

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)

JUEGO PARA EL DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE LA TRICHOMONIASIS VAGINAL EN LA MUJER

Lic. Ivette Maciques Rodríguez,¹ Dra. Magaly Alonso Castellanos² y Maricelsa Romero³

RESUMEN: Se desarrolla un juego de reactivos para el diagnóstico de *Trichomonas vaginalis* a partir de partículas de látex sensibilizadas con inmunoglobulinas contra *T. vaginalis*, un control positivo y uno negativo. Este juego se utiliza en el diagnóstico del protozoo mediante una aglutinación rápida sin necesidad de emplear ningún equipo específico. Los resultados mostraron una sensibilidad de 98,7 % y especificidad de 99 %, para un límite de detección de 104 células/mL. Se realizó el estudio de sensibilidad al látex durante un año a los controles positivos y negativos con resultados satisfactorios.

DeCS: TRICOMONIASIS/diagnóstico; VAGINITIS POR TRICHOMONAS/diagnóstico; FEMENINO; TESTS DE FIJACION DE LATEX/métodos; ALERGIA AL LATEX.

Trichomonas vaginalis es uno de los principales patógenos responsables de vaginitis, cervicitis y uretritis en la mujer. A pesar de que es necesario un diagnóstico seguro para el tratamiento específico, el diagnóstico clínico de rutina depende de la identificación del parásito en las muestras de exudado vaginal a través del microscopio óptico, que desafortunadamente detecta solamente el 60 % de las mujeres positivas por cultivo.¹

El cultivo del exudado en medios selectivos está considerado como el diagnós-

tico de certeza de este microorganismo,^{2,3} pero es costoso y se necesita de muchos días de incubación, tiempo durante el cual los pacientes infectados continúan transmitiendo este parásito.¹

En el hospital ginecoobstétrico "Ramón González Coro", en el primer trimestre de 1996, se investigaron 481 casos, de los cuales se evidenció *Trichomonas vaginalis* en el 8,3 % de las mujeres estudiadas, y se consideró como uno de los 3 microorganismos que con mayor frecuencia causa vaginitis.

¹ Máster en Ciencias. Investigadora Agregada. Departamento de Parasitología.

² Profesora Titular. Departamento de Parasitología.

³ Especialista. Departamento de Producción de Medicamentos.

Contar con un medio de diagnóstico rápido, sensible y específico es de suma importancia para el especialista. Las pruebas de aglutinación en látex brindan el diagnóstico en 5 min y por su sencillez pueden realizarse en la misma consulta por el personal paramédico.

En nuestro trabajo nos propusimos como objetivo la elaboración y validación de un juego de reactivos de látex para el diagnóstico rápido de la trichomoniasis vaginal en la mujer.

Métodos

1. Aislamiento y cultivo

Se aisló *Trichomonas vaginalis* de un exudado vaginal de una mujer con signos clínicos de vaginitis. Este aislamiento se cultivó en medio Diamond modificado durante 48 h a 37 °C en microaerofilia. La especie se identificó por el estudio morfológico mediante la coloración de Giemsa.⁴

2. Animales

- Conejos: se utilizaron 3 conejos machos, Nueva Zelanda, blancos, de 2 a 3 kg de peso para cada una de las variantes de inmunógenos y 3 conejos controles. Estos se colocaron individualmente en jaulas, recibieron comida y agua *ad libitum*, y el ciclo diurno fue de 6 horas luz.
- Carneros: se emplearon 3 carneros Pelibuey de 45 a 50 kg de peso, que se mantuvieron en condiciones de vida libre, recibieron pienso y forraje 2 veces al día y agua *ad libitum*.

3. Elaboración del antígeno

- Antígeno crudo: para obtener el antígeno crudo (Agc), los frascos de

cultivo del parásito de 48 h se colocaron en baño frío durante 10-15 min, posteriormente se lavaron 3 veces en solución salina estéril a 2 000 rev/min, durante 10 min y el sedimento obtenido se sometió a una disrupción ultrasónica con un ultrasonificador Modelo CV17 (*Bioblock Scientific*) 3 veces durante 10 seg a 20 amplitudes.

- Antígeno soluble: para obtener el antígeno soluble (Ags), parte del Agc se centrifugó a 100 000 rev/min, durante 1 h a 4 °C, colectándose el sobrenadante.
- Antígeno fragmentado: para la obtención de este antígeno se aplicó el mismo procedimiento que para el Agc, con la variante de que el sedimento obtenido se congeló a -70 °C y se descongeló para fragmentar las células.
- Determinación de la concentración de proteínas: El método de Bradford⁵ se aplicó para conocer la concentración de proteínas de cada antígeno, y se seleccionó aquel que tuviera una concentración igual o mayor a 1 mg/mL.

4. Obtención de inmunosueros específicos contra *T. vaginalis*

- Inoculación: cada una de las variantes de inmunógenos se inocularon siguiendo el mismo esquema de inoculación.
- Los antígenos crudo y soluble se inocularon con una concentración entre 1 y 2 mg/mL de proteínas. El antígeno completo se preparó e inoculó con una concentración de 10⁷ células/mL. Las dosis de recuerdo se elaboraron con la mitad de las concentraciones para cada inmunógeno.
- Determinación del título de anticuerpos: los títulos de anticuerpos se determinaron por inmunodifusión en gel de Agarosa (IGA), aplicando diluciones

de los sueros desde 1:2 hasta más de 1:64. El suero se colectó cuando el título fue superior a 1:32.

5. *Obtención de las inmunoglobulinas v conjugación con las partículas de látex*

- Inmunoglobulinas: las proteínas del suero se purificaron por precipitación con sulfato de amonio y se obtuvieron inmunoglobulinas (Ig) totales, para obtener IgG se realizó una cromatografía por DEAE celulosa⁶ y se determinó la concentración de proteínas de cada una de ellas por densidad óptica a 280 nm. Las Ig totales y la IgG se evaluaron por IGA. Para la sensibilización de las partículas de látex, las inmunoglobulinas se diluyeron en solución tampón de glicina (STG), pH 8,4, con diluciones dobles desde 1:2 hasta 1:128, teniendo en cuenta la concentración de proteínas.
- Calidad del látex utilizado: se utilizaron partículas de látex suministradas por la casa *BANGS LAB*.
- Proceso de conjugación: para la conjugación de las partículas de látex se utilizaron 2 esquemas:
 - Esquema A: se unieron las Ig con las partículas de látex al 0,1 y 0,05 % durante 1 h a 37 °C en agitación constante y se bloqueó con albúmina bovina al 10 %, además se unieron las Ig con el látex al 1 % durante 30 min, en las mismas condiciones. Al final se le añadió azida sódica como preservativo.
 - Esquema B: la conjugación de las partículas de látex se realizó de la misma forma que en el esquema anterior, pero después de la unión y del bloqueo con albúmina se centrifugó, eliminando el sobrenadante y restituyendo nuevamente con STG. Al concluir el proceso se le añadió urea 0,1 M como estabilizador y azida sódica como preservativo.
- Selección de la dilución de trabajo de las Ig conjugadas: las Ig anti *T.vaginalis* conjugadas con látex, se evaluaron frente a las diferentes concentraciones de trichomonas, 10^3 a 10^5 trichomonas/mL y se seleccionó la mayor dilución de las Ig que detectó una menor concentración de microorganismos.

6. *Elaboración del control positivo*

Para obtener el control positivo se utilizaron frascos de cultivo de *T. vaginalis* de 48 h de incubación, se colocaron en baño frío durante 10 a 15 min, pasado este tiempo se lavaron con STG, pH: 8,4, 3 veces a 2 000 rev. durante 10 min, después de la última centrifugación el sedimento se resuspendió en un volumen entre 10-15 mL y se contó en cámara de Neubauer. Posteriormente se sonicó 3 veces a 14 amplitudes por 10 segundos y se le añadió 10 µL de azida sódica al 0,1 % por cada mL de la solución.

7. *Elaboración del látex control negativo y el control negativo del juego*

- Látex control negativo: Para la elaboración del látex control negativo se obtuvieron las inmunoglobulinas totales de carneros sanos, no inmunizados y se sensibilizaron con las partículas de látex aplicando el mismo procedimiento que para el látex anti *T. vaginalis*.
- Control negativo: el control negativo del juego es STG, pH-7.

8. *Estabilidad de los reactivos del juego*

- Prueba de estabilidad: 3 lotes del juego de látex-globulina anti *T. vaginalis* se colocaron en un refrigerador domés-

tico con una temperatura entre 2-8 °C, durante un año, y se evaluó su funcionalidad mensualmente frente a diluciones de la cepa.

- Reacciones cruzadas: se prepararon suspensiones de microorganismos como: *E. coli*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp.* y *Lysteria spp*, con una concentración de 10⁶ células/mL, evaluada por la técnica de Mc Facland y se enfrentaron al látex inmunoglobulina anti *T. vaginalis*.

9. Validación de la prueba rápida de látex

- Prueba de látex: la prueba rápida de látex globulina se realizó depositando en una superficie de cristal 20 µL del reactivo de látex acoplado y 20 µL del sedimento del exudado vaginal; con un removedor se mezclaron ambas gotas y se procedió a imprimir un movimiento de rotación por 3 min. Durante ese tiempo se observó contra una superficie oscura y se determinó la positividad por la presencia de aglutinación, igual a la del control positivo.
- Cultivo: el cultivo se utilizó como técnica de referencia. Se colocaron alrededor de 100 µL del exudado vaginal en un tubo de cultivo de tapa de rosca que contenía 5 mL de medio Diamond modificado. Posteriormente se incubó a 37 °C durante 48 h; pasado ese tiempo se tomó una gota del sedimento con ayuda de una pipeta Pasteur, se colocó sobre un portaobjeto y se cubrió con un cubreobjeto para observarla en el microscopio en el lente de 40X.

10. Indicadores de calidad

Los indicadores de calidad, sensibilidad, especificidad y eficiencia se obtuvieron según las fórmulas empleadas por Argote y López.⁷

Resultados

Las láminas coloreadas evidenciaron la morfología característica del protozoo: 4 flagelos anteriores, un cuerpo en forma de pera con una membrana ondulante típica más corta que el cuerpo, sin flagelo posterior.

Los inmunosueros obtenidos de los conejos inmunizados con antígeno crudo tuvieron títulos de anticuerpos superiores a 1:64, mientras que los inmunosueros obtenidos de los conejos inmunizados con antígeno fragmentado y antígeno soluble tuvieron títulos de anticuerpos hasta 1:8 y 1:16, respectivamente en cada uno de los animales inoculados, por lo que las siguientes inmunizaciones se realizaron con antígeno crudo.

El título de anticuerpo en los sueros de carneros inmunizados con antígeno crudo tuvieron títulos superiores a 1:128.

Se seleccionaron las Ig totales para la conjugación con las partículas de látex, ya que el título de anticuerpos obtenido con las IgG fue inferior a 1:8, mientras que con las Ig totales el título de anticuerpos fue mayor de 1:32.

En el esquema A de la conjugación, los látex que se obtuvieron aglutinaban ligeramente con el control negativo y no eran estables por más de 2 semanas. Los látex obtenidos por el esquema B no aglutinaban con el control negativo y se mantuvieron estables por más de 2 semanas, por lo que se continuó la sensibilización con este esquema, utilizando el látex al 0,1 %.

En la tabla 1 se observan los resultados de la evaluación de las diferentes diluciones de los conjugados frente a diferentes concentraciones de *T. vaginalis*. Se observa que la mejor dilución del conjugado es 1:64, ya que es la mayor dilución de las Ig que detecta la menor concentración de microorganismos.

TABLA 1. Evaluación de las diferentes diluciones de Ig anti *T. vaginalis* conjugadas con látex

Trichomonas/mL	Diluciones de las Ig conjugadas						
	2	4	8	16	32	64	128
10 ³	-	-	-	-	-	+	-
10 ⁴	-	-	+	+	-	+	-
10 ⁵	-	-	+	+	+	+	-

TABLA 2. Porcentaje de mujeres que resultaron positivas a *T. vaginalis* por látex y cultivo en diferentes centros asistenciales del país

Centro asistencial	No. de muestras	Positivas por	
		Látex	Cultivo
"Ramón González Coro"	564	33	33
Materno de San José	166	23	22
Higiene y Epidemiología	167	15	14
Policlínico del Este	47	7	7
"Hijas de Galicia"	185	78	80
Total %	1 129	156 (13,5 %)	156 (13,5 %)

La estabilidad de los reactivos que componen el juego de *T. vaginalis* fue de 12 meses y no se evidenció reacción cruzada con los microorganismos estudiados, que forman parte de la flora vaginal de la mujer.

La validación de nuestra prueba se realizó en diferentes centros asistenciales del país. En la tabla 2 se muestran los porcentajes de mujeres que resultaron positivas a *T. vaginalis* por látex y por cultivo (técnica de referencia) en cada uno de los centros de estudio.

Para determinar la sensibilidad, especificidad y eficiencia de la prueba rápida de látex se utilizó el cultivo como técnica de referencia y se tomaron como verdaderos positivos y verdaderos negativos las muestras en que se aislaron o no microorganismos por esta técnica respectivamente (tabla 3).

TABLA 3. Indicadores de calidad de la prueba rápida de látex

Indicadores de calidad	Látex (%)
Sensibilidad	98,7
Especificidad	99
Eficiencia	99

Discusión

Las características morfológicas observadas en el presente aislamiento corresponden a las descritas por Levine en 1973⁸ para la especie *T. vaginalis*; por otra parte, con estas características solo puede estar presente esta especie en los exudados vaginales.

El cultivo del parásito es sin duda la técnica de elección para confirmar un resultado positivo,^{1,9,10} no obstante, otros investigadores señalan que la prevalencia de la trichomoniasis está subestimada cuando se diagnostica solamente por este método.¹¹

Estudios comparativos de la técnica de cultivo y la PCR en el diagnóstico de la trichomoniasis vaginal han evidenciado resultados similares de sensibilidad y especificidad,^{1,2,12} lo que demuestra que la técnica molecular puede ser incorporada junto con

otras metodologías para el diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual.^{13,14} Si analizamos los datos anteriores, podrían ser similares los resultados de la prueba de látex y la PCR.

No obstante los valiosos resultados que se han obtenido con la aplicación de la PCR, este método probablemente no reemplazará los métodos actuales que se utilizan para el diagnóstico de rutina de esta enfermedad en países subdesarrollados, por el alto costo que presenta.¹⁵

El juego de reactivo de látex producido en nuestro centro, tuvo una sensibilidad, especificidad y eficiencia de 98,7, 99 y 99 %, respectivamente. Esta técnica no requiere de equipos especializados, es de fácil realización y el resultado se obtiene en un tiempo breve, por lo que el mismo día se puede conocer el resultado del diagnóstico y de ser necesario, el médico en la misma consulta, puede indicar el tratamiento a la paciente; además brinda la opción de poder refrigerar o congelar las muestras para ser investigadas con posterioridad, lo cual es imposible realizar cuando este diagnóstico se realiza por microscopía

o cultivo; los resultados son de fácil lectura y se comparan con un control positivo y negativo que descarta cualquier posibilidad de error; estas características lo hacen muy útil para el diagnóstico de la trichomoniasis vaginal en los laboratorios clínicos de los hospitales especializados en nuestro país, y en otros países en los cuales esta parasitosis ocasione daños a la población vulnerable.

Este diagnóstico posibilitaría ampliar la atención primaria al médico de la familia, centros de trabajo y centros estudiantiles, lo que constituiría un ahorro de tiempo al paciente, al médico y al laboratorista. Permite además que el enfermo pueda iniciar con más rapidez el tratamiento y con ello, evitar una mayor difusión de la enfermedad.

Con el uso de esta técnica diagnóstica de alta sensibilidad y especificidad, es posible controlar los casos infectados por esta parasitosis y por la tanto disminuir la prevalencia de esta enfermedad, aspectos que son muy importantes para la salud de nuestro país y a nivel mundial, por lo que se continúa trabajando para obtener resultados más alentadores.¹³

SUMMARY: A kit of reagents for the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* is developed starting from latex particles sensitized with immunoglobulins against *T. vaginalis*, a positive and a negative control. This kit is used in the diagnosis of the protozoo by means of rapid agglutination and no specific equipment is necessary. The results show a sensitivity of 98.7 % and a specificity of 99 % for a limit of detection of 104 cells/mL. The latex sensitivity study was conducted for the negative and positive controls during a year. The results were satisfactory.

Subject headings: TRICHOMONIASIS/diagnosis; TRICHOMONAS VAGINITIS/diagnosis; FEMALE; LATEX FIXATION TESTS/methods; LATEX ALLERGY.

Referencias bibliográficas

1. Shaio FM, Lin RP, Liu YJ. Colorimetric one-tube tested PCR for detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal discharges. J Clin Microbiol 1997;35(1):132-8.

2. Levi MH, Torres J, Pina C, Flein RS. Comparison of the Inpouch TV culture system and Diamond's modified medium for detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1997;35(12):3308-10.

3. Barenfanger J, Drake C, Hanson C. Timing of inoculation of the pouch makes no

- difference in increased detection of *Trichomonas vaginalis* by the Inpouch tv methods. J Clin Microbiol 2002;40(4):1387-9.
4. Diego RJ, Castellanos AM, Blandino T, Abreu RG, Gómez E. Manual de técnicas parasitológicas. La Habana: Enpes; 1987:81-4.
 5. Krueger JN. The Bradford Methods for Protein Quantitation. Totowa: Humana Press Inc; 1994:33-40.
 6. Harlow ED, Lane D. Antibodies a laboratory manual. Chapter 8; Storing and purifying antibodies. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988. P. 298-9.
 7. Argote E, López G. Pautas para evaluar la calidad de los juegos diagnósticos basados en la técnica ELISA. Rev Cubana Cienc Vet 1995;24(2):16-9.
 8. Levine DN. Protozoan parasites of domestic animals and of man. The Trichomonads. Chapter 5. 2. ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company;1973. P. 100-101.
 9. Schwebke JR, Venglarik FM, Morgan SC. Delayed versus immediate bedside inoculation of culture media for diagnosis of vaginal trichomonosis. J Clin Microbiol 1999;37(7):2369-70.
 10. Demirezen S. *Trichomonas vaginalis* in vaginal smears in women using intrauterine contraceptive device. Cent Euro J Public Health 2001;9(4):176-8.
 11. Petersen CS, Carl L, Alnor D, Thomsen U, Thomsen HK. Ignored Trichomonal infestation diagnosed by Papanicolaou smear. Genitourin Med 1995;71(4):257-8.
 12. Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT Jr, Gaydos CA. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infections by PCR using vaginal swab samples. J Clin Microbiol 1998; 36(11):3205-10.
 13. Van der Chee C, Van BA, Zwijgers L, Van der BE, O Neil EL, Luijendijk A, et al. Improved diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swabs and urine specimens compared to diagnosis by wet mount microscopy, culture, and fluorescent staining. J Clin Microbiol 1999;37(12): 4127-30.
 14. Okuyama T, Takahashi R, Mori M, Osaka M, Kobayashi TK, Maeda S. Polymerase chain reaction amplification of *Trichomonas vaginalis* DNA from Papanicolaou-stained smears. Diagn Cytopathol 1998;19(6):437-40.
 15. Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological of parasitic infections. Int J Parasitol 1997;27(10):1135-45.

Recibido: 10 de diciembre de 2002. Aprobado: 21 de enero de 2003.

Lic. *Ivette Maciques Rodríguez*. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Carretera Tapaste y Autopista Nacional. Apartado 10, CP 32700, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba.