

Estudio de la susceptibilidad al metronidazol en aislamientos cubanos de *Trichomonas vaginalis*

Study on metronidazole susceptibility in Cuban isolates of *Trichomonas vaginalis*

Idalia Sariego Ramos,^I Lázara Rojas Rivero,^{II} Jorge Fraga Nodarse^I

^IMáster en Parasitología. Licenciado en Bioquímica. Investigador Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

^{II}Doctora en Ciencias. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Titular. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

RESUMEN

La trichomonosis es una infección muy frecuente a nivel mundial con importantes implicaciones médicas y sociales. El metronidazol constituye el fármaco de elección para el tratamiento de esta infección. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de cepas del parásito resistentes a este medicamento en varios países. En el nuestro, la mayoría de los fallos de tratamiento parecen deberse al incumplimiento con la terapia indicada o a reinfecciones. No obstante, algunos quedan sin explicación aparente y pudieran estar circulando aislamientos resistentes. El objetivo es determinar la susceptibilidad al metronidazol de aislamientos cubanos de *Trichomonas vaginalis*. Se estudiaron 40 aislamientos del parásito, procedentes de exudados vaginales de adolescentes, atendidas en hospitales ginecoobstétricos de Ciudad de La Habana. Los aislamientos fueron sometidos a ensayos *in vitro*, tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas, para conocer su susceptibilidad o resistencia al metronidazol. Se utilizaron diluciones dobles seriadas de metronidazol entre 400 µg/mL y 0,2 µg/mL y el dimetilsulfóxido como solvente. Mediante los ensayos realizados en condiciones aeróbicas se detectaron dos aislamientos resistentes al metronidazol (Tv-352, CLM: 50 µg/mL y Tv-240, CLM: 200 µg/mL). Este hallazgo nos alerta acerca de la necesidad de profundizar en las causas de los fallos de tratamiento para hacer una correcta evaluación e imponer el tratamiento adecuado.

Palabras clave: *Trichomonas vaginalis*, resistencia a medicamentos, metronidazol.

ABSTRACT

The trichomoniasis is a very frequent infection at world level with significant medical and social implications. The metronidazole is the choice drug to treat this infection. However, it was demonstrated the existence of parasite strains resistant to this drug in some countries. In Cuba, most of treatment failures seem to be due to the non-fulfillment of prescribed therapy or to reinfections. Nevertheless, some of them remain without an apparent explanation and could be circulating resistant isolates. The objective of the present paper is to determine the susceptibility to metronidazole of the Cuban isolates of *Trichomonas vaginalis*. Forty isolates of this parasite were studied, from the vaginal exudates of adolescents attended at the gynecobstetrics hospitals of Havana. The isolates underwent *in vitro* trials under anaerobic and aerobic conditions, to know their susceptibility or resistance to metronidazole. Serial double dilutions of metronidazole between 400 µg/mL and 0.2 µg/mL and the dimethylsulfoxide as solvent were used. According to the trials carried out under aerobic conditions, two resistant isolates to metronidazole (Tv-352, CLM: 50 µg/mL and Tv-240, CLM: 200 µg/mL) were detected. This finding alerts us about the need to deepen in causes of treatment failures to make an appropriate assessment in order to apply the suitable treatment.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, drug resistance, metronidazole.

La trichomonosis es una infección muy frecuente a nivel mundial. Sin embargo, su control ha recibido relativamente poca atención en los programas de control de las infecciones de transmisión sexual en muchos países, tal vez debido a que no constituye una enfermedad de declaración obligatoria. Esta infección tiene importantes implicaciones médicas y sociales. Las mujeres infectadas durante el embarazo están predispuestas a la ruptura prematura de membranas placentarias, al parto pretérmino y a concebir infantes con bajo peso al nacer.¹

La infección da lugar a un amplio espectro de síntomas clínicos, desde una inflamación severa acompañada de flujo vaginal de gran fetidez, hasta un estado de portador asintomático¹. Esto ha llevado a los especialistas a tratar de dilucidar los mecanismos de patogenia y a correlacionar diferentes parámetros biológicos con las manifestaciones clínicas. De esta manera, la asociación de los hallazgos clínicos con la citoadhesión *in vitro*, la variabilidad genética y la presencia de ARN viral de doble cadena, ha sido estudiada anteriormente en aislamientos cubanos del parásito.²⁻⁴

El metronidazol constituye el fármaco de elección para el tratamiento de la trichomonosis desde los primeros años de la década de 1960. A partir de entonces varios casos de resistencia clínica han sido descritos. El fallo de tratamiento ha sido atribuido a varias causas, como por ejemplo: baja absorción de la droga, inactivación de la droga por la flora vaginal, incumplimiento de la terapia indicada o a reinfecciones.⁵ Sin embargo, la existencia de cepas resistentes de *Trichomonas vaginalis* a los nitroimidazoles, como una posible explicación, solo fue claramente confirmada cuando se realizaron estudios de sensibilidad del parásito *in vitro*.

Desde entonces se han reportado aislamientos resistentes al metronidazol en varios continentes.^{6,7}

En nuestro país, la resistencia del parásito al metronidazol no ha sido estudiada, aunque los especialistas también plantean la existencia de fallos de tratamiento. Al igual que en otros países, en el nuestro, la mayoría de estos casos parecen deberse al incumplimiento con la terapia indicada o a reinfecciones, no obstante algunos quedan sin explicación aparente. Teniendo en cuenta que pudieran estar circulando aislamientos resistentes al metronidazol se decidió la realización de este trabajo, que permitió estudiar 40 aislamientos obtenidos a partir del exudado vaginal de pacientes atendidas en hospitales ginecobstétricos de Ciudad de La Habana.⁴

Los parásitos fueron cultivados a 37 °C en medio TYI-S-33 suplementado al 10 % con suero de ternero recién nacido, previamente descomplementado durante media hora a 56 °C.⁸ Para determinar la susceptibilidad al metronidazol se utilizó el método descrito por Meingassner and Thurner en 1979.⁹ Brevemente, las trichomonas fueron incubadas con diluciones dobles seriadas del metronidazol (SIGMA, USA), utilizando el DMSO como solvente, en placas estériles de 96 pozos de fondo U (Corning, NY, USA). Los parásitos (1×10^4 /pozo) fueron incubados con concentraciones de metronidazol que variaron entre 400 y 0,2 mg/mL. Se prepararon placas duplicadas para cada aislamiento, una para ser incubada en condiciones aeróbicas y otra en jarra para cultivo anaeróbico, ambas fueron mantenidas a 37 °C durante 48 h.

Posteriormente las placas fueron examinadas con ayuda del microscopio invertido. La concentración menor del metronidazol capaz de inhibir la movilidad del parásito fue considerada como la concentración letal mínima (CLM). Cada concentración fue ensayada por triplicado para cada aislamiento y el experimento se repitió tres veces. Los aislamientos cuya CLM resultó igual o mayor que 50 mg/mL se consideraron como resistentes.¹⁰

En la tabla se muestran los resultados de los ensayos. De un total de 40 aislamientos estudiados solo dos resultaron resistentes al metronidazol (Tv-352, Tv-240) para un 5 %. Este valor es menor que el encontrado en estudios similares¹⁰⁻¹² y coincide con la idea de que hoy en día entre el 5 y el 10 % de los aislamientos muestran algún nivel de resistencia.^{13,14}

Tabla. Susceptibilidad al metronidazol de los aislamientos cubanos de *Trichomonas vaginalis*

Aislamiento	Condiciones anaerobias	Condiciones aerobias
	CLM* (µg/mL) ± DS**	CLM* (µg/mL) ± DS**
A5	1,30 ± 0,45	1,56 ± 0,00
A42	2,59 ± 0,89	2,59 ± 0,89
A47	1,56 ± 0,00	2,59 ± 0,89
A59	1,30 ± 0,45	2,7 ± 0,89
A66	2,59 ± 0,89	2,59 ± 0,89
A69	2,59 ± 0,89	2,59 ± 0,89
A163	2,09 ± 0,88	2,25 ± 1,47
A170	2,1 ± 0,87	2,59 ± 0,89
A185	1,33 ± 0,47	2,07 ± 0,89
C9	1,04 ± 0,45	1,30 ± 0,45
C12	0,39 ± 0,00	0,65 ± 0,23

C15	2,07 ± 0,89	2,07 ± 0,89
C76	2,07 ± 0,89	2,59 ± 0,89
C91	2,59 ± 0,89	3,1 ± 0,00
C98	2,07 ± 0,89	2,59 ± 0,89
C129	2,07 ± 0,89	2,59 ± 0,89
C147	0,78 ± 0,00	2,59 ± 0,89
C173	5,23 ± 1,85	10,43 ± 3,58
C175	2,59 ± 0,89	4,17 ± 1,85
C187	1,56 ± 0,00	3,1 ± 0,00
C190	1,56 ± 0,00	2,09 ± 0,88
C206	3,11 ± 0,01	4,17 ± 1,85
C237	2,59 ± 0,89	2,59 ± 0,89
C239	2,07 ± 0,89	5,23 ± 1,85
C240	10,43 ± 3,58	200 ± 0,00
C247	2,07 ± 0,89	3,1 ± 0,00
C308	1,56 ± 0,00	2,07 ± 0,89
C313	0,65 ± 0,23	1,56 ± 0,00
C334	8,37 ± 3,58	10,43 ± 3,58
C344	8,37 ± 3,58	8,37 ± 3,58
C348	4,17 ± 1,85	5,23 ± 1,85
C349	3,1 ± 0,00	4,17 ± 1,85
C350	7,3 ± 4,78	10,43 ± 3,58
C351	4,17 ± 1,85	5,23 ± 1,85
C352	4,17 ± 1,85	50 ± 0,00
C353	3,1 ± 0,00	3,1 ± 0,00
C355	4,17 ± 1,85	4,17 ± 1,85
C356	4,17 ± 1,85	4,17 ± 1,85
C358	4,17 ± 1,85	5,23 ± 1,85
C361	7,30 ± 4,78	10,43 ± 3,88

* CLM: Concentración Letal Mínima, determinada según la movilidad del parásito visualizado con ayuda del microscopio invertido, luego de haber incubado los parásitos durante 48 h con diluciones dobles seriadas de metronidazol.

** Desviación estándar.

Como era de esperar, aunque los valores de CLM obtenido en condiciones aeróbicas para los aislamientos Tv-352 y Tv-240, de 50 y 200 mg/mL, respectivamente, los señala como francamente resistentes al metronidazol. Estos dos aislamientos mostraron susceptibilidad al metronidazol en condiciones anaeróbicas.

Anteriormente ha sido comprobado que aunque *T. vaginalis* puede desarrollar *in vitro*, según las condiciones requeridas para los ensayos de susceptibilidad, tanto resistencia anaeróbica como aeróbica, es esta última la que ha sido reportada con mayor frecuencia en aislamientos clínicos resistentes al metronidazol.⁵

La resistencia aeróbica *in vitro* aparece con la disminución de la habilidad del parásito para mantener la anaerobiosis en su interior, debido a un decrecimiento de la afinidad de su sistema respiratorio por el O₂, el cual es un potente aceptor de

electrones de los radicales nitro y puede inhibir la acción del metronidazol e incluso interferir con su activación. La susceptibilidad anaeróbica de estos aislamientos se explica por el hecho de que estos organismos retienen la vía hidrogenosomal responsable de la activación del metronidazol.⁵

Aunque ha sido reconocido que la aparición de cepas de *T. vaginalis* resistentes al metronidazol no alcanza proporciones epidémicas, tal vez porque con la aparición de la resistencia, el parásito se debilita y se dificulta su transferencia, sí se ha señalado la tendencia creciente en los reportes de fallos en el tratamiento.¹⁴ En ausencia de otros fármacos y con la esperanza de encontrar una mejor distribución en los tejidos y una menor toxicidad, la acción de otros nitroimidazoles contra el parásito ha sido investigada. Como resultado se espera que la introducción del tinidazol en el tratamiento de la trichomonosis redunde en una mejor adhesión al tratamiento, ya que pueden aplicarse regímenes elevados con relativos pocos efectos adversos. Sin embargo debido a que el mecanismo de acción es similar al del metronidazol es de esperar un desarrollo rápido de la resistencia.⁵

Los resultados del presente estudio son de gran importancia ya que indican la susceptibilidad de la mayoría de los aislamientos ensayados, a pesar del uso continuado del metronidazol para el tratamiento de esta parasitosis en nuestro país. Sin embargo, el hallazgo de dos aislamientos resistentes nos alerta acerca de la necesidad de profundizar en las causas de los fallos de tratamiento para hacer una correcta evaluación e imponer el tratamiento adecuado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schwebke JR, Burgess D. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004;17:794-803.
2. Rojas L, Sariego I, Fraga J, Sarria CA, Sarracent J, Sanchez L. Use of *in vitro* cytoadherence assays in the comparative study of the virulence of *Trichomonas vaginalis* isolates. *Parasitology Research*. 2004;93:332-7.
3. Rojas L, Fraga J, Sariego I. Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation. *Infection, Genetics and Evolution*. 2004;4:53-8.
4. Fraga J, Rojas L, Sariego I, Fernández-Calienes A. Double-stranded RNA viral infection in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2005;9:521-524.
5. Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE. Treatments of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004;17:783-93.
6. Meri T, Jokiranta T, Suhonen L, Meri S. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole: report of the first three cases from Finland and optimization of *in vitro* susceptibility testing under various oxygen concentrations. *J Clin Microbiol*. 2000;38:763-7.
7. Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue P, Upcroft J. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research*. 2003;13:239-49.

8. Diamond IS. The establishment of various trichomonas of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol.* 1976;62:826-8.
9. Meingassner JG, Thurner J. Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5-nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979;15:254-7.
10. Buttler S, Augostini P, Secor W. *Mycoplasma hominis* infection of *Trichomonas vaginalis* is not associated with metronidazole-resistant trichomoniasis in clinical isolates from the United States. *Parasitol Res.* 2010;107:1023-7.
11. Snipes LJ, Gamard PM, Narcisi EM, Beard CB, Lehmann T, Secor WE. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3004-9.
12. Xiao JC, Xie LF, Fang SL, Gao MY, Zhu Y, Song LY, et al. Symbiosis of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* may link metronidazole resistance *in vitro*. *Parasitol Res.* 2006;100:123-30.
13. Upcroft JA, Dunn LA, Wal T, Tabrizi S. Metronidazol resistance in *Trichomonas vaginalis* from highland women in Papua New Guinea. *Sexual Health.* 2009;6:334-8.
14. Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:150-64.

Recibido: 15 de enero de 2011.

Aprobado: 30 de enero de 2011.

Lic. *Idalia Sariego Ramos*. Departamento de Parasitología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Autopista Novia del mediodía Km 6 ½. Marianao 13. La Habana. Cuba. Telf: 53 7 2020650. Correo electrónico: idalia@ipk.sld.cu