

**COLORACIONES UTILES PARA FACILITAR LA IDENTIFICACIÓN DE**  
*Trichomonas vaginalis*  
**EN LOS LABORATORIOS CLÍNICOS**

**PATRICIA SALCEDO VÉLEZ**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE**  
**MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA CON ENFASIS EN PARASITOLOGIA**

**DIRECTOR**

**JOHANNES MARINKELLE, MD. PhD.**

**CODIRECTOR**

**SONIA VILLEGAS ESTRADA, BCN. MSc.**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA**  
**CIMPAT**  
**BOGOTA, D.C. COLOMBIA**  
**2004**

A mis padres por su insuperable apoyo, a Sonia por ser la mamá, la profesora, la amiga, siempre dándome un apoyo constante y la motivación para salir adelante; al Dr. Marinkelle por enseñarme y permitirme compartir a su lado su inmensa experiencia, gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

A las directivas, profesores y estudiantes de la Facultad de Medicina de la Universidad de la Sabana, por la paciencia y el apoyo mientras realizaba mis estudios de maestría y este trabajo.

A Amparo Parrado, Bacterióloga Jefe y demás bacteriólogas del Laboratorio del Hospital San Antonio de Chía; a Olga Lucia Uribe, Bacterióloga Jefe del Laboratorio Clínico de la Clínica Teleton de Chía; a Yenny Gómez Parrado, Bacterióloga Directora del Laboratorio Bionálisis de Fusagasugá y a las bacteriólogas del Hospital San Juan de Dios de Zipaquirá, por su ayuda en la consecución de las muestras clínicas.

Finalmente a mis pacientes de Urgencias de la Fundación Cardioinfantil, a mis amigos, compañeros y a mi jefe del departamento por apoyar y acompañar mis deseos para hacerme una mejor médica y en especial una mejor persona.

## CONTENIDO

	pag.
JUSTIFICACIÓN	6
1. OPORTUNIDAD DEL ESTUDIO	7
2. OBJETIVO	7
3. MARCO TEÓRICO	8
3.1. CICLO DE VIDA	9
3.2. PATOGENIA	10
3.3. EPIDEMIOLOGÍA	11
3.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	12
3.5. DIAGNÓSTICO	13
3.6. TRATAMIENTO	14
4. METODOLOGÍA	15
4.1. CULTIVO DE TROFOZOITOS	15
4.2. FIJACION Y COLORACION	15
4.3. TECNICAS DE COLORACION	17
4.3.1. Coloraciones húmedas	17
4.3.2. Coloraciones permanentes	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
5.1. COLORACIÓN DE GRAM	25
5.2. COLORACIÓN DE WRIGHT	26

	Pag.
5.3. COLORACIÓN DE ZIEHL-NEELSEN	26
5.4. COLORACIÓN DE GIEMSA	27
5.5. COLORACIÓN TRICRÓMICO DE WHEATLEY	28
5.6. COLORACIÓN DE WRIGHT-GRAM	29
5.7. COLORACIÓN DE WRIGHT-FUCSINA	29
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	37

## JUSTIFICACIÓN

La tricomoniasis vaginal es una enfermedad de transmisión sexual (ETS) poco estudiada y posiblemente subestimada por el desconocimiento de su prevalencia en nuestro país, debido a la baja importancia que se le presta a esta infección. Esta enfermedad se podría controlar más fácilmente si se realizara un diagnóstico etiológico preciso de las patologías que producen descarga vaginal y se incluyera dentro de los programas de control sanitario en todos los niveles de atención en salud.

Para alcanzar este objetivo es necesario realizar un diagnóstico en la primera consulta y prescribir un tratamiento etiológico específico para evitar medicamentos que aumenten el riesgo de falla terapéutica, resistencia y efectos secundarios.

En la mayoría de los laboratorios clínicos de rutina en nuestro medio hay dificultad para el diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*, especialmente en aquellos que tienen un sitio de toma de muestras alejado del área de lectura del examen o que reciben muestras tomadas en otros sitios, ya que es necesario realizar una rápida identificación morfológica mediante la detección del movimiento del parásito en un montaje fresco.

En los laboratorios nacionales no se han estandarizado técnicas de fijación y coloración para realizar observaciones microscópicas detalladas que permitan una identificación precisa. Las técnicas inmunoenzimáticas como ELISA o Inmunofluorescencia Indirecta son costosas y requieren mayor equipamiento de los laboratorios, y la utilización de técnicas moleculares se restringe a los laboratorios de investigación.

## 1. OPORTUNIDAD DEL ESTUDIO

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), de los 340 millones de personas con ETS a finales del siglo 20, el porcentaje más alto (174 millones) correspondía a infecciones por *Trichomonas vaginalis*, por encima de gonorrea, sífilis y *Chlamydia*<sup>1</sup>.

A pesar de que no se encontraron referencias recientes de la prevalencia de las infecciones por tricomonas en nuestro medio, creemos que con una técnica de diagnóstico más fácil y económica se podrá hacer una mejor búsqueda, detección y manejo de los casos de esta infección, lo que contribuirá a controlar este problema de salud pública y acercarnos a la situación real actual de esta enfermedad.

## 2. OBJETIVO

Estandarizar coloraciones útiles, de fácil realización y económicas para ser establecidas en la rutina de los laboratorios clínicos para el diagnóstico etiológico de *Trichomonas vaginalis*, a partir de muestras clínicas.

### 3. MARCO TEÓRICO

*Trichomonas vaginalis* es un protozoo descrito por primera vez por Donné en 1836, como un comensal de la vagina humana. En 1916 Höhne describió la tricomoniasis vaginal como una entidad clínica y desde entonces fue aceptado gradualmente como un patógeno<sup>2</sup>. Taxonómicamente pertenece al phylum Sarcomastigophora, familia Trichomonadidae, subfamilia Trichomonadinae<sup>3</sup>.

Es un flagelado, móvil, ovoide o piriforme, con un tamaño de 10-30 x 10-18 µm. En su polo anterior se encuentra el blefaroplasto, del cual parten varias estructuras: el axostilo moderadamente extendido, un capítulo espatulado y una pelta en forma de cresta que atraviesa todo el parásito y sale por el polo posterior, 4 flagelos derivados de un complejo kinetosomal que se extienden hacia delante y un quinto de localización posterior que termina en una membrana ondulante que ocupa dos tercios del cuerpo<sup>2, 3</sup>.

Tiene tres filas de gránulos paraxostilares que son características de género. Las formas móviles son elipsoidales, ovoidales o algunas veces esféricas, haciéndose muy plásticas con capacidad de atravesar espacios estrechos. Pueden formarseudópodos que usan para comer o atarse a objetos estacionarios pero que no generan movimientos ameboides<sup>3</sup>.

El núcleo ovoidal o elipsoidal es grande, excéntrico y esta situado cerca de la terminación anterior del cuerpo en un área libre de cromatina y contiene un nucleolo esférico con 5 cromosomas<sup>3</sup>.



El citoplasma cromatofílico tiene inclusiones de diferentes tamaños y contiene partículas de alimento que son ingeridas en la región posterior por una fina estructura semejante a un pseudópodo<sup>2,3</sup>.

Posee un aparato de Golgi localizado cerca del núcleo; retículo endoplásmico como una corona alrededor del núcleo; ribosomas libres, vacuolas, gránulos basales o kinetosomas; hidrogenosomas, que son organelos sin ácido desoxiribonucleico ADN, donde ocurre la fermentación del piruvato ya que carece de mitocondrias y obtiene su energía por la fermentación de carbohidratos exógenos y endógenos y de otros compuestos como la arginina<sup>4</sup>.

Se han descrito cambios morfológicos durante su actividad metabólica. Al microscopio electrónico presenta una doble membrana nuclear porosa y una membrana citoplasmática trilaminar<sup>2, 4</sup>.

Este parásito se reproduce por fisión binaria y la división nuclear se realiza por mitosis formando. Malyszko y Hoffman describieron división múltiple y formas polinucleadas, especialmente cuando son cultivadas en medios artificiales como el de Roiron. No se ha confirmado reproducción sexual<sup>2</sup>.

Se ha discutido la formación de quistes, pero se encuentran formas esféricas con motilidad disminuida en la uretra masculina<sup>2</sup>. Es anaeróbico aerotolerante y se desarrolla fácilmente en las condiciones microaeróbicas de la vagina<sup>2, 4</sup>.

### **3.1. CICLO DE VIDA**

El hombre es el único huésped natural conocido y su hábitat es el tracto genitourinario. El parásito se reproduce en el epitelio de las mucosas en forma de trofozoito, el cual es infectante por contacto directo<sup>1, 2, 3</sup>.

El periodo de incubación varía entre 4 y 28 días, su transmisión es sexual, aunque existe transmisión no venérea y se ha reportado en el 5,1% de las toallas de baño, en el 30% de superficies plásticas, como juguetes sexuales, después de 120 minutos de exposición al ambiente externo húmedo. También existe transmisión en el canal de parto, en especial a recién nacidos femeninos ocasionándoles vaginosis<sup>5</sup>.

### **3.2. PATOGENIA**

La citoinvasión es el primer paso; para la colonización y persistencia sobre las mucosas intervienen las adhesinas y hay un cambio importante de la morfología ovalada a la ameboide, desplazando hacia la zona de contacto una densa red de microfilamentos principalmente compuesta de actina que produce un efecto citotóxico, además de fagocitosis<sup>3</sup>.

Se conocen otros factores de patogenicidad como el factor de separación celular, la 2 cistein-proteasa, diversas hemolisinas y la proteína de choque térmico que juega un papel importante, así como la interacción del parásito con otros microorganismos vaginales como los papilomavirus<sup>6</sup>.

El sistema inmune produce defensas locales, especialmente de tipo celular, pero se ha demostrado respuesta humoral local y sistémica tardía; es quimiotáctico para polimorfonucleares y activa la vía alterna del complemento. In Vitro los monocitos y macrófagos son capaces de destruir el parásito por fagocitosis.

El parásito no es invasivo, pero el ectoplasma puede penetrar la superficie del epitelio de la mucosa vaginal y uretral produciendo daño mecánico con fijación mediante proteínas y detritos tóxicos para la mucosa. Favorece el aumento de la vascularización con extravasación de leucocitos y eritrocitos, manifestándose en típicas hemorragias puntiformes que dan el aspecto a la mucosa descrito como

aparición de fresas. En el estudio patológico se encuentra además vacuolización del epitelio y aumento de las células parabasales, y en la citología por Papanicolau se encuentra atipia celular.<sup>3, 5,6</sup>

Recientemente se ha relacionado con bajo peso al nacer y prematuridad; además se sugiere una relación importante con la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana VIH, ya que las infecciones vaginales y uretrales por el parásito inducen una respuesta inmune de tipo celular muy agresiva, produciendo un infiltrado crónico por leucocitos y linfocitos, incluyendo linfocitos CD4. Esta condición aumenta el número de receptores para el virus. *T. vaginalis* tiene la capacidad de degradar los inhibidores de proteasas secretados por leucocitos, que son capaces de disminuir el ataque del virus a los linfocitos CD4<sup>7,8</sup>.

### **3.3. EPIDEMIOLOGÍA**

La tricomoniasis vaginal es una de las ETS más comunes y la única producida por parásitos. Afecta 120-180 millones de mujeres en todo el mundo. Esta enfermedad está reportada en el 12% de las mujeres latinoamericanas que consultan por síntomas vaginales. Debido a su baja patogenia y a la falta de programas de estudio y control actualmente no se conoce el número de los casos<sup>9</sup>.

En reportes del Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de Norte América CDC, la frecuencia por los métodos comunes de diagnóstico es del 3 -58% con una prevalencia del 3 - 70%, dependiendo del tipo de estudio<sup>8</sup>.

Tiene una mayor incidencia en mujeres que en hombres y en la edad fértil especialmente entre los 15 y 35 años. Aumenta su frecuencia en pacientes con otras infecciones venéreas<sup>9</sup>.

La tendencia en Colombia, desde 1976 hasta 2000, es a la disminución con una incidencia de 21,8 por 100.000 habitantes para el año 2000 seguramente con un altísimo subregistro<sup>10</sup>.

### **3.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

La infección es frecuentemente asintomática, pero en los pacientes sintomáticos causa vaginitis en mujeres y uretritis en hombres. La tricomoniasis se presenta con síntomas que solo son referidos en la consulta de ginecología o en las consultas de planificación y atención primaria. Los síntomas más frecuentes pueden ser leves con flujo vaginal escaso y de características espumosas, que puede pasar desapercibido por la paciente.

En otros casos hay cuadros intensos de vulvovaginitis con sangrado y abundante flujo espumoso grisáceo, de mal olor y aparición de excoriaciones por rascado en la vulva a causa del prurito.

El parásito también puede ocasionar dispareunia y ocasionalmente disuria, erecciones dolorosas en hombres y está relacionado con infertilidad en mujeres. <sup>1,</sup>

3, 5

### 3.5. DIAGNÓSTICO

La causa de la infección vaginal no puede ser determinada solo por los síntomas y por el examen físico. Para realizar el diagnóstico etiológico se requiere de un examen microbiológico con una evaluación microscópica del exudado vaginal; los métodos de cultivo son menos útiles por los elevados costos, debido a la necesidad de utilizar varios métodos para cubrir los gérmenes más frecuentes.

El examen microscópico del exudado vaginal requiere la determinación de tres características principales: aspecto de las células epiteliales, aspecto del germen predominante o de los morfotipos presentes, y la presencia o ausencia de leucocitos.

La toma de la muestra debe realizarse con espéculo, sin utilizar antisépticos ni lubricantes y del área de mayor secreción o en su defecto del fondo de saco posterior de la vagina. La muestra debe ser mantenida en solución salina estéril o caldo de cultivo específico para tricomonas.

Se debe realizar un montaje húmedo lo más pronto posible después de la toma, para poder observar las tricomonas en movimiento utilizando objetivos de 10 y 40X. También se recomienda realizar extensión en lámina y colorear con Gram para determinar otras características microbiológicas de la secreción<sup>5</sup>.

En las tricomoniasis se presenta un pH mayor de 4,5 y la presencia de parásitos móviles en el examen en fresco, pero cuando el parásito pierde la movilidad es difícil diferenciar *Trichomonas vaginalis* de los leucocitos, por esto es muy

importante realizar el examen lo más pronto posible después de la toma de la muestra<sup>3</sup>.

El cultivo es el método más exacto para determinar la causa de infección, ya que aumenta considerablemente la sensibilidad frente a la observación microscópica en fresco, pero no se usa en los laboratorios de rutina de control de ETS en nuestro medio. Sin embargo, en otros países, con el reciente uso de cultivos mediante el método de InPouch TV, se han encontrado resultados positivos más tempranamente (48 horas) en 87% de los casos frente a una sensibilidad del 70% en el medio de cultivo tradicional de Diamond y Roiron<sup>13,14</sup>.

La detección por la coloración de Papanicolau tiene una sensibilidad del 58% y puede variar aun más, dependiendo de la experiencia del observador. La sensibilidad en fresco se aumenta con la lectura temprana y el entrenamiento del observador<sup>15,16</sup>.

### **3.6. TRATAMIENTO**

Se realiza con nitroimidazoles. Metronidazol, Tinidazol y Ornidazol son los compuestos más usados y penetran por difusión pasiva, produciendo la reducción de un grupo nitrato a un intermedio transitorio, incrementada por el nivel de oxidoreducción celular. Actúan sobre el ADN del parásito inhibiendo su síntesis y degradándolo. Como alternativa se puede usar Clotrimazol tópico, siendo importante recordar que el tratamiento del compañero sexual es indispensable<sup>1,3,17</sup>.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. CULTIVO DE TROFOZOITOS

Para el presente estudio se obtuvieron trofozoitos móviles de *Trichomonas vaginalis* mediante cultivo de muestras vaginales de 4 pacientes del hospital San Juan de Dios de Zipaquirá y 16 pacientes del Hospital San Antonio de Chía. Las muestras se sembraron en tubos con medio para *Trichomonas Oxoid*<sup>®</sup> con suero de caballo y se incubaron a 35<sup>0</sup>C en atmósfera aeróbica.

Los tubos se observaron al microscópio diariamente, hasta obtener la multiplicación de los trofozoitos. Estos trofozoitos se mantuvieron viables mediante pases cada 10 días en las mismas condiciones anteriormente mencionadas.

### 4.2. FIJACIÓN Y COLORACIÓN

De la capa superior de los cultivos, se realizaron 374 preparaciones, de las cuales 220 se fijaron inmediatamente mientras estaban húmedas y 42 se dejaron secar antes de fijar, todos se fijaron mediante fijador para citologías vaginales Fixcell<sup>®</sup>; con laca para fijar el cabello Kleer Lac<sup>®</sup> se fijaron 28 preparaciones, con metanol 28 preparaciones y con vapores de formol igual número.

Todas estas las láminas se dejaron secar al aire antes de realizar las siguientes coloraciones:

- ❖ Gram contrastado con fucsina
- ❖ Tricrómico de Wheatley
- ❖ Giemsa
- ❖ Ziehl-Neelsen
- ❖ Wright a diferentes tiempos
- ❖ Gram-Wright
- ❖ Wright-fucsina

También se realizaron 28 preparaciones sin fijar y secadas al aire que se colorearon por las mismas técnicas.

Adicionalmente se realizaron 50 preparaciones húmedas con los siguientes colorantes:

- ❖ Azul de Nair
- ❖ Naranja de acridina
- ❖ Azul de lactofenol
- ❖ Eosina al 0.5%
- ❖ Safranina de Gram

Posteriormente se obtuvieron 50 láminas de flujo vaginal de pacientes que asistieron al Hospital San Antonio de Chía, 50 láminas provenientes del Laboratorio de la Clínica Teleton de Chía y 10 láminas del Laboratorio Bioanálisis de Fusagasugá, previa instrucción a los profesionales de estas entidades para realizar la fijación con Fixcell<sup>®</sup>, por ser la más adecuada según los resultados obtenidos anteriormente en las preparaciones realizadas a partir de los cultivos.



De estas preparaciones se realizaron en forma aleatoria coloraciones con Gram, Wright, Wright -Gram y Wright-Fucsina, coloraciones que demostraron ser las más adecuadas para realizar la identificación de las tricomonas.

También se observaron 36 preparaciones en fresco sin colorear. De todas las preparaciones realizadas se tomaron 90 microfotografías en un microscopio Olympus® B40 con dispositivo para Cámara Olympus® convencional.

### **4.3. TÉCNICAS DE COLORACIÓN**

#### **4.3.1. Coloraciones húmedas.**

- Coloración con naranja de acridina
  - Agregar una gota del colorante a una gota de la muestra
  - Colocar laminilla
  - Dejar en cámara húmeda por 20 minutos
  - Observar en microscopio de fluorescencia
  
- Coloración con azul de lactofenol
  - Realizar preparación húmeda con una gota de colorante
  - Colocar laminilla y observar al microscopio
  
- Coloración con azul de Nair
  - Realizar preparación húmeda con una gota de colorante
  - Colocar laminilla y observar al microscopio

- Coloración con eosina al 0.5%
  - Realizar preparación húmeda con una gota de colorante
  - Colocar laminilla y observar al microscopio

#### **4.3.2. Coloraciones permanentes**

- Coloración de Gram
  - Cubrir con violeta para Gram
  - Dejar actuar 1 minuto
  - Lavar con chorro fino de agua durante unos 10 segundos
  - Cubrir con lugol como mordiente. Dejar 1 minuto
  - Decolorar durante 5 segundos con alcohol-acetona haciendo presión en el frasco plástico, para que salga un chorro fino que arrastre el colorante
  - Lavar con chorro fino de agua 10 segundos
  - Cubrir con fucsina para Gram. Dejar 30 segundos
  - Lavar con chorro fino de agua 10 segundos y dejar secar al aire
- Coloración de Wright
  - Cubrir la preparación con el colorante por 1 minuto
  - Agregar agua corriente sin derramar el colorante y soplar hasta mezclar el colorante
  - Dejar actuar por 4 minutos
  - Lavar y dejar secar
- Tricrómico de Wheatley
  - Colorear con Tricrómico por 8 minutos
  - Pasar por alcohol-ácido por 10 segundos
  - Enjuagar con alcohol 95% por 2 veces

- Deshidratar en alcohol absoluto por 1 minuto
- Xilol durante 5 minutos
  
- Coloración de Ziehl-Neelsen
  - Cubrir la preparación con fucsina fenicada
  - Calentar hasta desprender vapores por tres veces sin dejar hervir y dejar actuar por 10 minutos
  - Lavar con agua corriente
  - Decolorar con alcohol ácido hasta que no destiña colorante
  - Lavar con agua corriente
  - Contrastar con azul de metileno por 2 minutos
  - Lavar y dejar secar
  
- Coloración de Wright-Gram
  - Realizar una coloración de Wright
  - Sin dejar secar la lámina, realizar coloración de Gram
  
- Coloración de Giemsa
  - Colocar las placas en una canastilla de coloración, conteniendo el colorante diluido 1 en 20 con tampón de fosfatos pH 7.0
  - Dejar actuar por 20 minutos
  - Lavar suavemente con la solución tampón y dejar secar al aire
  
- Coloración de Wright-fucsina
  - Realizar una coloración de Wright
  - Sin dejar secar la lámina, colorear con fucsina de Gram por 5 segundos
  - Lavar con agua corriente y dejar secar

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron trofozoitos vivos mediante el cultivo de 20 muestras de flujo vaginal, positivas para *Trichomonas vaginalis* al examen en fresco, de 2 hospitales de la sabana de Bogotá, cuyo número y procedencia se relacionan en la Tabla 1.

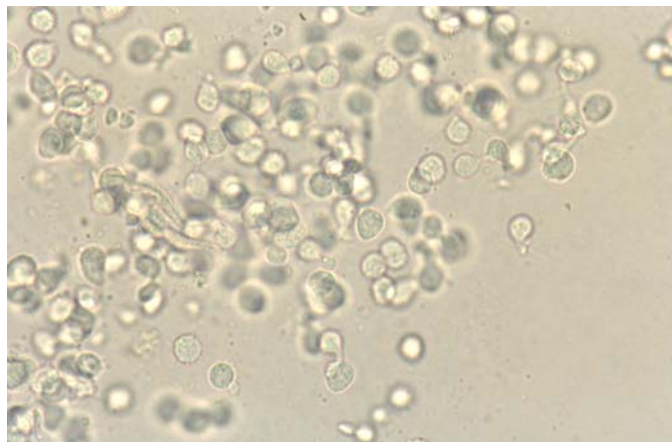
Tabla 1. Muestras clínicas para cultivo de cepas de *Trichomonas vaginalis*

PROCEDENCIA	Número de cultivos obtenidos
Hospital San Juan de Dios de Zipaquirá	4
Hospital San Antonio de Chía	16

Los trofozoitos se desarrollaron adecuadamente en forma y cantidad para las pruebas, después de 3 días de incubación en medio Oxoid® para *Trichomonas* con suero de caballo, en atmósfera aeróbica a 35°C, en incubadora convencional.

Los trofozoitos permanecieron móviles y viables por 15 días a partir de la siembra en las condiciones anteriormente mencionadas (Figura 1).

Figura 1. Trofozoitos de *Trichomonas vaginalis* en fresco. 40X



Algunas de las formas obtenidas presentan morfología de quistes, lo que confirma lo mencionado por Jirovec<sup>2</sup> (Figura 2). Llama la atención en este medio que los trofozoitos además de mostrar la división característica por fisión binaria, algunos parecen dividirse por un proceso similar a la gemación, produciendo células hijas pequeñas ancladas al axostilo que luego se desprenden para continuar su crecimiento y conservando en todos los casos sus características de género y especie (Figura 3).

Igualmente en los cultivos, a partir del día 10, observamos un fenómeno ya descrito en la literatura por Grimmer<sup>2</sup> en 1950 y recientemente publicado por Tasca y De Carli<sup>18</sup>, un aumento de la formación de pseudópodos y adherencia a partículas presentes en el medio. También se observaron en cultivos viejos, formas multinucleadas según lo descrito por Hoffman and Malyszko<sup>2</sup> (Figura 4).

Figura 2. Trofozoitos de *Trichomonas vaginalis* en fresco, mostrando quistes y formación de pseudópodos. 40X



Una vez obtenidos trofozoitos satisfactoriamente, se realizaron preparaciones para colorear o para fijar y colorear posteriormente, de acuerdo a la Tabla 2.

Figura 3. Trofozoitos de *T. vaginalis* en fresco, mostrando gemación. 40X

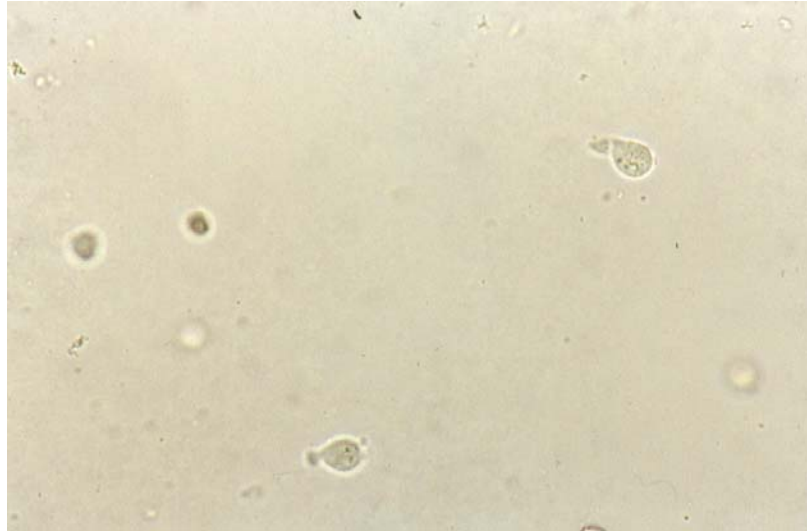


Figura 4. Formas multinucleadas procedentes de cultivos viejos. 40X



En las preparaciones húmedas coloreadas con azul de lactofenol, azul de Nair (Figura 5) y safranina no se obtuvieron resultados satisfactorios, debido a que los trofozoitos, además de perder su motilidad, no evidencian las características morfológicas como son forma y posición del núcleo, presencia de bleflaroplasto, axostilo y flagelos, que permitan su identificación. En estas preparaciones además se pierde su forma piriforme característica y la evidencia de la membrana ondulante.

En las preparaciones húmedas con eosina al 0.5%, a pesar de la pérdida de la movilidad, los trofozoitos conservan su morfología y se observan claramente estructuras como la membrana ondulante, los flagelos, el axostilo en su posición habitual y hay evidencia del núcleo aunque no muy contrastado (Figura 6).

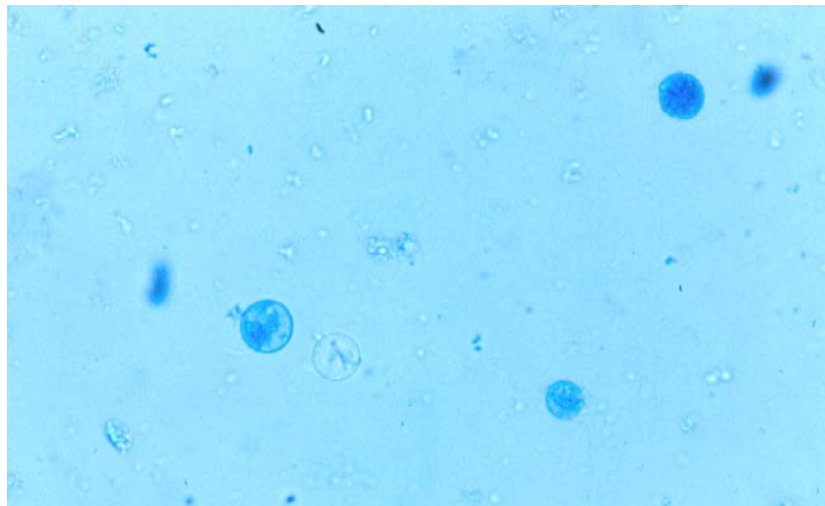
Tabla 2. Tipo de Coloración realizada a partir de cultivos

Coloración	Número de láminas					
	Sin fijar	Laca	Metanol	Formol	Fixcell seco	Fixcell húmedo
Gram	4	4	4	4	6	40
Wright	4	4	4	4	6	60
Giemsa	4	4	4	4	6	20
Tricómico	4	4	4	4	6	20
Ziehl-Neelsen	4	4	4	4	6	10
Gram-Wright	4	4	4	4	6	10
Wright-fucsina	4	4	4	4	6	60
Eosina al 5%	20	0	0	0	0	0
A. de lactofenol	5	0	0	0	0	0
Azul de Nair	10	0	0	0	0	0
Safranina	5	0	0	0	0	0
N.de acridina	10	0	0	0	0	0

La coloración de naranja de acridina no mostró los resultados esperados, porque además de perder la movilidad, se altera la forma característica de los trofozoitos, tornándose redondos y difíciles de diferenciar de leucocitos presentes en muestras vaginales, aunque algunos autores la reportan como una técnica útil en el diagnóstico con sensibilidad del 54.5%<sup>19</sup>.

En las técnicas convencionales usadas para fijación, como metanol y vapores de formol, todas las estructuras observadas pierden sus características diagnósticas, por lo cual fueron descartadas. En las preparaciones fijadas con laca de para el cabello, aunque el parásito conserva sus características, el fondo de la preparación presenta un punteado grueso, que hace difícil la identificación morfológica en algunos casos.

Figura 5. Trofozoitos de *T. vaginalis* con coloración vital de azul de Nair. 40X

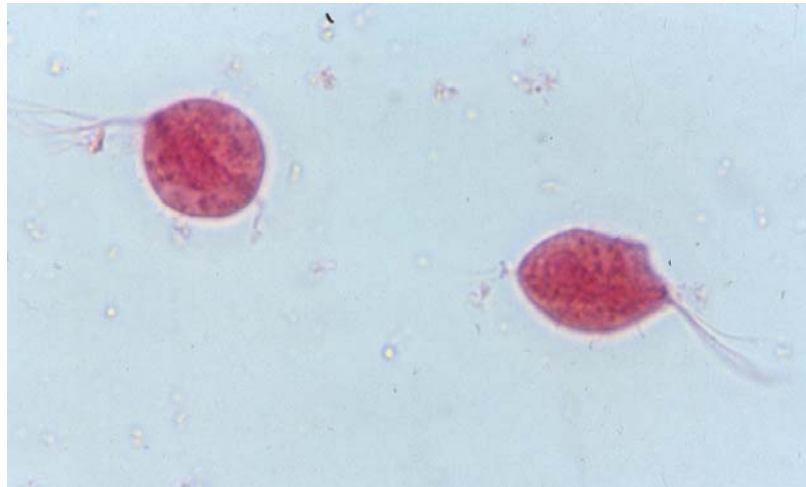


Al fijar las preparaciones con Fixcell<sup>®</sup>, las características morfológicas del trofozoito se muestran conservadas así como otras estructuras y morfotipos



presentes en los montajes en fresco del frotis vaginal, como bacterias, leucocitos y células, especialmente.

Figura 6: Trofozoitos de *T. vaginalis* con eosina al 0.5% en fresco. 40X



Se notó la conveniencia de realizar la fijación inmediatamente después de realizar la preparación cuando aun está húmeda, puesto que al fijar en seco no se obtuvieron resultados adecuados.

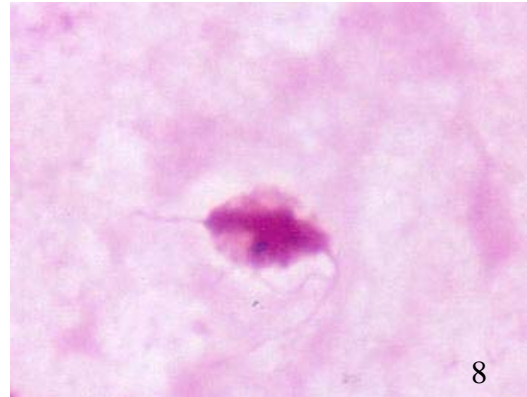
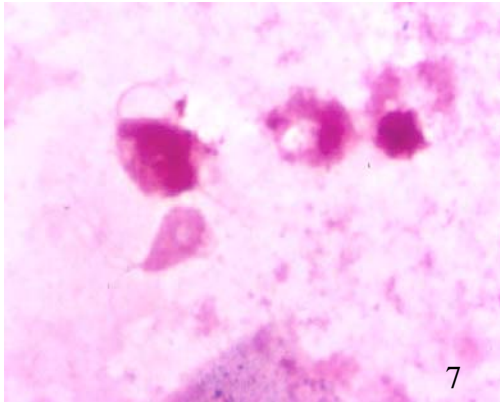
En cuanto a las coloraciones permanentes se obtuvieron los siguientes resultados:

### 5.1. Coloración de Gram

Los trofozoitos se observan con sus características como forma, núcleo y flagelos, aunque no hay buen contraste entre citoplasma y núcleo. Es de anotar que lo anterior es cierto sólo cuando se utiliza fucsina como colorante de contraste, pues la safranina (colorante de contraste del Gram recomendado para identificación de la mayoría de las bacterias) no colorea los flagelos (Figuras 7 y 8). La fijación con

Fixcell® no altera leucocitos, bacterias, ni células presentes en las muestras clínicas.

Figuras 7 y 8. Trofozoitos de *T. vaginalis* con coloración de Gram. 100X



## 5.2. Coloración de Wright

Se realizó esta coloración a diferentes tiempos de exposición del colorante, lográndose mejores resultados con el tiempo convencional de 1 minuto y mostrando un excelente contraste entre citoplasma y núcleo que conserva su forma y localización típica, pero no evidenciando flagelos ni axostilo, aunque los trofozoitos pueden diferenciarse de otros elementos formes por su morfología y tamaño característico (Figuras 9 y 10).

## 5.3. Coloración de Ziehl-Neelsen

Aunque se logran evidenciar características morfológicas que permiten la diferenciación de este parásito, tanto en el método convencional como en el modificado de utilidad en otros protozoarios como las coccidias, no existe un contraste entre citoplasma y núcleo (Figura 11).

Figuras 9 y 10. Trofozoitos de *T. vaginalis* con coloración de Wright.100X

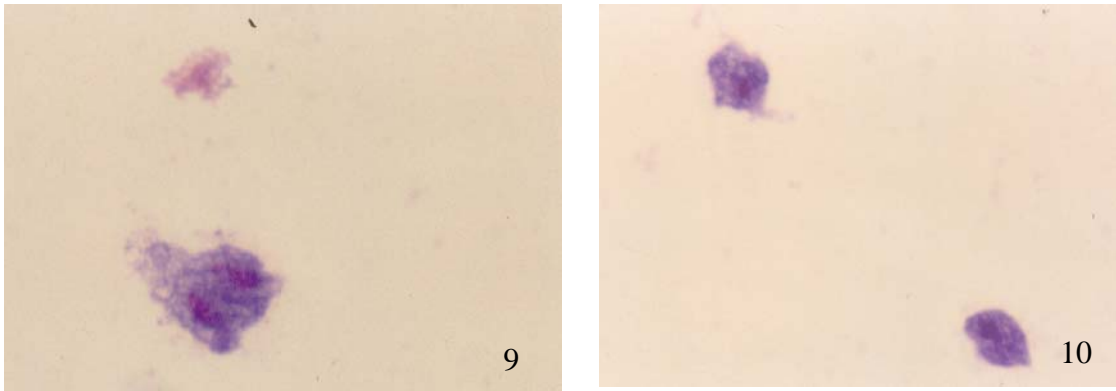
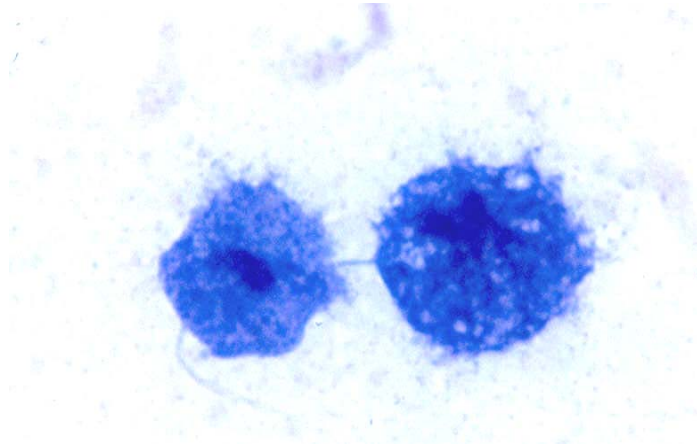


Figura 11. Trofozoitos de *T. vaginalis* con coloración de Ziehl -Neelsen.100X.



#### 5.4. Coloración de Giemsa:

Con este colorante los trofozoitos muestran sus características típicas, lo cual concuerda con lo descrito por la mayoría de autores (Figuras 12 y 13).

Figura 12. Trofozoito de *Trichomonas vaginalis* con Giemsa. 100X

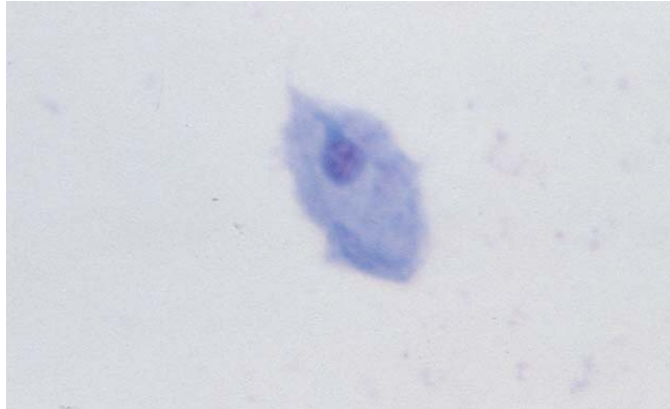
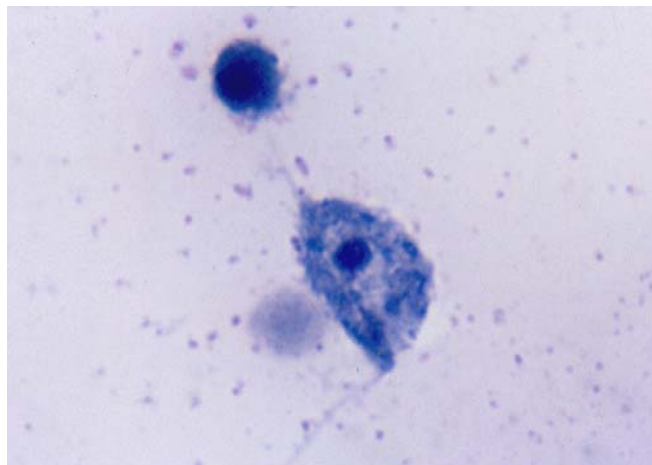


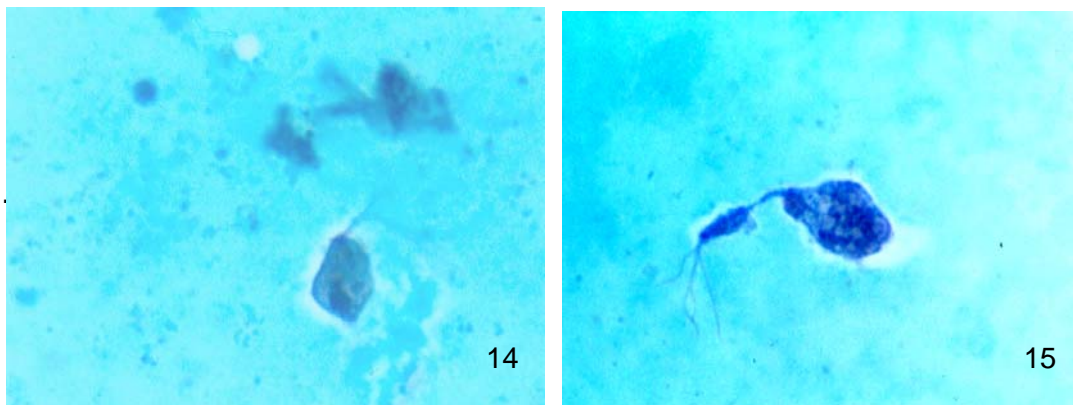
Figura 13. Trofozoito de *T. vaginalis* con Giemsa, mostrando célula hija. 100X



### 5.5. Coloración de Tricrómico de Wheatley

Mostró ser una buena coloración para este parásito a pesar de sus dificultades técnicas. Hay un buen contraste entre núcleo y citoplasma y se evidencia la presencia del axostilo, además permite una buena diferenciación con los leucocitos y las células epiteliales presentes en las muestras clínicas (Figuras 14 y 15).

Figuras 14 y 15. Trofozoitos de *Trichomonas vaginalis* con Tricrómico. 100X



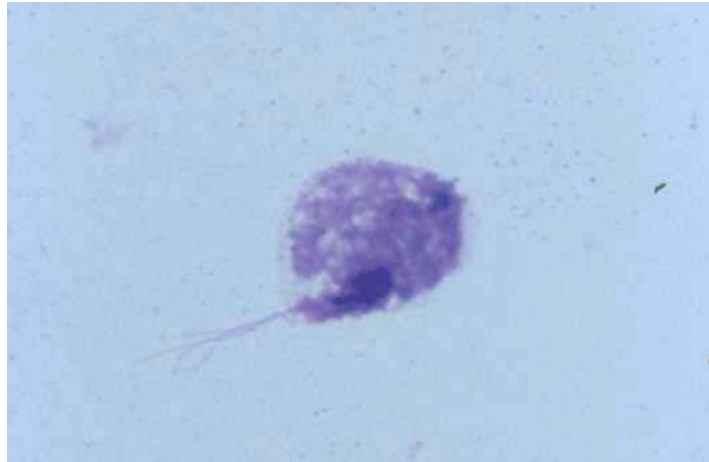
### 5.6. Coloración de Wright–Gram

De acuerdo con los resultados anteriores, el buen contraste entre núcleo y citoplasma con el colorante de Wright y la evidencia de flagelos y axostilo con coloración de Gram, se realizó una combinación de estas dos técnicas. El resultado fue poco satisfactorio, ya que el cristal violeta con un color morado oscuro hace perder el contraste obtenido con el colorante de Wright, aunque se evidencian nuevamente en forma adecuada los flagelos (Figura 16).

### 5.7. Coloración de Wright-fucsina

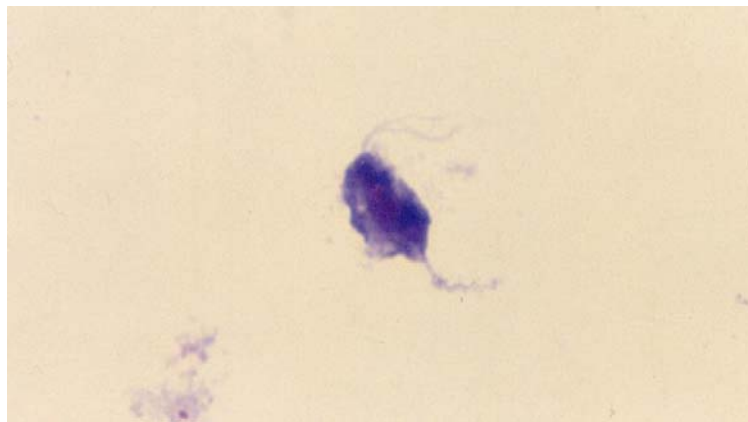
Ya que no se obtuvieron buenos resultados con Wright-Gram, se experimentó una combinación de la coloración de Wright con fucsina y después de varios cambios en el tiempo de exposición a la fucsina, se encontró un resultado óptimo con un Wright convencional adicionado de fucsina de Gram durante 5 segundos. Con esta técnica encontramos que se conserva el contraste entre núcleo y citoplasma, y además se evidencian claramente flagelos y axostilo, lo que completa las características de identificación del parásito en estudio (Figuras 17 y 18)

Figura 16. Trofozoito de *T. vaginalis* coloreado con Wright-Gram



Revisando la literatura solo encontramos referencia de una coloración combinada con fucsina, citada por Botero<sup>2</sup> como tricrómico-fucsina para protozoos formadores de esporas, que no mostró resultados adecuados para el propósito de este estudio.

Figura 17. Trofozoito de *T. vaginalis* coloreado con Wright-fucsina. 100X



En las coloraciones realizadas sobre las preparaciones a partir de muestras clínicas se obtuvieron resultados satisfactorios con la mayoría de las coloraciones escogidas, sin embargo también se obtuvieron mejores resultados con la coloración Wright-fucsina (Figuras 18, 19, 20 y 21).

Figura 18. Muestra de flujo vaginal positiva para *T. vaginalis* . Coloración de Wright

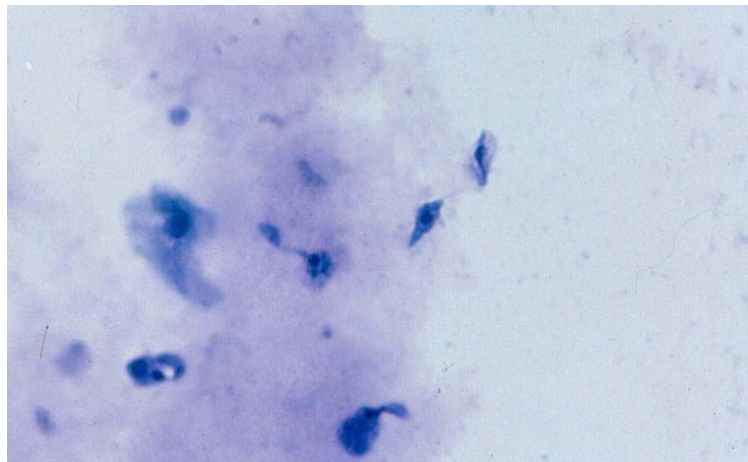


Figura 19. Muestra de flujo vaginal positiva para *T. vaginalis*. Coloración de Gram.

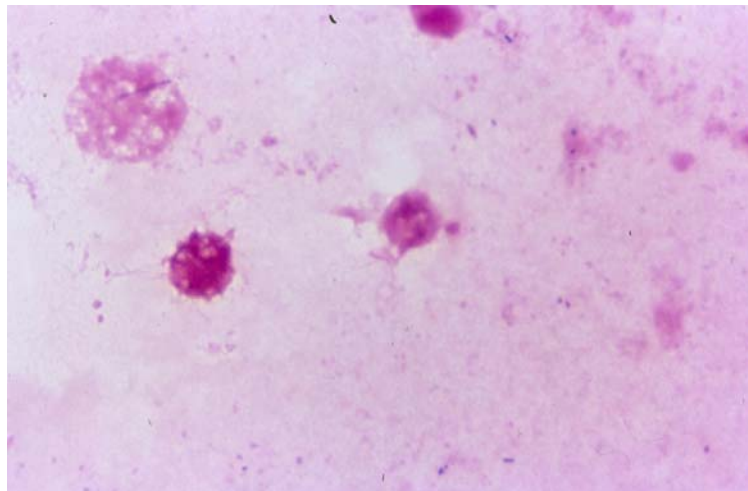


Figura 20. Muestra de flujo vaginal con *T. vaginalis*, coloreada con Wright-fucsina

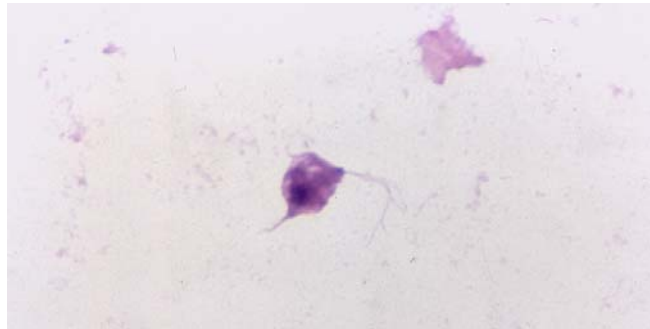


Figura 21. Muestra de flujo vaginal con *T. vaginalis* coloreada con Wright-Gram



En la tabla 3 se detallan los resultados obtenidos con tales preparaciones, aunque es necesario hacer estudios posteriores para validar la coloración de Wright-fucsina desarrollada en este estudio.

Tabla 3. Relación de muestras de flujo vaginal

Hospital	Muestras positivas	Muestras negativas
San Antonio de Chía	7	44
Bioanálisis Fusagasugá	1	9
Clínica Teletón	5	45



## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Después de realizar las preparaciones, tanto a partir de cultivos como tomadas de pacientes con flujo vaginal con presencia de *Trichomonas vaginalis* y otras infecciones, se encontró que este parásito, cuando se realizan preparaciones permanentes, requiere ante todo una particular técnica para su fijación debido a que tiene una delicada membrana que dificulta la conservación de las estructuras diagnósticas propias de esta especie.

Según lo descrito anteriormente, el método de fijación más adecuado fue la fijación con Fixcell<sup>®</sup>, de cuya composición desafortunadamente no se encontró ninguna referencia por ser una marca registrada con una confidencialidad de la fórmula y composición por parte del fabricante; este producto se fabrica en Venezuela y está ampliamente comercializado en nuestro país.

Se utiliza en la fijación de muestras de patología y citología, tanto en las tomas de muestras de los laboratorios clínicos como en otras áreas hospitalarias. El producto tiene la ventaja de ser de bajo costo y fácil de usar, con una técnica ya conocida por las personas encargadas de la toma de muestras ginecológicas. Alternativamente se puede utilizar, no con tan buenos resultados como los obtenidos con Fixcell<sup>®</sup>, la laca para fijar el cabello, debido a que esta contiene otros ingredientes como colorantes, esencias y varios alcoholes.

Cabe anotar que es importante la forma de realizar las preparaciones, la cual se debe hacer sin estirar la muestra sobre el portaobjetos con el fin de preservar la morfología de los trofozoitos y realizar la fijación lo más pronto posible, mientras la preparación aun se encuentra húmeda.

Varias coloraciones mostraron ser adecuadas para teñir preparaciones permanentes siempre y cuando la fijación se realice de la forma antes descrita. Entre estas se encuentran: Tricrómico, Wright, Giemsa y Gram, pero cada una de estas presenta ventajas y algunas desventajas así: con la coloración de Wright no se evidencian los flagelos ni el axostilo y con la coloración de Gram se evidencian bien los flagelos pero el resto de las estructuras aparecen distorsionadas.

Como ventajas podemos mencionar que los reactivos de estas 2 coloraciones son poco costosos y de uso corriente en los laboratorios clínicos en todos los niveles de atención ya que se manejan en forma rutinaria y la coloración de Gram es mandatoria en todas las muestras de flujo vaginal como parte del diagnóstico microbiológico. Otra ventaja destacable es que con la fijación mencionada no se alteran las estructuras de otros elementos formes como bacterias, células, leucocitos y hongos, encontrados en la patología vaginal.

En cuanto a las coloraciones Tricrómico y Giemsa, aunque mostraron ser adecuadas, son coloraciones costosas, difíciles de estandarizar, dispendiosas de realizar y requieren experticia para su manejo, además no son de utilización rutinaria en nuestros laboratorios clínicos.

Por lo tanto, únicamente la coloración nombrada anteriormente como Wright-fucsina y que hemos desarrollado a través del trabajo de laboratorio del presente estudio, destaca en forma clara y precisa todas las estructuras características de género y especie de *Trichomonas vaginalis*, para permitir sin lugar a dudas, la identificación de este patógeno tanto a partir de muestras clínicas como de cultivos.

Esta coloración es sencilla de realizar y no requiere costos adicionales por parte de los laboratorios, por las razones mencionadas anteriormente. Los profesionales conocen perfectamente la técnica para su utilización, lo que garantiza un rápido

aprendizaje sin necesidad de entrenamiento y solo a través de la lectura y el ensayo de la nueva técnica.

No recomendamos ninguna de las coloraciones para montajes húmedos que fueron probadas en el estudio, porque los colorantes son tóxicos en menor o mayor grado y el único que no lo es, azul de metileno amortiguado de Nair, distorsiona el parásito volviéndolo redondo, seguramente por ser preparado a un pH ácido; este colorante además requiere de trofozoitos vivos para cumplir su propósito como colorante vital, dificultad esta que ha sido mencionada en la justificación del estudio.

Si bien no era uno de los propósitos de este estudio, llama la atención lo observado con el cultivo que se utilizó para la obtención de trofozoitos vivos. A diferencia de lo mencionado en algunos artículos de la literatura, los cultivos fueron sencillos de realizar, relativamente económicos y fáciles de mantener, pues no se requirió de elementos diferentes a los encontrados en cualquier laboratorio de microbiología.

Se obtuvo excelente crecimiento en atmósfera de aerobiosis con desarrollo de los trofozoitos en todos los niveles de los tubos utilizados (superficie, parte media y botón), contrario a lo descrito con otros medios como Diamond y Roiron para los que se requiere una atmósfera anaeróbica. Los trofozoitos se conservaron viables y con las características morfológicas descritas por 15 días aproximadamente, sin embargo en algunos de estos trofozoitos cuando empiezan a envejecer se observó una multiplicación por lo que podríamos llamar gemación, mostrando una pequeña célula hija al final del axostilo.

La pequeña célula hija, similar a la célula madre, posiblemente se desprende y luego empieza a crecer ya que en los cultivos se observaron trofozoitos de diferentes tamaños, desde muy pequeños hasta “adultos”. En la literatura

consultada no se encontró ninguna mención de este fenómeno pero aparecen otros fenómenos como particiones irregulares en los cultivos viejos, así como la presencia de formas quísticas multi-nucleadas, sin dejar de observar la división característica por fisión binaria longitudinal.

Se resalta que no fue objeto del estudio medir variables epidemiológicas, pero creemos que con una buena difusión de la técnica de coloración y fijación desarrollada en este estudio, se contribuirá a realizar un mejor diagnóstico de esta parasitosis y conocer su verdadera incidencia y prevalencia, ya que las cifras reportadas en nuestro medio no parecen corresponder a la realidad de esta enfermedad, razón por la cual no se le presta atención por parte del personal de salud y de las políticas de control de las ETS.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Vélez H, Rojas W, Borrero J, Restrepo J. Enfermedades Infecciosas. 6ª Edición. Corporación para investigaciones biológicas, 2003: 570-1
2. Jirovec O, Petru M. *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis. En: Ben Dawes. *Advances in Parasitology*. , London (UK): Academic Press, 1968. Vol. 6: 117-188
3. Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. 4ª. Edición, Medellín, Corporación para investigaciones biológicas, 2003: 294-5
4. Honigberg BM. Trichomonads of Importance in Human Medicine in Parasitic Protozoa. New York: Academic Press, 1978. Vol. 2
5. Chester P, Wayne E, Clifton R. Parasitología Clínica 2ª. Edición. Mexico: Salvat Editores S.A, 1994 :49-63
6. Boyle DCM, Barton SE, Uthayakumar s, Hays PE, Pollok JW, SteerPJ, Smith JR. Is bacterial vaginosis associated with cervical intraepithelial neoplasia?. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13: 159-16
7. Soper D. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled. *Am J of Obstet and Gynecol* 2004; 190: 281-90
8. Sorvillo F, Smith L, Kerndt P, Ash L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7(2): 927-32
9. Rojas L, Rodríguez M, Sarria C, Palma S, Sariego I, Fraga J. Frecuencia de infecciones por *Trichomonas vaginalis* en parejas con trastornos de fertilidad. *Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri* 2002; 54 (2): 85-90
10. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional : Colombia 2001; 6(22):329-44
11. Morbidity And Mortality Weekly Report . 1993; 42: RR-14
12. Lorrente C, Ortiz C, Ley M. Evaluación de un reactivo de Latex para el diagnostico rápido de *Trichomonas vaginalis*. *Rev Cubana Obstet Ginec* 2001; 27(2):114-9
13. Ohlemeyer Ch. In pouch™ TV culture system fares well in comparison study in teen. *Women's Health Weekly*, 1998; March 16:19-20

14. Draper D, Parker R, Patterson E , Jones W, Beutz M, French J, Borchardt K. Detection of *Trichomonas vaginalis* in Pregnant Women with the InPouch TV Culture System. *J Clin Microbiology* 1993; 31(4):1016-18
15. Costamagna SR, Prado M. Validación del examen en fresco, coloraciones de May Grunwald-Giemsa y Gram y medios de cultivo para el diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol al día* 2001; 25 (1-2):60-64
16. Mason PR, Heather S, Fripp PJ. Comparison of four techniques for the routine diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *J Clin Pathol* 1976; 29: 154-7
17. Vásquez F, García MJ, Pérez F, Palacio V. *Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica* 2001; 19 (3)
18. Tasca T, De Carli GA. Shape variations of *Trichomonas vaginalis* in presence of different substrates. *Parasitol Latinoamerican* 2002; 57: 5-8
19. Costamagna SR, Prado M, Soria O, Fuentes A, Ferreyra R. La coloración fluorescente con naranja de acridina y el PAP: validación de ambas técnicas para la detección de *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol al día* 2000; 24:(3-4)
20. Costamagna SR, Soria O, Vaylet S, Algunas consideraciones sobre el examen en fresco en el diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol al día* 1997; 21: 66-8
21. Costamagna SR, Vaylet S, Prado M, Mezquita L. Tricomonosis: Validación de tres pruebas para el diagnóstico por el laboratorio de análisis. *Parasitol al día* 1967; 21: 61-5