásito es capaz colonizar y sobrevivir pasando desapercibido en el ambiente genitourinario sometido a constantes fluctuaciones ecológicas y fisiológicas, donde otros microorganismos difícilmente pueden hacerlo. Esta característica es preocupante ya que pueden existir situaciones donde la tricomoniasis vaginal puede ser asintomática, lo que facilita su transmisión. Además, si existen manifestaciones clínicas suelen ser inespecíficas y similares a las causadas por otros microorganismos patógenos urogenitales como *Candida spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*, ya que producen vaginitis y uretritis, por lo que es imprescindible realizar diagnóstico diferencial entre ellos para establecer el tratamiento adecuado (4,5).

En las mujeres gestantes, la infección por *T. vaginalis* está asociada a parto prematuro por ruptura prematura de membranas y riesgo de transmisión vertical perinatal (6, 7,8).

También se conoce que padecer esta infección duplica el riesgo de co-infección con agentes virales de transmisión sexual como el Virus de Inmunodeficiencia Humano (VIH) o Virus del Papiloma Humano (VPH) (7).

Por lo tanto su diagnóstico, no solo permite el un tratamiento terapéutico adecuado, sino que constituye un alerta para la búsqueda de otras enfermedades de transmisión sexual.

Para el diagnóstico de tricomoniasis la técnica utilizada, rápida y económica, es el examen microscópico en fresco, donde se visualiza si el parásito está presente por su morfología y movimiento característico requiriendo de un observador experimentado. Pero, como toda técnica microscópica es inóculo dependiente y no podemos evitar informar falsos negativos cuando el recuento de *T. vaginalis* está por debajo de su sensibilidad. Además, la posible demora en el transporte y observación de la muestra dificulta el diagnóstico, ya que el parásito pierde movilidad y no se puede observar su notorio movimiento, pudiendo pasar por alto su presencia. Esto conlleva a una disminución de la probabilidad de detección a medida que pasa el tiempo desde que se tomó la muestra hasta que se realiza el análisis microscópico (8).

Por esta razón, el método de referencia o *gold standard* es la técnica de cultivo, que si bien es más costosa y requiere más tiempo de proceso, ofrece mayor sensibilidad que la observación en fresco, no depende de la rapidez en el transporte y procesamiento de la muestra y permite darle las condiciones óptimas para que *T. vaginalis* prolifere y se mantenga viable para su detección. Si bien existen medios de cultivo comerciales, puede ser formulados *in house* para reducir costos, como el caldo modificado para *T. vaginalis* puesto en práctica en este trabajo (8, 9,10).

▪ **Objetivos**

Objetivo general: Comparar el desempeño metodológico de la técnica de cultivo respecto al examen microscópico tradicional en el diagnóstico de tricomoniasis urogenital.

Objetivos específicos:

- 1) Poner en práctica un medio de cultivo *in house* para el diagnóstico de tricomoniasis urogenital.
- 2) Determinar el desempeño del medio de cultivo *in house* vs examen microscópico tradicional, por medio de la sensibilidad.
- 3) Evaluar la utilidad de incorporarlo como método diagnóstico en el laboratorio de Bacteriología del Hospital Materno Infantil Dr.Eduardo Oller.
- 4) Determinar la frecuencia de tricomoniasis urogenital en mujeres sintomáticas y asintomáticas y su asociación con otros microorganismos.
- 5) Comparar la frecuencia de tricomoniasis urogenital obtenida con la del mismo período de estudio pero del año anterior.

▪ **Nutrición microbiana y medios de cultivo**

Los microorganismos se componen fundamentalmente de hidrógeno, carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo y en menor proporción de otros elementos. Los centenares de compuestos que existen dentro de una célula viva se forman a partir de nutrientes que están disponibles en el medio. Los elementos que se necesitan en grandes cantidades se denominan macronutrientes, mientras que los metales y compuestos orgánicos (vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas) que se requieren en pequeñas cantidades se denominan micronutrientes (metales traza) y factores de crecimiento respectivamente.

Los medios de cultivo son las soluciones nutritivas que se usan en el laboratorio para el cultivo de los microorganismos. Están compuestos por una mezcla equilibrada de nutrientes que incluyen: una fuente de carbono y energía (glucosa, sacarosa o cualquier otro compuesto carbonado), una fuente de nitrógeno azufre y fósforo (aminoácidos, bases nitrogenadas), un buffer para regular el pH, NaCl y agua que le aporta la humedad (11,12).

Clases de medios de cultivo:

En microbiología, se emplean dos clases generales de medios de cultivo: los químicamente definidos y los no definidos. Los primeros se preparan añadiendo a agua destilada, cantidades precisas de compuestos orgánicos e inorgánicos purificados, conociéndose así su composición química exacta. La fuente de carbono es de central importancia ya que se requiere en grandes cantidades para que exista progenie celular y son utilizados para estudios de requerimientos nutricionales y para obtener resultados reproducibles. Sin embargo en muchos casos la composición exacta de un medio no es importante para el crecimiento de muchos microorganismos y los medios no definidos o complejos pueden ser entonces adecuados o incluso ventajosos por varias razones. Son mezclas complejas y poco definidas de nutrientes preparados a partir de hidrolizados de productos animales o vegetales. Por lo general contienen como fuente de carbono extracto de carne, levadura o malta y como fuente de nitrógeno peptona de soja, de carne o de tripteína (caseína). Estos hidrolizados están disponibles comercialmente en forma de polvo y pueden ser pesados con facilidad y disueltos en agua destilada para preparar un medio (11,12).

En situaciones particulares, especialmente en microbiología clínica, los medios de cultivo pueden ser selectivos o diferenciales. Un medio *selectivo* contiene compuestos que inhiben selectivamente el crecimiento de algunos microorganismos y permite el crecimiento de otros. En cambio un medio diferencial es aquel al que se añade un indicador, normalmente un colorante, para permitir diferenciación de reacciones químicas particulares que ocurren durante el crecimiento, como la fermentación de algún carbohidrato y así distinguir entre diferentes grupos de bacterias permitiendo una identificación tentativa del microorganismo. También es importante tener en cuenta que diversos microorganismos pueden poseer requerimientos nutricionales muy diferentes necesitando un *medio enriquecido* para poder cultivarlos. Se trata de medios complejos a los que se añaden nutrientes adicionales como suero o sangre, complemento común de los medios de cultivo ya que provee quelantes de nutrientes, hormonas y factores de crecimiento, inhibidores de proteasas, y neutraliza sustancias tóxicas. Al adicionar estos componentes se reflejan mejor las condiciones que se encuentran en el hospedador pudiendo cultivar con éxito patógenos nutricionalmente exigentes (11,12).

En situaciones donde muestras no se pueden procesar en el momento o se deben transportar a otro laboratorio, se utilizan los medios de transporte, cuya composición permite mantener viable durante un tiempo prologando a los microorganismos de interés, sin alterar su concentración.

Los medios de cultivo pueden tener diferente consistencia. Pueden prepararse en forma semisólida o sólida mediante la adición al medio líquido de un agente solidificante como el agar. Los medios sólidos contienen 1,5 al 2 % de agar, y que se preparan en placas de Petri estériles, inmovilizan a las células, permitiéndolas crecer y formar masas aisladas visibles llamadas colonias, que pueden tener forma y tamaño variable. Los medio semisólidos, tienen una concentración de agar inferior a los medios sólidos (0,3-0.5%) y se preparan en tubos de vidrio estériles con tapa. La baja concentración de agar permite que ver la motilidad de los microorganismos en el medio de cultivo y proliferación en las zonas donde las condiciones atmosféricas son adecuadas para su crecimiento, permitiendo el desarrollo de aerobios estrictos en la parte superior, anaerobios estrictos en la profundidad y anaerobios facultativos en todo el medio. En un cultivo semisólido con crecimiento no se obtiene desarrollo de colonias sólidas sino una generación de turbidez en el medio, que a menudo es acompañada con la generación de un color por viraje de un indicador provocada por la proliferación microbiana.

Por último, los medios de cultivo líquidos que se denominan “caldos” y son nutrientes en solución acuosa que suelen utilizarse para mantener microorganismos y enriquecer inóculos (11,12).

Incubación:

El tiempo y temperatura de incubación dependerán del microorganismo que se quiera recuperar y la atmósfera debe ser elegida de acuerdo a sus requerimientos de oxígeno y dióxido de carbono. Uno de los métodos más utilizados para generar condiciones atmosféricas especiales para el cultivo de microorganismos exigentes es la jarra con vela. Se trata de un recipiente en donde se colocan los tubos o placas de agar inoculadas y luego una vela encendida, para posteriormente sellarse herméticamente. La llama de la vela consume todo el oxígeno presente en la atmósfera para generar dióxido de carbono y agua en el proceso de combustión, lo que da como resultado una atmósfera pobre en oxígeno y rica en dióxido de carbono (aproximadamente 3-7% de CO₂). Esto resulta adecuado para el desarrollo de microorganismos microaerófilos, ya que necesitan para sobrevivir niveles de oxígeno inferiores a los de la atmósfera normal, o capnófilos que requieren una elevada cantidad de dióxido de carbono (11).

Técnica de cultivo de microorganismos en el laboratorio:

Como los microorganismos están por todas partes, los medios de cultivo deben ser esterilizados antes de usarlos. La esterilización se lleva a cabo normalmente mediante calor húmedo en un gran recipiente a presión llamado autoclave. Este dispositivo permite la entrada de vapor de agua a alta presión, logrando alcanzar temperaturas superiores al punto de ebullición del agua (121°C) necesarias para destruir todos los microorganismos presentes, incluidas esporas termorresistentes (11,12).

Una vez esterilizado el medio de cultivo, ya está listo para ser inoculado con el microorganismo o muestra incógnita en estudio. Esto debe realizarse mediante *técnica aséptica*, que consta de una serie de procedimientos para evitar la contaminación con microorganismos presentes en el medio ambiente durante la manipulación de los materiales.

Para ello se emplea un mechero Bunsen cuya función es crear una zona aséptica de trabajo, que a su vez permite esterilizar el instrumental como el asa de siembra, mediante la aplicación directa de calor.

▪ Características del parásito *T. vaginalis*

✚ Taxonomía:

T. vaginalis es un protozoo perteneciente al Reino Protista, Filo Metamonada, Clase Parabasalia, Orden Trichomonadida, Género *Trichomonas* que incluye parásitos flagelados del tubo digestivo o de las vías genitales, anaerobios, carentes de mitocondrias, de ciclo directo y con ausencia de formas quísticas, pudiéndose encontrar solo tres especies dentro de este género capaces de parasitar al ser humano: *T. vaginalis*, *T. tenax*, parásito comensal propio de la cavidad bucal, y *T. hominis*, característica del tubo digestivo, sin ser claramente patógena (1, 13,14).

✚ Morfología:

Al ser un trofozoíto, la morfología es muy variable pudiendo ir desde aspectos piriformes, semilunares, esferoidales en medios líquidos con actividad locomotriz muy intensa, hasta formas ameboides en medios sólidos con agar que disminuyen su movilidad. Este polimorfismo se debe a múltiples variables como la microbiota bacteriana concomitante, el pH, la presión osmótica del entorno, y la abundancia de nutrientes de medio. *T. vaginalis* mide de 7 a 23 µm. Su movimiento ondulante y adirrecional característico se debe a la presencia de 5 flagelos, uno de los cuales, el quinto o posterior, formado por un citoesqueleto de actina y tubulina, es el constituyente fundamental de la membrana ondulante, su complejo orgánulo motor que le confiere sus movimientos rápidos de traslación y rotación. Este flagelo está asociado a una estructura llamada costa, cuya función es dar resistencia a la estructura del parásito. Debajo del núcleo nace una parte sólida, llamada axostilo, dispuesta longitudinalmente y análoga a la columna vertebral, que le proporciona rigidez anatómica al protozoo. (**Figura 1**). No posee mitocondrias y sus hidrogenosomas son los encargados de producir ATP e hidrógeno molecular mediante la fermentación de carbohidratos.

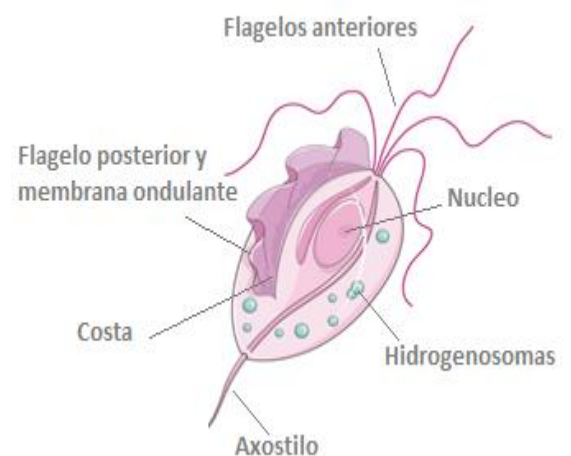


Figura 1. Esquema de la morfología de *T. vaginalis*.

(Fuente: Becerril M.A (2014). Parasitología Médica 4ta ed.)

Ciclo biológico y vías de transmisión:

T. vaginalis es el único parásito causante de una infección de transmisión sexual (ITS) dentro de un grupo de más de 30 patógenos de diferente naturaleza. Su único hospedador natural es el ser humano y su transmisión, por lo general, es por contacto sexual, aunque se ha demostrado que también es posible mediante el uso de fómites y ropa interior, porque el parásito puede sobrevivir en la orina durante tres horas y en el semen durante seis horas. Además, se han encontrado parásitos vivos y con capacidad de infectar en inodoros, piscinas y zonas húmedas, tras 24 horas a 35 °C. En ambientes secos, calurosos y en la luz solar directa, muere aproximadamente a los 30 minutos ya que son muy sensibles a la temperatura, no pudiendo sobrevivir a más de 45 °C.

El transporte del parásito entre las mucosas en el acto sexual se hace mediante las secreciones de quienes participan en él como el flujo vaginal, el líquido preseminal y el semen. Una vez que el parásito invade la mucosa genital, tiene preferencia por localizarse, en el caso de la mujer, en las glándulas de Bartholino y parauretrales y en sus secreciones, además de la vagina y el cérvix. En el hombre coloniza principalmente el surco balano-prepucial, las glándulas prepuciales, la uretra prostática y las vesículas seminales. Como *T. vaginalis* es un parásito de ciclo biológico *directo*, solo presenta formas flagelares o trofozoítos, sin que existan formas de resistencia o quiste en su ciclo vital, aunque se han descrito formas redondeadas en ambientes desfavorables o cultivos agotados, estado que es reversible en cuanto el parásito vuelve a encontrarse en un medio adecuado y rico de nutrientes. Estas formas polimastigontes o pseudoquísticas son organismos esféricos e inmóviles caracterizados por la internalización de los flagelos y de la membrana ondulantes. Una vez que el trofozoíto se encuentra en la mucosa, se reproduce mediante fisión binaria longitudinal con un período de incubación que oscila entre 4 y 28 días, crece favorecido por el pH alcalino y en presencia de sales de hierro, como las que se encuentran en la sangre menstrual, y de la glucosa, presente en el epitelio vaginal durante la edad fértil. En la **Figura 2** se esquematiza el mecanismo de transmisión sexual del parásito (13, 14, 15,16).

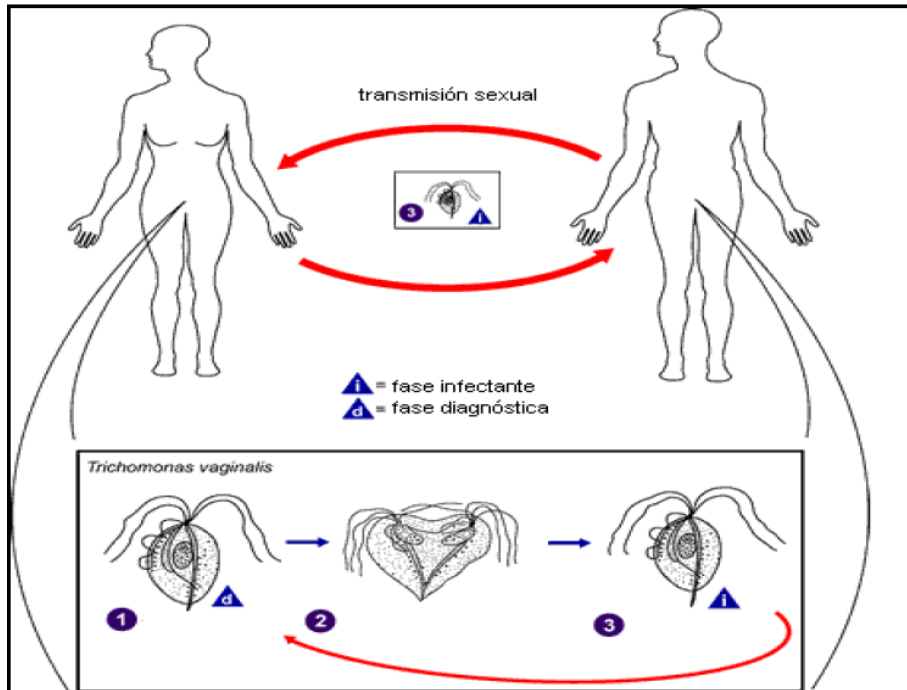


Figura 2. Esquema del mecanismo de transmisión sexual de tricomoniasis.

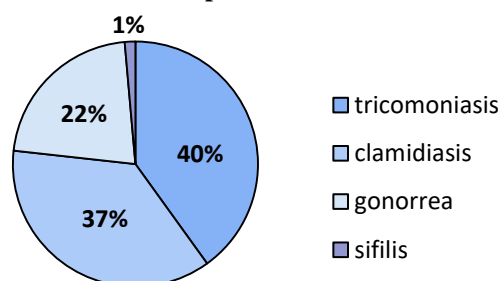
(Fuente: <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html> , Año 2017.)

▪ Epidemiología

La OMS refiere 357.000.000 nuevos casos de ITS curables mundialmente por año, grupo que incluye: sífilis (5 millones), gonorrea (78 millones), clamidiasis (131 millones) y tricomoniasis (143 millones). Los porcentajes de cada ITS curable mundialmente se pueden observar en el **Gráfico 1**. La infección por *T. vaginalis* continúa siendo la enfermedad de transmisión sexual no bacteriana ni viral más frecuente con el 40% de los casos reportados por año en todo el mundo. Sin embargo se debe destacar que estos datos epidemiológicos son subestimados debido a la alta tasa de casos asintomáticos y por no tratarse de una enfermedad de declaración obligatoria (1, 2,3).

La tricomoniasis urogenital tiene una incidencia máxima entre los 16 y los 35 años, el periodo de mayor actividad sexual. El 100% de las parejas de varones con tricomoniasis sufren también la infección. Es cosmopolita, con amplia distribución mundial, no se ve afectada por variaciones climáticas ni estacionales, y mayoritariamente se halla en poblaciones con niveles socioeconómicos bajos. Existen muchos factores que pueden afectar a la transmisión de la tricomoniasis como el desconocimiento de la existencia de las ITS, relaciones sin protección, promiscuidad, edad y el sexo, encontrándose una prevalencia mayor en mujeres y siendo las jóvenes las más vulnerables para adquirir este tipo de infección, por las características de la vagina y el cérvix que aún no han desarrollado completamente los mecanismos de defensa como el pH ácido y el moco cervical espeso (13,14).

Gráfico 1. Nuevos casos de ITS curables por año expresados en %.



(Fuente: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis)), Año 2019.)

▪ **Fisiopatología de la infección**

La variada sintomatología provocada por el parásito sienta sus bases en los mecanismos de patogenia. *T. vaginalis* se encuentra en un ambiente complejo, que sufre cambios bruscos en el que influyen el pH, la microbiota, la respuesta inmune del hospedador, los niveles de hierro y zinc, poliaminas, etc. En este sentido, el parásito ha tenido que ser capaz de desarrollar mecanismos de adaptación al hospedador para colonizar y mantener la infección en este ambiente tan hostil. La interacción parásito-hospedador es un proceso multifactorial dependiente de factores asociados al hospedador y factores de virulencia asociados al parásito (1, 2, 4,7).

1. **Factores asociados al hospedador:**

✚ **pH vaginal y microbiota:** El pH alcalino es ideal para que *T. vaginalis* produzca la infección, siendo óptimo en un pH próximo a 5,0. Durante la excitación y el acto sexual, la mujer secreta fluidos que aumentan el pH vaginal, normalmente ácido (pH=3.0); además el semen, que es alcalino, favorece la transmisión del parásito. A su vez, la existencia de enfermedades genitourinarias concomitantes o una alteración de la microbiota vaginal (especialmente a la disminución de la población de *Lactobacillus acidophilus* y/o un incremento de las bacterias anaerobias como sucede en la vaginosis bacteriana) están asociadas a un aumento de pH. Esta situación facilita el asentamiento del parásito en caso de un contacto de riesgo, ya que su expresión genética y funcionalidad están determinadas por el pH del medio. Además, el propio parásito a través de la fagocitosis de las bacterias de la microbiota, reduce la población de *L.acidophilus* responsable del ambiente ácido vaginal, lo que favorece el aumento del pH del medio, favoreciendo su propio asentamiento.

✚ **Ciclo menstrual y niveles hormonales:** El papel que juegan estos dos elementos en la presentación clínica de la tricomoniasis es de gran relevancia. La exacerbación de los síntomas en la mujer está asociada a fluctuaciones hormonales de los estrógenos y progestágenos durante el transcurso del ciclo menstrual y durante el embarazo, donde la mujer presenta ambas hormonas con niveles elevados. La presencia de receptores específicos para estrógenos y

andrógenos en la superficie de *T. vaginalis* refleja la importancia de las hormonas en el desarrollo de esta parasitosis.

✚ **Presencia de hierro:** El hierro es uno de los factores que más se han estudiado en la patogenia de *T. vaginalis*. Su papel como inductor de numerosos genes asociados al asentamiento y colonización del parásito, así como a la exacerbación de su patogenia son indiscutibles. También el hierro es esencial para el desarrollo adecuado del metabolismo del parásito y su multiplicación.

Un ambiente rico en hierro se correlaciona con procesos de evasión del sistema inmune del hospedador, mientras que un ambiente con hierro bajo, el parásito estimula su actividad citotóxica, lo que le permite una mayor motilidad y con ello una penetración mejor a capas más profundas del epitelio, logrando de esta forma colonizar y sobrevivir en el ambiente vaginal. Debido a que no existe hierro libre en el tracto genitourinario, *T. vaginalis* lo adquiere mayoritariamente a través de la lactoferrina presente en las secreciones cervicales. Si los niveles de lactoferrina disminuyen como fuentes alternativas de hierro, es capaz de tomar Fe^{2+} a partir del grupo hemo y la hemoglobina por medio de la hemólisis y la fagocitosis de los glóbulos rojos durante el período menstrual.

✚ **Presencia de zinc:** Este elemento presente en el fluido prostático del hombre, dificulta el crecimiento del parásito. El carácter citotóxico del Zn^{2+} explica por qué esta ITS cursa de forma asintomática en la mayoría de los varones. Por el contrario, si las secreciones prostáticas de Zn^{2+} disminuyen existe un riesgo mayor de desarrollar prostatitis crónica en caso de tricomoniasis.

✚ **Niveles de poliaminas:** Las poliaminas son moléculas presentes en todos los organismos y están implicadas en procesos de proliferación celular. El metabolismo parasitario de estos compuestos comienza con la síntesis de putrescina a partir de ornitina. Las secreciones vaginales de mujeres infectadas presentan un nivel elevado de putrescina sintetizada y secretada por el propio parásito y responsable del olor característico de la leucorrea en esta infección. El metabolismo de estas moléculas, y concretamente el de la putrescina, está implicado en procesos de citoadherencia y citotoxicidad.

2. Factores de virulencia asociados al parásito:

Se agrupan en dos tipos: Los mecanismos dependientes e independientes de contacto, los cuales se resumen en la **Tabla 1**.

Factores de virulencia asociados al parásito		Función
Dependientes del contacto	Adhesión a las células del epitelio vaginal (CEV)	Primer paso para la infección. Proceso multifactorial dependiente del pH, temperatura, disponibilidad de hierro y tiempo de contacto. Moléculas implicadas: Adhesinas (AP), lipofosfoglicano (LPG).
	Fagocitosis de lactobacilos, levaduras, leucocitos, eritrocitos y CEV	Obtención de nutrientes a través de actividad β -hemolítica. Evasión de la respuesta inmune. Ingestión levaduras y bacterias: \uparrow pH vaginal favoreciendo su asentamiento.
Independientes del contacto	Cistein-proteasas(CP)	Son sustancias tóxicas de secreción, que intervienen en el proceso de adherencia y evasión de la respuesta inmune.
	Factor de desprendimiento celular (CDF)	Produce el desprendimiento del epitelio genitourinario. Regulado por estrógenos. Exacerbación de los síntomas durante la menstruación debido a que al \downarrow estrógenos \uparrow CDF.
	Virus de <i>T.vaginalis</i> (TVV)	Virus ARN doble cadena. Regula la transcripción de genes variando la expresión de algunas CP vinculadas con la patogenia.

Tabla 1

(Fuente: *Trichomonas vaginalis: la versatilidad de un parásito tenaz*, Año 2017.)

▪ Sintomatología y complicaciones

Por todo lo detallado anteriormente, las mujeres son más propensas que los hombres a presentar sintomatología por la infección tricomoniasis. Esta es más probable cuando se eleva fisiológicamente el pH vaginal y, por ende, el número de parásitos, como durante la menstruación, la ovulación o el período postcoital. En estas situaciones la sintomatología se acentúa. En las infecciones por *T. vaginalis* se puede observar vaginitis con leucorrea abundante, espumosa, fétida y de color amarillo verdoso (**Foto 1**). Las mujeres infectadas refieren prurito, ardor, cistitis y disuria, que se acentúan durante la menstruación. Al examen ginecológico, el cuello uterino se presenta alterado con aspecto edematoso, eritematoso y friable, con áreas puntiformes de color rojo intenso que se entienden además, a la vulva y vagina. Este signo clínico denominado colpitis macular (cérvix en forma de fresa) es considerado el signo clínico más específico para el diagnóstico de la tricomoniasis urogenital (**Foto 2**), sin embargo es detectado principalmente por colposcopia y raramente durante el examen ginecológico rutinario. El exudado inflamatorio cubre la mucosa vaginal, y la vulvitis suele estar marcada por la presencia de eritema, dolor y edema. También se ha descrito la presencia de erosiones cervicales, las que algunos autores han interpretado como una predisposición al carcinoma de cuello. El período de incubación de la infección por *T. vaginalis* es de 4 a 28 días. Durante esta etapa la microbiota de Döderlein (compuesta en su mayoría por *Lactobacillus acidophilus*) se conserva y hay poca o ninguna reacción inflamatoria. A medida que la infección avanza estos parámetros se invierten, es decir, paulatinamente desaparecen los lactobacilos y se reemplaza por una microbiota bacteriana mixta, con un aumento del pH, del número de leucocitos y de parásitos. Las variadas formas clínicas de la enfermedad dependen probablemente del número, de la virulencia del parásito y de la resistencia del hospedero. En general, las manifestaciones clínicas de la tricomoniasis urogenital son inespecíficas y son semejantes a las provocadas por *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis* y *Gardnerella vaginalis* (1, 2,4).



Foto 1. Vaginitis por *T. vaginalis*. Abundante secreción purulenta (leucorrea).



Foto 2. Cervix en forma de fresa, signo característico de tricomoniasis.

(Fuente: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/tricomoniasis.html>, Año 2017.)

Los varones tienden a sufrir una infección asintomática y actúan como reservorios de *T. vaginalis*. Sin embargo, un gran porcentaje de casos de uretritis no gonocócica es provocada por este parásito. Cuando la infección se hace evidente, puede manifestarse por secreción uretral serosa o purulenta, prurito en el glande, edema prepucial, erección dolorosa, eyaculación precoz y disuria. En cuanto a las complicaciones se incluyen: uretritis, prostatitis, cistitis y esterilidad; esta última se produce al unirse *T. vaginalis* a la cola y la cabeza del espermatozoide, limitando su motilidad (2, 5,7).

▪ **Asociación con otros patógenos**

Cada día se hace más frecuente la concomitancia de varios agentes patógenos en el tracto urogenital. La asociación y coexistencia de *T. vaginalis* con otros gérmenes causantes de ITS es bastante común, por lo cual se ha planteado que podría actuar como transportador pasivo de estos microorganismos, facilitando su entrada a las capas más profundas del epitelio vaginal y en consecuencia promoviendo su transmisión. (1,7). Las relaciones más importantes se detallan a continuación:

✚ Relación entre *T. vaginalis* y VIH:

La infección por *T. vaginalis* es considerado uno de los más importantes cofactores en la transmisión del VIH., donde como mínimo, duplica el riesgo de contagio mediante cuatro posibles eventos:

1. La respuesta proinflamatoria iniciada en las mucosas cervical y vaginal.
2. La alteración de la inmunidad innata en la mucosa.
3. La ruptura de la continuidad de la mucosa cervicovaginal.
4. El cambio de la microbiota y pH vaginal.

Esta asociación sienta sus bases desde los comienzos de la década del 90, donde encontraron que la seroconversión a VIH en mujeres estuvo significativamente asociada con la presencia de otras ITS, muy particularmente con la tricomoniasis urogenital. El mecanismo para la transmisión puede estar asociado con alteraciones genitales provocadas por varias enzimas hidrolíticas secretadas por el parásito las cuales abren la barrera protectora; pudiéndose desarrollar entonces microulceraciones que facilitan la entrada del virus a las capas más profundas del epitelio vaginal. Además, la transmisión también puede verse favorecida por la infiltración leucocitaria (linfocitos T CD4+ y macrófagos) provocadas por una agresiva respuesta inmune celular local causada por el parásito, con importante liberación de citocinas proinflamatorias que atraen y activan a las células presentadoras de antígeno y a linfocitos TCD4+, células blanco para el VIH. A su vez, debido a que *T. vaginalis* tiene la capacidad de fagocitar células infectadas por virus, el parásito actúa como transmisor de virus humanos, ya que transporta en su interior partículas víricas. Aunque no se han detectado evidencias de replicación o liberación del virus como puede ocurrir con TVV, su supervivencia

durante un cierto período podría conllevar graves consecuencias en aquellos casos en los que exista co-infección por ambos patógenos, convirtiéndose el parásito en un transportador pasivo (5,7).

Relación entre *T. vaginalis* y VPH:

Se ha demostrado que la infección por este protozoo duplica el riesgo de infección por VPH. Se discute el mecanismo mediante el cual el protozoo interviene en el proceso penetrante del virus a la célula epitelial. Algunas teorías señalan la función transportadora del parásito, al trasladar el virus desde el medio extracelular al intracelular. Otra teoría, plantea la posibilidad de infección por las microlesiones producidas por los elementos citotóxicos secretados por *T. vaginalis*, que pueden romper la membrana celular y favorecer una especie de “asalto” por parte del virus al entorno intracelular. A su vez la infección por *T. vaginalis* puede estar relacionada con algunos procesos neoplásicos, y con un incremento del riesgo de padecer neoplasia intraepitelial cervical (NIC) cuando la paciente presenta infección concomitante con algunos subtipos potencialmente oncogénicos de VPH (5,7).

- **Tricomoniasis y embarazo**

Los cambios hormonales que se producen durante el embarazo predisponen a que esta población sea más vulnerable y exista una mayor incidencia de ITS, lo que conlleva a complicaciones maternas y perinatológicas como aborto espontáneo, mortalidad perinatal, bajo peso al nacer, endometritis posparto y secuelas en los neonatos sobrevivientes. La tricomoniasis en las mujeres embarazadas predispone a la ruptura prematura de membranas (RPM) debido a la inducción de citoquinas proinflamatorias producidas por el sistema inmune al atacar a *T. vaginalis*, lo que lleva a entrar en trabajo de parto pretérmino y a bajo peso al nacer (BPN) siendo esta complicación, uno de los principales problemas de salud en el mundo por la repercusión que tiene en la mortalidad infantil y por las secuelas que puede producir, ya que ocasiona consecuencias potencialmente negativas en el período perinatal, tanto para la madre como para el feto como sepsis del neonato y morbilidad neonatal elevada por la inmadurez (5, 6,8).

A su vez, esta ITS tiene elevada prevalencia entre las gestantes en países subdesarrollados, luego de la vaginosis bacteriana (VB), y si bien uno de las síntomas principales es el flujo vaginal amarillento y mal oliente, la mitad de las pacientes son asintomáticas y presentan flujos normales, lo que trae como consecuencia que se subestimen los casos de tricomoniasis en esta población y que las pacientes, nunca reciban tratamiento adecuado, deviniendo todas las complicaciones antes mencionadas y favoreciendo a su vez la transmisión de la infección. También existen casos de transmisión vertical de madre a neonato a través del canal de parto. Aunque en la mayoría de las tricomoniasis neonatales son asintomáticas o se logra la curación espontánea de las mismas tras la disminución de los niveles de estrógenos maternos en el recién nacido a partir de la sexta semana o tras el tratamiento farmacológico con metronidazol (MTZ), en los casos sintomáticos puede producirse infección genitourinaria o neumonía neonatal (5,6).

▪ Métodos diagnósticos

En el caso de la mujer, la muestra de elección para la búsqueda del parásito es el flujo vaginal, mientras que en el hombre lo es el semen por su mayor sensibilidad seguido del exudado uretral, aunque los métodos diagnósticos para este grupo son más limitados.

Diversas técnicas de diagnóstico se han empleado para la identificación de *T. vaginalis*, pero la microscopía óptica, es decir el examen en fresco de la secreción vaginal, ha sido la más utilizada por ser rápida y económica, aunque es poco sensible, y requiere de un personal experimentado para un diagnóstico seguro y procesamiento rápido ya que a medida que pasa el tiempo, *T. vaginalis* pierde viabilidad y con ello su característico movimiento, primordial para su detección.

El cultivo de la muestra de exudado vaginal o uretral en medios líquidos o semisólidos es la técnica de referencia o *gold standard* debido a su alta sensibilidad (98%) y especificidad (100%). Estos medios vienen de forma comercial o puede ser formulados *in house* para reducir costos como el caldo enriquecido y selectivo para *T. vaginalis* estudiado en este trabajo (8, 9,10).

Existen también pruebas de aglutinación en látex para muestras de flujo vaginal que brindan un diagnóstico rápido, y que por su sencillez pueden realizarse en la misma consulta por el personal paramédico. Esta prueba es una técnica que si bien en nuestro medio es costosa, es la más rápida y posee una elevada sensibilidad (4).

También son útiles las tinciones de Papanicolaou y de Maygrünwald Giemsa prolongado para visualizar trofozoítos fijados pero ambas tienen baja sensibilidad.

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) ha dado resultados satisfactorios en secreción vaginal y orina, con altas sensibilidad y especificidad, pero es un método con grandes limitaciones debido a su alto costo (5).

Las técnicas inmunológicas clásicas de EIA (enzimoinmunoanálisis) e IFD (inmunofluorescencia directa) tienen menor sensibilidad que el cultivo o que las técnicas moleculares como la PCR, por lo que son poco usadas, pero son una opción más para el diagnóstico de la infección. La prueba de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) basada en la búsqueda de IgA, IgM e IgG específicas para *T. vaginalis* no ha sido eficaz (1, 4,5).

Estudio del flujo vaginal :

La presencia de un aumento de la secreción vaginal o un cambio en sus características es uno de los motivos de consulta más frecuente de las mujeres en edad reproductiva. Entendemos por flujo al aumento permanente de los trasudados y exudados de causa fisiológica o patológica, que se objetivan por la paciente o por el examinador. El flujo fisiológico es producto de los cambios hormonales del ciclo, y contiene escasa cantidad de leucocitos. La leucorrea puede deberse a infección vaginal o cervical. Denominamos vaginitis a la infección vaginal con respuesta inflamatoria, caracterizada por la presencia de abundantes polimorfonucleares. La tricomoniasis urogenital es una de las vaginitis más frecuentes, al igual que las vaginitis por levaduras del género *Candida*. Si bien la sintomatología es similar para ambas se las puede diferenciar por las características del flujo vaginal. A su vez existe otra entidad clínica denominada vaginosis bacteriana (VB) caracterizada por un cambio en la microecología de la vagina con disminución o ausencia de lactobacilos y con presencia de *Gardnerella vaginalis* (cocobacilo Gram negativo) asociada a bacterias anaerobias como *Mobiluncus* spp., *Peptococcus* spp. , *Bacteroides* spp. , *M. hominis*, entre otros, también llamado complejo GAMB. Se diferencia de la vaginitis en la ausencia de respuesta inflamatoria, es decir ausencia o escasos polimorfonucleares. Los criterios diagnósticos para diferenciar las infecciones vaginales se resumen en la **Tabla 2** (15,17).

Además en las mujeres embarazadas se realiza por Ley Nacional 26.369 un estudio de portación durante la semana 35 y 37 de gestación, de forma paralela al estudio del flujo vaginal, para la búsqueda del Estreptococo del grupo B (SGB o *S.agalactiae*) en un hisopado vaginal-perineal tomado sin utilización de espéculo. Esta bacteria, que es parte de la microbiota intestinal, puede causar infección urinaria en la gestante y sepsis neonatal con alta tasa de mortalidad si entra en contacto con el recién nacido en el momento de parto, cuando este pasa por el canal vaginal (18).

Tabla 2. Resumen los criterios diagnósticos para diferenciar las infecciones vaginales.

Criterio diagnóstico	Normal	Vaginosis Bacteriana	Vaginitis por <i>T. vaginalis</i>	Vaginitis por <i>Candida</i> spp.
pH vaginal	< 4,5	> 4.5	> 4.5	< 4.5
Flujo vaginal	Claro o blanco, fino y flocular	Blanco, grisáceo, cremoso y fino	Amarillo, verdoso, espumoso	Blanco y grumoso(leche cortada)
Test de aminas (Olor a pescado)	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
Sintomatología	-	No causa	Prurito	Prurito
Examen microscópico	Células epiteliales, predominio de <i>Lactobacillus</i> . spp.	Células “clave”. Escasos polimorfonucleares, microbiota mixta	<i>T. vaginalis</i> , leucocitos abundantes	Levaduras y pseudomicelios leucocitos, células epiteliales y <i>Lactobacillus</i>
Microbiota vaginal acompañante	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Gardnerella vaginalis</i> Micoplasmas y anaerobios (Complejo GAMM)	<i>T. vaginalis</i> , microbiota anaerobia mixta con disminución de <i>Lactobacilos</i>	<i>C. albicans</i> y otras levaduras. <i>Lactobacillus</i> spp.

(Fuente: Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones genitales, Año 2012.)

▪ **Materiales y métodos**

El trabajo se dividió en dos etapas: Puesta a punto del medio de cultivo y Toma de muestra y procesamiento.

Primera etapa : Puesta a punto del medio de cultivo

El medio de cultivo consta del medio base nutritivo fluido “caldo tioglicolato” comúnmente utilizado para el cultivo y enriquecimiento de microorganismos anaerobios. La presencia de grupos sulfhídricos, aportados por la L-cisteína y el tioglicolato sódico que contiene el medio, actúa como agente reductor y disminuye el potencial de óxido reducción facilitando así el desarrollo de diversos microorganismos anaerobios. Esto, sumado al bajo contenido de agar que le otorga la propiedad de ser un medio fluido y retarda la dispersión de dióxido de carbono y oxígeno, resulta adecuado para la proliferación de *T. vaginalis* ya que crece y se produce de manera óptima en condiciones anaeróbicas (19,20).

A este medio base se lo enriqueció con extracto de levadura y se lo complementó con suero equino adulto (SEA) inactivado, y una combinación de antibióticos y fungicidas para hacerlo *selectivo* y evitar el crecimiento de microorganismos contaminantes y/o de aquellos que son parte de la microbiota urogenital acompañante de la muestra, sin interferir en el desarrollo de *T. vaginalis*. La peptona de caseína (tripteina), L- cisteína y el extracto de levadura proporcionan aminoácidos, nitrógeno, azufre, carbono y vitaminas. La glucosa es la fuente de energía y el SEA proporciona factores de crecimiento esenciales para la proliferación del parásito (5, 8,9).

En este trabajo se utilizó suero comercial y suero de producción propia. La metodología empleada para la producción de SEA y para la puesta a punto se detallan a continuación.

✚ Producción de SEA

1. Obtención del SEA:

Para la obtención del suero equino se visitó en dos ocasiones el establo (**Foto 3**) y se realizaron extracciones de sangre venosa por venopunción en la yugular de los equinos adultos, tanto machos como hembras.

La sangre equina se cargó en tubos estériles. Se dejó formar el coágulo a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron los tubos 10 minutos a velocidad máxima. Se separó el suero equino bajo mechero con pipetas Pasteur estériles en frascos estériles. Se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Foto 3.Primera visita al establo.

2. Inactivación:

La inactivación o descomplementación tiene como objetivo desnaturalizar y/o inactivar componentes del complemento presentes en el suero equino así como también anticuerpos anti-*Trichomonas* (*T. foetus*) que podrían estar presentes en la sangre del animal y que podrían tener reactividad cruzada con *T. vaginalis*(11,12). El objetivo es evitar cualquier posible interacción con el parásito en el medio de cultivo ya que estas proteínas equinas podrían dificultar o incluso no permitir el crecimiento del parásito. Para la inactivación se procedió a llevar el baño termostatzado a una temperatura de $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ controlando con termómetro (**Foto 4**). Se colocaron los frascos con SEA dentro del baño durante 30 minutos.



Foto 4. Baño termostatzado a 56 grados.

3. Esterilización por filtrado:

Esta técnica permite esterilizar el suero equino haciéndolo pasar a través de un material capaz de retener los microorganismos presentes (filtro) y evitando de esta manera la contaminación del medio de cultivo cuando se lo agregue como factor de crecimiento para el desarrollo del parásito. El tamaño del poro del filtro de membrana de celulosa utilizado fue de 0,22 μm . Como este procedimiento no implica exponer el suero equino a grandes temperaturas ni presiones, como si lo haría la esterilización con vapor húmedo con autoclave, nos permite esterilizarlo sin alterar sus características nutricionales necesarias para la proliferación de *T. vaginalis* (12).

Para realizar la esterilización se armó el sistema de filtrado bajo flujo laminar. Se colocó el suero equino en el embudo. Una vez conectado el sistema a la bomba, se encendió y utilizando la presión de la misma, el suero equino pasó por el filtro recogiéndose en una botella de vidrio estéril (**Figura 3**). Se apagó la bomba, se desarmó el sistema de filtrado y se tapó la botella con el suero equino esterilizado e inactivado con un tapón a rosca y parafilm. Se realizaron controles fisicoquímicos y microbiológicos (Ver anexo). Finalmente se congeló a -20°C .

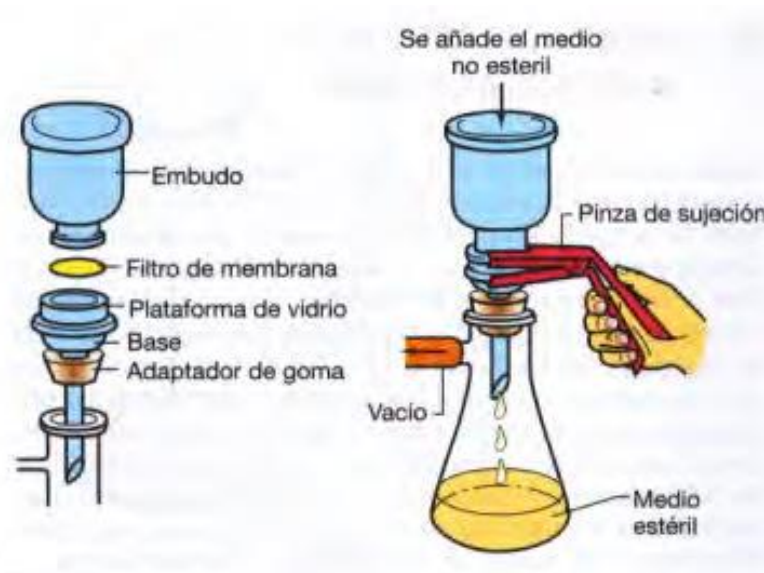


Figura 3.Esquema de la técnica de esterilización por filtrado.

(Fuente: Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D.(2009) .Brock.Biología de los Microorganismos.12ª Ed.)

✚ Puesta a punto del medio de cultivo *in house*

1) Preparación y fraccionamiento del medio de cultivo:

El medio de cultivo caldo tioglicolato modificado para *T. vaginalis* consta de 4 ml de caldo fluido semisólido color ámbar dispensado en tubo de vidrio con tapa a rosca. Para la puesta a punto se realizaron tandas de 10 tubos con 4 ml de medio cada uno. Este proceso lleva dos días consecutivos de trabajo que se detallan a continuación:

Primer día: Se pesó el medio tioglicolato con indicador y el extracto de levadura. Se colocaron en una botella de vidrio y se disolvieron en agua bidestilada. Se homogenizó la solución a baño maría hasta disolverse completamente adquiriendo un color ámbar límpido. Se autoclavó 15 minutos a 121 °C. Finalmente se controló la esterilidad en estufa a 37°C durante 24hs.

Segundo día: Se adicionó asépticamente SEA inactivado, Anfotericina B, Gentamicina y Penicilina G (Ver Anexo) (**Foto 5**).

Se midió el pH con tiras indicadoras, y se ajustó para llevarlo a $7\pm 0,2$ con K (OH) o HCl 1N de acuerdo al pH inicial del medio. Se fracciono en tubos de vidrio con tapa a rosca. Se controló esterilidad del fraccionamiento en estufa a 37°C, durante 24 hs (8,9).



Foto 5. Materiales para preparar el medio de cultivo.

2) Evaluación del medio de cultivo:

Se inocularon muestras de flujo vaginal con trofozoítos de *T. vaginalis* como control positivo del medio, para evaluar el funcionamiento de la primera formulación. Para todas las muestras ensayadas durante la puesta a punto se sembraron 2 tubos, uno de ellos con vaselina y se utilizó tubo de medio sin inocular como control negativo y de esterilidad (**Foto 6**).

También se realizó como variante, la siembra de dos tubos pero con la mitad de medio de cultivo, con el fin de investigar si es más conveniente utilizar menor cantidad de caldo para que los parásitos se encuentren más concentrados al momento de la revisión, y exista más chance de recuperarlos cuando se revisa el medio.



Foto 6.Control positivo y negativo del medio de cultivo.

Segunda etapa : Toma de muestra y procesamiento

Se realizó la búsqueda de *T. vaginalis* en muestras con solicitud de estudio de flujo vaginal a todas las pacientes que asistieron al servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Materno Infantil Dr. Eduardo Oller durante el período comprendido entre el 12 de marzo de 2019 y el 17 de mayo del mismo año.

1) Obtención de la muestra de flujo vaginal:

Se solicitó a la paciente que se recueste en posición ginecológica. **(Foto 7).** Posteriormente se introduzco el espéculo descartable en el canal vaginal sin utilizar lubricante, acomodándolo de manera tal que permita visualizar el cuello del útero.

Con una torunda de algodón estéril o hisopo, se tomó el flujo vaginal frotando en la zona donde sea más abundante o bien del fondo de saco vaginal posterior e inmediatamente se lo descargó en la solución fisiológica estéril (15,17).

Se identificó la muestra, registrando también el aspecto del flujo y su color, y se indagó a la paciente si presentaba o no prurito.

Finalmente, se procedió a tomar una segunda muestra para realizar un extendido en portaobjetos de la secreción para luego colorearla mediante la tinción de Gram. En la **Figura 4** se esquematiza el procedimiento para la toma de muestra de flujo vaginal.

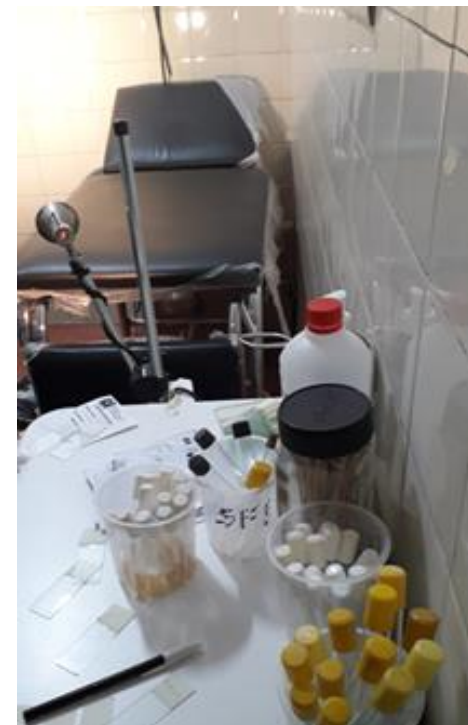


Foto 7. Camilla ginecológica y materiales para la toma de la muestra.

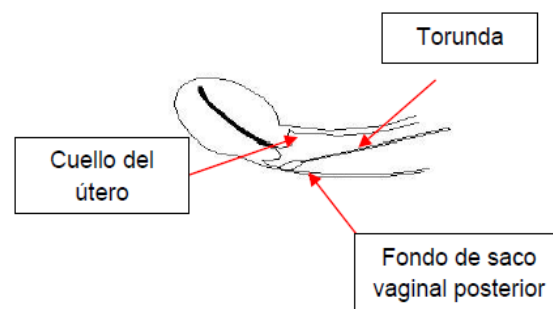


Figura 4.

(Fuente: Enlace Hispano Americano de Salud. Procesamiento de muestras vaginales. Año 2012.)

2) Procesamiento de la muestra de flujo vaginal:

I. Examen en fresco:

Para realizar la técnica, se descargó el hisopo sobre un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos y se visualizó en microscopio óptico con aumento de 400x recorriendo todos los campos en guarda griega (**Fotos 8 y 9**).

Se registraron todos los elementos visualizados en la observación microscópica: células, leucocitos, presencia o ausencia de levaduras con pseudomicelio, y presencia o ausencia de *T. vaginalis*.

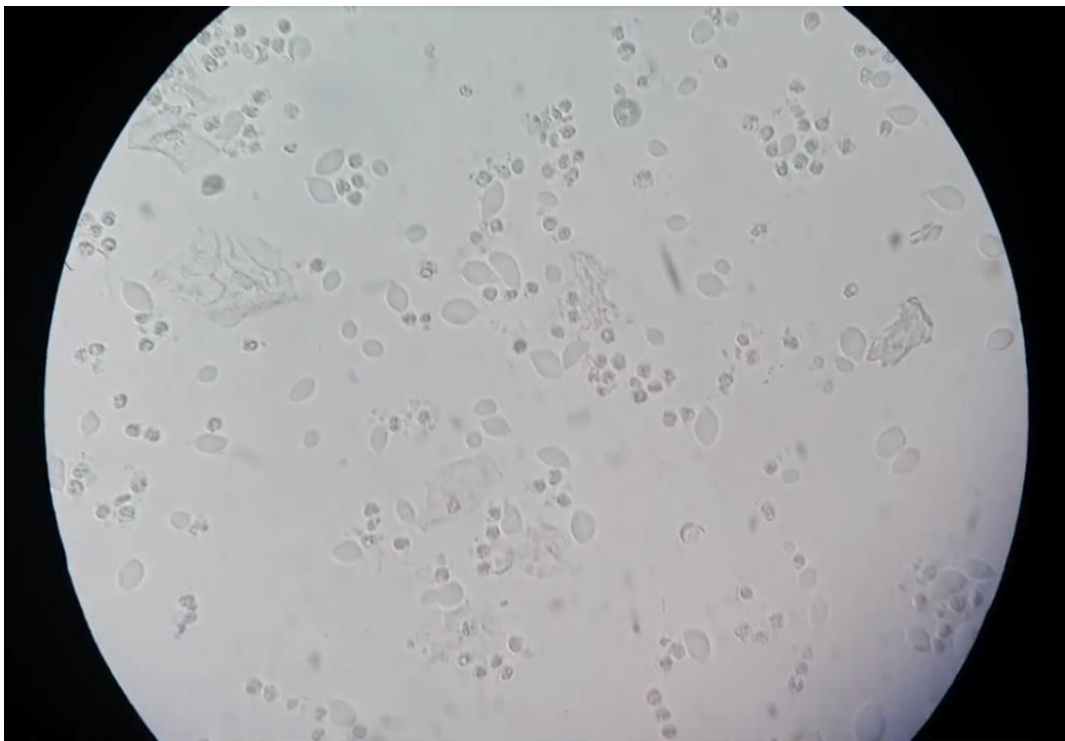


Foto 8.Examen en fresco de flujo vaginal con abundantes leucocitos y trofozoítos de *T. vaginalis*,400x.



Foto 9.*T. vaginalis* en examen en fresco amplificada, 400x.

II. Siembra en caldo tioglicolato modificado para *T. vaginalis*:

Para la siembra se descargó en el medio de cultivo el contenido del hisopo agregándose además todo el volumen de solución fisiológica donde se transportó la muestra, con la finalidad de aumentar el inóculo. Todas las muestras ensayadas en esta etapa se sembraron por duplicado y se utilizó un tubo de medio sin inocular como control negativo (**Foto 10**).



Foto 10. Materiales para la siembra.

III. Incubación:

Se realizó en atmósfera microaerófila, es decir con un 3-7% de CO₂ y a 35-37°C durante un periodo de 5 a 7 días, con revisión diaria a partir de las 24hs-48hs de incubación.

IV. Revisión del medio de cultivo y obtención de resultados:

Para la revisión se utilizaron jeringas de tuberculina. Con este material y en presencia de mechero para generar un campo estéril, se tomó un pequeño volumen de medio del fondo del tubo, sitio donde es posible encontrar al parásito debido a la baja concentración de oxígeno (**Foto 11**).

Se colocó una gota entre porta y cubre y se procedió a la visualización en microscopio a 400x, recorriendo varios campos en guarda griega.

Si en la muestra se observaron trofozoítos de *T. vaginalis* con su movimiento característico, esta se descartó y se registró en el cuaderno de anotaciones como muestra positiva.

Si no se observaron parásitos, se procedió a la re incubación en la misma atmósfera por 24-48hs más hasta completar los 5-7 días de revisión. Si luego de ese periodo, no se obtuvo desarrollo de *T. vaginalis*, se procedió a descartar y registrar la negatividad de la muestra.



Foto 11. Materiales para la revisión del medio de cultivo.

V. Método confirmatorio: Tinción Giemsa prolongado

Para aquellas muestras dudosas en donde se observaron estructuras semejantes a *T. vaginalis* pero que no presentaban el movimiento característico, se utilizó la tinción de Giemsa prolongado para confirmar si eran trofozoítos del parásito no viables (Foto 12).

Para realizar la tinción se preparó un extendido con la muestra a colorear, ya sea de flujo vaginal o alícuota el medio de cultivo. Se fijó con metanol durante 5 minutos. Se lavó con agua corriente y luego se lo cubrió con Giemsa diluido al décimo en agua destilada durante 90 minutos. (Ver anexo). Finalmente se lo enjuagó con agua destilada y se lo dejó secar. Se visualizó al microscopio óptico con objetivo de inmersión (1000x).

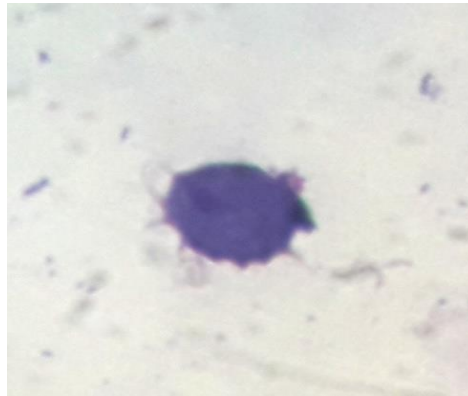


Foto 12. Trofozoíto de *T. vaginalis* en muestra de flujo vaginal coloreado con Giemsa prologando, 1000x.

VI. Recopilación de datos:

Los datos sobre las pacientes estudiadas se tomaron de las solicitudes de estudio provenientes del servicio de Obstetricia y Ginecología donde se realizó la toma de la muestra. El rango de semanas de gestación solo se determinó en aquellas pacientes que además de tener estudio de flujo vaginal, tenían la orden para la estudio de portación de SGB (pacientes entre las semanas 35 y 37 de gestación).

Para conocer la microbiota vaginal acompañante y resultados de la búsqueda de SGB en las pacientes con tricomoniasis urogenital, se recopiló la información del registro manual de Bacteriología a partir de la visualización de la tinción de Gram de los extendidos de flujo vaginal y del cultivo para SGB respectivamente.

Todos los datos se extrapolaron a panilla de cálculo Excel (Office 2010).

VII. Validez de una prueba diagnóstica : Calculo de sensibilidad y especificidad

Cuando se estudia una población de pacientes los datos obtenidos permiten clasificar a los sujetos en cuatro grupos, con los cuales se puede confeccionar una tabla de contingencia de 2x2. En ella, se enfrenta el resultado de la prueba diagnóstica o test (en filas) con el estado real de los pacientes (en columnas) o en su defecto el resultado de la prueba de referencia o gold standard que vayamos a utilizar. El resultado de una prueba puede ser correcto (verdadero positivo y verdadero negativo) o incorrecto (falso positivo y falso negativo). El análisis de su validez puede obtenerse calculando los valores de sensibilidad y especificidad (22).

Sensibilidad: Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad (22).

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Especificidad:

Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir como la capacidad de detectar a los sanos (22).

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

En esta investigación, la comparación del desempeño metodológico se evaluó solo a través del cálculo de la sensibilidad, ya que la especificidad es la misma para ambas técnicas por ser de diagnóstico de certeza. Esto es debido a que *T. vaginalis* es el único parásito de vías genitales, y como la detección microscópica es por su morfología y movimiento característico, no existe situación donde se puedan clasificar erróneamente a un individuo sano como enfermo, es decir, no existen falsos positivos para estas técnicas.

VIII. Análisis estadístico:

Para conocer si la diferencia de sensibilidad hallada entre el medio de cultivo *in house* y el examen microscópico es significativa y así evaluar el desempeño metodológico de ambas técnicas, uno de los objetivos específicos de este trabajo, se usaron tablas de contingencia de 2x2 y se empleó el estadístico Chi cuadrado de Pearson (χ^2) con un intervalo de confianza de 95% ($p < 0,05$) utilizando el programa Excel (Office 2010).

- Las variables fueron: Sensibilidad en la detección de *T. vaginalis* por técnica de cultivo y sensibilidad en la detección de *T. vaginalis* por examen microscópico.
- La hipótesis nula (H0) planteada fue: La detección de *T. vaginalis* es similar por examen microscópico y por cultivo en términos de sensibilidad.
- La hipótesis alternativa (H1) planteada fue: La detección de *T. vaginalis* es diferente por examen microscópico y por cultivo en términos de sensibilidad.

De igual manera se realizó la prueba para conocer si la diferencia en la frecuencia obtenida de *T. vaginalis* durante el periodo de estudio en 2019 solo por microscopía es significativa respecto a la frecuencia en el mismo periodo pero en 2018.

- Las variables fueron: Frecuencia de *T. vaginalis* por examen microscópico en 2018 y Frecuencia de *T. vaginalis* por examen microscópico en 2019.
- La hipótesis nula (H2) planteada fue: La frecuencia de *T. vaginalis* en el año 2019 es similar a la frecuencia hallada en 2018.
- La hipótesis alternativa (H3) planteada fue: La frecuencia de *T. vaginalis* en el año 2019 es diferente a la frecuencia hallada en 2018.

En ambos casos, si el χ^2 calculado resultó menor al χ^2 crítico, se aceptó la hipótesis nula. Por el contrario, si el χ^2 calculado resultó ser mayor al χ^2 crítico, se aceptó la hipótesis alternativa. El valor de χ^2 crítico que se utilizó fue 3,841, que corresponde a un grado de libertad y un nivel de significancia de 0,05.

▪ Resultados

Durante la puesta a punto, el medio de cultivo se evaluó con la siembra de 12 muestras de flujos vaginales. En todas las muestras se observó desarrollo del parásito luego de 24hs de incubación, manteniéndose entre 5 y 7 días viables presentando actividad locomotriz muy intensa y morfología variable (**Fotos 13, 14, 15,16**).

El agregado de vaselina al medio retrasó entre 24 y 48 hs el crecimiento de *T. vaginalis* y la reducción del volumen del medio disminuyó los días de viabilidad del parásito, sin representar una mayor recuperación al momento de la revisión.

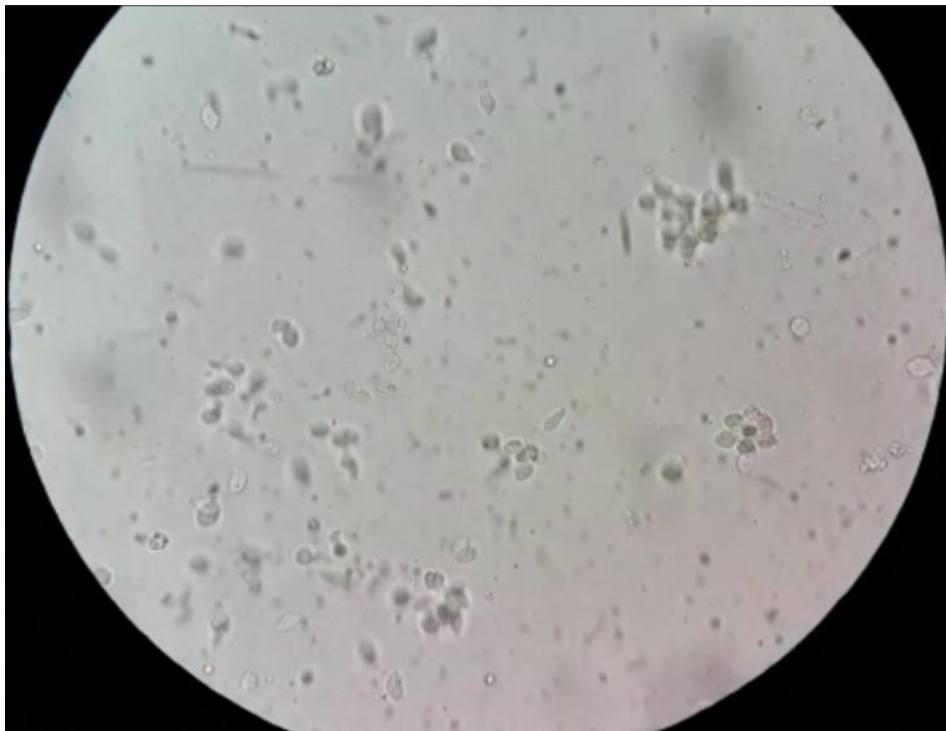


Foto 13. Trofozoítos de *T. vaginalis* formando acúmulos en el medio de cultivo luego de 24hs de incubación, 400x.



Fotos 14, 15 y 16. *T. vaginalis* y su morfología variable en el medio de cultivo, amplificados, 400x.

En la segunda etapa del trabajo, se procesaron 291 muestras de flujos vaginales provenientes de pacientes atendidas en el servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Materno Infantil Dr.Eduardo Oller. No se excluyó ninguna muestra ya que todas fueron tomadas, transportadas y procesadas en tiempo y forma.

De las 291 muestras totales, 286 fueron de mujeres embarazadas en diferentes semanas de gestación (98,3%) y 5 de mujeres no embarazadas en edad fértil (1,7 %) (**Tabla 3**).De las 286 pacientes embarazadas, 233 estaban entre la semana 35 y 37 de gestación (81,5%).En las pacientes restantes (18,5%) no se determinaron las semanas de gestación (**Tabla 4**).

Tabla 3 .Distribución de las pacientes estudiadas.

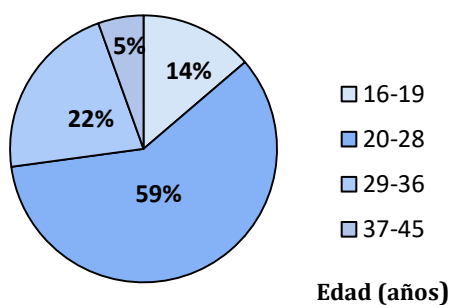
291 pacientes	n	%
Embarazadas	286	98,3
No embarazadas	5	1,7

Tabla 4.Semanas de gestación de las pacientes embarazadas estudiadas.

286 embarazadas	n	%
Entre 35 y 37 semanas de gestación	233	81,5
Otras semanas de gestación	53	18,5

El grupo etario con mayor número de consultas fue de 20 a 28 años con 172/291 (59%).Los porcentajes de cada grupo etario se muestra en el **Gráfico 2**.

Gráfico 2. Grupos etarios.



Utilizando como metodología diagnóstica la microscopía se detectó la presencia de *T. vaginalis* en 23 de las 291 pacientes, todas embarazadas, obteniéndose una frecuencia de 7,9%.

Mediante la técnica de cultivo se diagnosticaron dos casos adicionales de tricomoniasis obteniéndose desarrollo del parásito en 25 de las 291 muestras ensayadas, lo que representa una frecuencia de 8,6%.

La sensibilidad del examen microscópico y de la técnica de cultivo fue de 92% y 100% respectivamente. Como el valor χ^2 calculado fue 0,149, se aceptó la hipótesis nula (H_0) y se asumió que no existe diferencia significativa entre la sensibilidad de ambas técnicas.

En la **Tabla 5** se muestra la distribución de muestras positivas y negativas para *T. vaginalis*, la frecuencia de tricomoniasis y sensibilidad resultante mediante cada técnica durante el periodo de estudio en 2019.

291 muestras totales	Examen microscópico		Cultivo	
	n	%	n	%
Positivas	23	7,9	25	8,6
Negativas	268	92,1	266	91,4
Sensibilidad	92%		100%	

Tabla 5

Comparando el mismo período, pero del año 2018, durante el cual se procesaron 269 muestras de flujos vaginales solo mediante examen microscópico en fresco, se detectó la presencia del parásito en 13 de ellas, lo cual representa una frecuencia de 4,8%. Como el valor χ^2 calculado fue 0,139, se aceptó la hipótesis nula (H_2), y se asumió que no existe diferencia significativa en la frecuencia de tricomoniasis durante el periodo de estudio en 2019 respecto a la frecuencia en el mismo periodo del año anterior.

De las 25 pacientes embarazadas con tricomoniasis, 17 estaban entre la semana 35 y 37 de gestación (68%) y 8 de ellas en otras semanas de gestación (32%). Las edades más frecuentes fueron 22 y 24 años con 5/25 (20%), coincidentes con el grupo etario que representó el mayor número de consultas. En el **Gráfico 3** y **4** se muestran estos porcentajes.

Gráfico 3. Semanas de gestación de las pacientes con tricomoniasis.

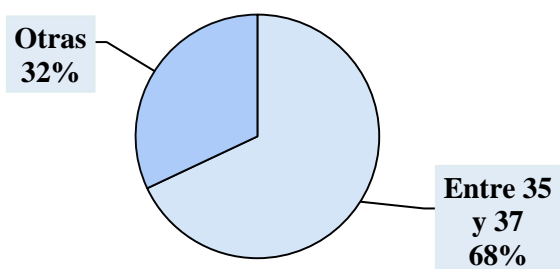
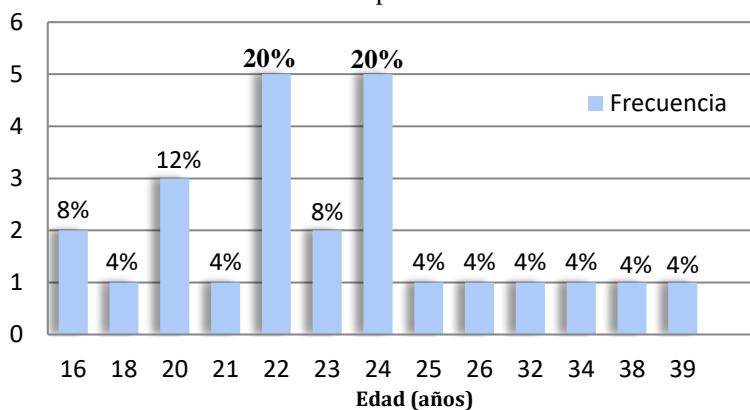


Gráfico 4. Edades de las pacientes con tricomoniasis.



En cuanto a los microorganismos asociados a *T. vaginalis*, de las 25 pacientes diagnosticadas (**Tabla 6**), 6 presentaron de forma concomitante vulvovaginitis por levaduras del genero *Candida spp.* (24%). La microbiota vaginal acompañante fue *Lactobacillus spp.* en 13/25 (52%) *Corynebacterium spp.* en 9/25 (36%) y 3/25 presentó microbiota mixta (12%). La búsqueda de SGB se realizó en 17/25 pacientes (68%) por encontrarse entre la semana 35 y 37 de gestación, de las cuales 2 fueron positivas (8%).

Tabla 6. Microorganismos asociados a *T. vaginalis*.

25 muestras positivas para <i>T. vaginalis</i>	n	%
+Levaduras	6	24
+SGB	2	8
+ <i>Lactobacillus spp</i>	13	52
+ <i>Corynebacterium spp</i>	9	36
+Microbiota mixta	3	12

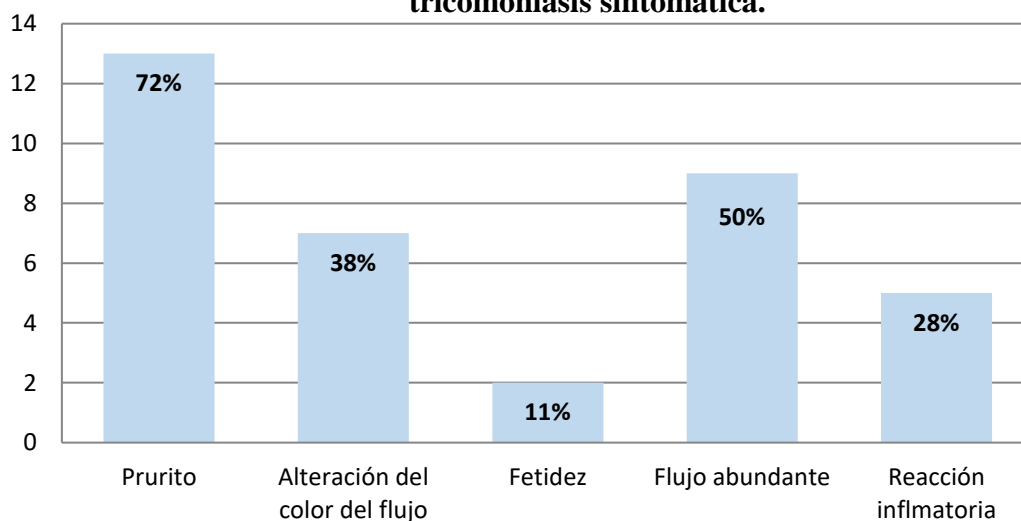
Por otro lado, 18/25 presentaban sintomatología compatible con tricomoniasis (72%), mientras que 7/25 no presentó sintomatología alguna y su flujo vaginal era normal (28%). En la **Tabla 7** se muestran estos porcentajes.

25 pacientes con tricomoniasis	n	%
Casos sintomáticos	18	72
Casos asintomáticos	7	28

Tabla 7

De las 18 pacientes con sintomatología, 13 presentaban prurito (72%), 7 flujo con alteración del color como amarillo o verdoso (38%), 2 presentaban fetidez (11%) y 9 flujo abundante (50%). A su vez, solo 5/18 presentaron reacción inflamatoria con leucocitos abundantes (28%). En el **Gráfico 5** se muestran estos porcentajes.

Gráfico 5. Manifestaciones clínicas de las 18 pacientes con tricomoniasis sintomática.



▪ Discusión

El caldo tioglicolato modificado para *T. vaginalis* puesto a punto en este trabajo funciona como medio selectivo y de enriquecimiento, ya que logra aumentar el inóculo inicial del parásito permitiendo así su visualización mediante microscopía. Esto lo hace útil para muestras donde el inóculo inicial de *T.vaginalis* está por debajo de su sensibilidad, situación que según los autores Perazzi y Menghi (8) es frecuente en muestras de pacientes embarazadas asintomáticas. Debido a que la detección del parásito mediante análisis microscópico es por morfología y movimiento característico, resulta necesario realizar diariamente exámenes en fresco de alícuotas del caldo tomadas del fondo de tubo para observar si hay proliferación del parásito. Esto lleva a que la especificidad de ambas técnicas sea la misma (100%) y que continúe siendo dependiente de un observador experimentado.

Cabe destacar que existieron cultivos dudosos de muestras con exámenes microscópicos negativos, donde se observaron estructuras compatibles con *T. vaginalis* pero que no se pudieron comprobar ni por movimiento característico ni por morfología, utilizando la coloración de Giemsa prolongado. Esto constituye una desventaja que puede deberse a los excesivos días de incubación que requiere el medio de cultivo para poder observar proliferación, ya que el parásito desarrolla entre el segundo y el séptimo día en este tipo de muestras (8). En consecuencia, como se necesita una semana de incubación, pueden existir días no laborables en el servicio, situación que lleva a que en el momento de la revisión, el medio esté agotado y los parásitos ya no se encuentren viables para su detección por movimiento, ni su morfología sea clara para visualizarlos por tinción.

A pesar de estos inconvenientes, la técnica de cultivo *in house* resulta satisfactoria, y ofrece la ventaja de detectar el parásito independientemente de la rapidez en el transporte y procesamiento de la muestra. Esto hace que tenga utilidad rentable como medio de transporte para *T. vaginalis*, concretamente para aquellos laboratorios donde la muestra de flujo vaginal no se puede procesar rápidamente después de la toma. En estas situaciones, donde existe una demora en la observación del examen en fresco, es frecuente que se pase por alto la presencia del parásito, ya que pierde su movimiento característico. También en situaciones donde los exámenes microscópicos en fresco son dudosos por que los parásitos presentan baja movilidad, la siembra en el caldo enriquecido y fluido no solo los mantiene viables sino que también les permite aumentar

su movimiento característico, lo que facilita la detección y permite confirmar el diagnóstico. En el medio de cultivo, los trofozoítos de *T. vaginalis* se mantienen móviles por 7-8 días, con un incremento del inóculo visible recién al quinto día de incubación, presentando como ventaja adicional una baja tasa de contaminación.

▪ Conclusión

En este trabajo final, el cultivo en el medio formulado resultó satisfactorio ya que detectó dos casos adicionales de tricomoniasis. Este ligero aumento en la sensibilidad puede ser importante ya que en algunas mujeres puede persistir la leucorrea y vaginitis, teniendo reportes negativos de examen en fresco para *T. vaginalis*, que podrían ser casos positivos si se efectuara el cultivo. Además, la detección del parásito es independiente de la rapidez en el transporte y procesamiento de la muestra, ventaja importante respecto a la microscopía. A pesar de esta situación, el desempeño metodológico de esta técnica no resultó ser estadísticamente superior en términos de sensibilidad respecto al examen microscópico tradicional.

La puesta a punto se logró exitosamente pero se necesitaron de componentes asépticos y especiales como el suero equino para lograr el aislamiento del parásito, lo que aumentó considerablemente el costo del análisis. Además, el método de revisión del medio requiere una exhaustiva y laboriosa observación microscópica diaria durante un periodo de 7 días, que conlleva a retraso en el diagnóstico y tratamiento farmacológico de la infección, mayor costo por la cantidad de materiales descartables que se deben utilizar y necesidad de personal entrenado que le dedique tiempo de trabajo diariamente. Esto hace que la utilidad de incorporarlo como técnica diagnóstica dependa del flujo del trabajo del centro asistencial y de la disponibilidad de fondos para cubrir los costos.

Por todo lo dicho anteriormente, en este trabajo al igual que en la investigación de Costamagna y Figueroa (10), no se recomienda la incorporación de la técnica de cultivo para *T. vaginalis* como método diagnóstico en el laboratorio de Bacteriología ya que no implica una mejora significativa respecto del método microscópico en uso. Estos resultados se contraponen con lo expresado por Perazzi y Menghi (8), quienes recomiendan incorporar la técnica de cultivo para el diagnóstico de la infección.

En cuanto a la epidemiología, la frecuencia de tricomoniasis solo utilizando como técnica diagnóstica el examen microscópico, tuvo un incremento respecto al mismo periodo de estudio pero del año anterior, pero la diferencia no resultó ser estadísticamente significativa. Todas las pacientes con tricomoniasis fueron jóvenes embarazadas, en su mayoría cursando las últimas semanas de gestación y una cuarta parte de ellas no presentaban sintomatología, resultados que coinciden con lo expresado en las diferentes investigaciones de la bibliografía (1, 2,5, 8,14).

▪ **Referencias bibliográficas**

1. Ibáñez E.A, Gómez B.A, (2017). *Trichomonas vaginalis*: la versatilidad de un parásito tenaz. *An Real Acad Farm* Vol.83, N°1 (2017), pp.10-47.
2. Valverde, Ronny Trejos. Tricomoniasis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica* LXIX (601) 113-117, 2012.
3. Organización Mundial de la Salud: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis))
4. Rodríguez, M.I, Alonso M.C, (2003). Diagnóstico y síntomas clínicos de la tricomoniasis vaginal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Departamento de parasitología.
5. Ibon Santos D, (2013). Tricomoniasis: una visión amplia. *IATREIA* Vol.27 (2):198-205. Abril-junio 2014.
6. Herrera P.M.E, García C.L, López R.E, Serrano F. J.M. Sánchez R.N, (2011). Relación del bajo peso al nacer con la sepsis vaginal. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 2011; 37(2): 162-171.
7. Álvarez H.H.M, Sarricent R.I, Sarricent J.P, (2009). Infección humana por *Trichomonas vaginalis* y su relación con otros agentes patógenos. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 2009; 35(4):108-117.
8. Perazzi B, Menghi C, (2007), Investigación de *Trichomonas vaginalis* durante el embarazo mediante diferentes metodologías. *Revista Argentina de Microbiología*, 39: 99-104.
9. Poch F, Levin D, Levin S, Dan M (1996). Modified thioglycollate médium: a simple and reliable means for detection of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2630-1.
10. Costamagna, S.R, Figueroa M.P, (2001). Validación del examen en fresco, coloraciones de May Grunwald-Giemsa y Gram, y medios de cultivo para el diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. *Parasitología*. día v.25 N°1-2. Santiago ene.2001.

11. Betty A Forbes (2007).Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology (20 ed.).Capítulo 49.p. 543-615.
12. Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. (2009).Brock.Biología de los Microorganismos. (12ª Ed).Capitulo 5.p.117-123.Capitulo 27.p.866-71.
13. Becerril M.A (2014).Parasitología Médica (4ta ed.).México:MacGrawHill. Capítulo 8.p. 75-83.
14. Zhou, Shuwen (2017).Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia. Trabajo Fin de Grado. Tricomoniasis.
15. López G.J, Povedano M.C, Molina A.O (2012) Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones genitales.OmniaScience.
16. Webgrafia: <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>.
17. Enlace Hispano Americano de Salud. Proyecto AECID (2012).Procesamiento de muestras vaginales.
18. Ley 26639 Recuperado de [:http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000245cnt-g15-ley26639-estreptococo-b-hemolitico.pdf](http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000245cnt-g15-ley26639-estreptococo-b-hemolitico.pdf)
19. Medio Diamond modificado para *T. vaginalis* Recuperado de https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/ModDiamondsMed.htm
20. Britania Tioglicolato UPS con Indicador Medio. Rev.01 Noviembre 2015.Recuperado:http://www.britanialab.com/productos/producto/2/medios_de_cultivo_deshidratados/-/-/340/tioglicolato_usp_con_indicador_medio.
21. Webgrafia:<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/tricomoniasis.html>
22. Argimón JM, Jiménez J (eds.).(2004).Métodos de investigación clínica y epidemiológica, 3ª ed. Elsevier España SA. Madrid. p. 335-40.

▪ **Anexo**

✚ **Controles fisicoquímicos y microbiológicos del SEA:**

❖ SEA estéril comercial

- Producto: Suero Equino Adulto Estéril
- Empresa: Internegocios S.A
- Lote: 006/18
- Fecha de producción: 30/10/2018
- Fecha de vencimiento: 30/10/2021
- Establecimiento N°3682-SENASA-ARGENTINA

Tabla 8.Controles fisicoquímicos y microbiológicos.

Determinación	Resultado	Especificación	Metodología
Proteínas Totales	7,2 g%	5,0-8,0 g%	Colorimétrico-Biuret
Albumina	3,5 g%	3,0-4,5 g%	Colorimétrico-BCF
pH	7,5	7,0-8,2	Potenciométrico
Esterilidad bacteriana y fúngica	Cumple	Estéril	Tioglicolato, Soja y Saboreaud

❖ SEA estéril de producción propia

Tabla 9.Controles fisicoquímicos y microbiológicos.

Determinación	Resultado	Especificación	Metodología
Proteínas Totales	6,8 g%	5,0-8,0 g%	Colorimétrico-Biuret
Albumina	3,1 g%	3,0-4,5 g%	Colorimétrico-BGC
pH	7,0	7,0-7,5	Tira indicadora Wiener
Esterilidad bacteriana y fúngica	Cumple	Estéril	Agar Sangre, Saboreaud y tioglicolato

✚ Puesta a punto del medio de cultivo

Tabla 10. Composición del medio de cultivo caldo tioglicolato modificado para *T. vaginalis* (8, 9, 19,20).

Caldo tioglicolato modificado para <i>T. vaginalis</i>	
Ingrediente	Cantidad
Tripteina	15 gramos
Extracto de levadura	5+7 gramos
Glucosa	5,5 gramos
Cloruro de Sodio	2,5 gramos
L-Cisteina	0,5 gramos
Tioglicolato de Sodio	0,5 gramos
Agar	0,75 gramos
Resazurina	0,001 gramos
SEA	120 ml
Anfotericina B	2 mg
Penicilina G	1.000.000 UI
Gentamicina	80 mg
Agua destilada	1000 ml

✚ Reactivos para la tinción de Giemsa

- Fijador: Alcohol metílico
- Solución colorante:
- Eosina-azul de metileno 7,0 g/L
- Metanol 50%
- Glicerina 50 %