

EL CULTIVO DE TRICHOMONAS VAGINALIS, CON FINES DIDACTICOS

T. C. DE COLISTRO, A. FREYRE, R. TOYOS

RESUMEN.-

Se estudian varios medios de cultivo para *Trichomonas vaginalis*, con fines didácticos: Boiron, C.P.L.M., Kupferberg y Loettler. De todos ellos, el medio Boiron dio resultados más constantes. El medio C.P.L.M. propició la reproducción del protozooario en forma menos notoria y regular. Los medios restantes dieron resultados negativos.

En todos los casos, la técnica de toma de la muestra, el lapso transcurrido entre la extracción y la siembra, la magnitud del inóculo, las condiciones de anaerobiosis parcial del cultivo y la frecuencia y densidad de los repiques, son condicionantes a tener en cuenta.

El cultivo a 30° permite una vitalidad del protozooario algo más prolongada que a 37°C.

Particularmente en el medio C.P.L.M., se aprecian las formas de división de *T. vaginalis*, incluyendo los elementos redondeados concurriendo dos células hijas.

El pasaje recíproco del flagelado entre estos dos medios es posible sin inconvenientes.

El medio C.P.L.M. no es tan apropiado como material de partida para la confección de frotis teñidos, pues el agar que contiene crea un fondo poco propicio para el contraste.

Ninguno de los dos medios son económicos ni de fácil preparación. Se continuarán los estudios para resolver estos aspectos.

INTRODUCCION.-

Trichomonas vaginalis causa vaginitis en la mujer, y en el hombre uretritis y eventualmente prostatitis⁽¹⁾.

La aparición de estas infestaciones es frecuente. Por ello, este tema ocupa su lugar importante en un curso de parasitología clínica.

Se estudia aquí el cultivo de este flagelado en varios medios, principalmente con enfoque didáctico, para disponer de material vivo en las demostraciones prácticas. A su vez, el cultivo de *T. vaginalis* es consignado como necesario en ciertas circunstancias para el diagnóstico de rutina^(1, 2, 6, 10) alternativa que los autores han comenzado a estudiar.

MATERIAL Y METODOS.-

Materiales.-

- cepas autóctonas de *T. vaginalis*.
- medios de cultivo: de Roiron⁽¹⁾, C.P.L.M.⁽¹⁰⁾, Kupferber y Loeffler⁽³⁾.

Métodos.

La metodología general adoptada es la señalada por diversos autores.

Así, de Ravner⁽¹⁰⁾, se tomaron las siguientes técnicas:

- cantidad de medio en cada tubo: 8 cc. para recibir el inóculo inicial y 5 cc. para los subcultivos.
- Agregado de 1000 UI de penicilina y 1 mg de estreptomina por mililitro de medio.
- Agregado al azul de metileno al 0,0002% (en agua) por la propiedad de virar según el grado de reducción del medio.

De Capet⁽²⁾, se tomaron los siguientes recursos:

- Emplear tubos de 13 mm de diámetro interno, para favorecer la anaerobiosis, teniendo en cuenta la relación volumen de medio/superficie de exposición.

- Inocular no menos de 1 cc de exudado y no menos de 1/4 del volumen del medio de cultivos en los repiques de subcultivos.

Por otra parte, se prefieren las siguientes alternativas:

- toma de muestra por arrastre con suero fisiológico⁽¹⁾
- transcurso lo más breve posible desde la extracción de la muestra a la siembra en medio de cultivo.
- repique cada 12 horas durante los primeros cinco días y cada 24 horas en adelante.

Se estudiaron las siguientes variantes:

- 1.- Medios de cultivo: Roiron, C.P.L.M., Kupferber y Loeffler.
- 2.- Repique cada 12, 48, 72 y 96 horas.
- 3.- Incubación a 37°C y a 36°C.
- 4.- Comparación entre la toma del inóculo del fondo del tubo y a 5-10 mm de éste, para los subcultivos.

Se observó la distinta facilidad con que aparecían formas de división en diversos cultivos; la posibilidad de intercambio de inóculos entre los medios estudiados, y la apariencia de los frotis (teñidos con Giemsa alcalino) procedentes de aquéllos.

RESULTADOS

Evolución de los cultivos

En medio Roiron

A las 24 horas de haber sembrado el medio (y efectuado un repique), se observó una regresión del cultivo.

Durante los 4 días siguientes en que se efectuaron los repiques con la misma frecuencia, se observó primero un repunte y luego un descenso, que remitió cuando se comenzó a repicar cada 24 horas, manteniéndose desde ese entonces en un estado de proliferación muy activa, aunque con ligeras variantes, hasta la fecha.

En medio C.P.L.M.

La proliferación del protozoo en este medio sólo fue observada cuando el inóculo provenía de flagelados previamente

cultivados durante algunos días en medio Roiron. Los 4 intentos de cultivo partiendo de cepas autóctonas fueron infructuosos.

En medio Kupferberg

No se obtuvieron resultados positivos en ninguno de los varios intentos con cepas de cultivo o autóctonas.

En medio Loeffler

En este medio las trichomonas se mantuvieron vivas y con movilidad normal por un plazo de 48 horas. Un repique efectuado a las 24 horas dio resultado negativo.

Repiques de distinta periodicidad

Con una cepa *T. vaginalis* de 30 días de cultivo, se ensayaron los repiques cada 48, 72 y 96 horas. En un caso, el repique cada 48 horas permitió la continuación del cultivo. En otro ensayo, el resultado fue negativo. Los repiques cada 72 y 96 horas resultaron negativos.

Sobre los repiques cada 12 y 24 horas, se remite al apartado anterior.

En todos los casos, aún cuando los cultivos de partida para este ensayo tuvieran 96 horas sin ser repicados, los protozoarios se presentaban con una movilidad normal o casi normal, coexistiendo con formas redondeadas de muy poca movilidad.

La división de *T. vaginalis*

Si bien el medio Roiron propicia una proliferación más abundante que el C.P.L.M., en éste se pueden observar con más frecuencia las formas de división de *T. vaginalis*, incluyendo las formas redondeadas móviles con un juego de flagelos en cada polo.

Incubación a 30°C

En un tubo inoculado con 1.950.000 *T. vaginalis* en medio Roiron mantenido a 30°C, se observó buena vitalidad hasta los 5 días de cultivo sin repiques. Al 6.º día, ésta había disminuido. El repique en este momento dio resultado negativo. Al séptimo día se observaron formas redondeadas inmóviles.

Tomas de inóculo

En el medio Roiron, la toma de una muestra de inóculo del fondo del tubo presenta mayor proporción de formas redondeadas

de poca movilidad y de formas muertas de *T. vaginalis*, que la toma a unos 5 mm del fondo.

Pasaje de *T. vaginalis* entre medios de cultivo

Con cepas de 30 días de cultivo, se verificó la facilidad de intercambio de *T. vaginalis* entre los medios C.P.L.M. y Roiron, recíprocamente.

Frotis obtenidos a partir de medios de cultivo

El medio C.P.L.M. no es conveniente para la confección de frotis teñidos con Giemsa modificado, pues la presencia del agar crea un fondo no propicio para el contraste.

Algo superiores resultan los frotis a partir de medio Roiron, pero sin duda los mejores frotis se obtienen directamente a partir de exudados.

DISCUSION.-

Evolución de los cultivos en medio Roiron.

La regresión observada a las 24 horas, corresponde al tiempo de latencia, durante el cual se verifica el fenómeno de mortalidad inicial del cultivo. (Capet).

Luego del aumento pasajero, la disminución durante los cuatro días siguientes y consecuente normalización cuando se comenzó a repicar cada 24 horas, nos lleva a la conclusión que el repique cada 12 horas no solamente no es necesario, sino perjudicial.

Podrían explicar este fenómeno alguna o varias de las siguientes hipótesis:

- el lapso de 12 horas no es suficiente para generar una reproducción que asegure un inóculo subsiguiente abundante;
- ese lapso no permite que se viertan al medio los suficientes catabolitos o coenzimas generadas por los flagelados, aparentemente necesarios a priori. (Capet).
- ese lapso distorsiona o perturba de alguna manera la mecánica de reproducción del protozoario.

Repiques de distinta periodicidad

La observación de los resultados obtenidos en este ensayo permite concluir que, aunque *T. vaginalis* se presente con buena motilidad, no permite inferir que sea posible concretar la continuidad del cultivo cuando éstos se repican más allá de un plazo de 24 horas, y que esta posibilidad es relativa cuando el plazo es de 48 horas.

Todo sucede, como si fuera del plazo señalado, el flagelado perdiera su capacidad de perpetuarse, aunque otras características permanezcan aparentemente intactas.

Cultivo a 30°C

El cultivo a esta temperatura sólo prolonga la vitalidad de *T. vaginalis* por 24 horas, respecto a los cultivos mantenidos a 37°C. Será necesario ampliar los estudios para determinar si esta temperatura modifica la frecuencia de los repiques.

Tomas de inóculo

En vista de los resultados, se recomienda efectuar las tomas tanto para inóculo como para demostraciones inmediatamente por arriba del fondo del tubo con medio de cultivo Roiron.

División de *T. vaginalis*

Contrasta el hecho de mayor proliferación en medio Roiron y la observación más frecuente de formas de división en medio C.P.L.M. La presencia de agar en este último medio podría ser responsable de la diferencia.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al Prof. Dr. Alberto de Betolaza como así también al personal del Laboratorio de Análisis del Hospital Militar por el suministro de muestras seleccionadas de exudados que se emplearon en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA.-

- 1.- Balsechi, E.E., Berisco, C., Muskof, T., Pérez, R. 1978. República Argentina. A publicar.
- 2.- Capet, R.G. 1968. Canad. J. Public Health. Toronto, 59: 2 o 1 - 3 May.
- 3.- Franca-Rodríguez, M.E., Calegari, A.M., Esquivel Rodríguez, A., Laino Azzorini, L.S., Peírot, H. 1971. Revista Uruguaya de Patología Clínica y Microbiología. Vol. 9 Julio-Dic. 275-281.
- 4.- Greenway, D.F. 1945. Zooparasitos y Zooparasitosis humanas. Sexta Edición. Bs. As. Ed. Ilustración Rioplatense.
- 5.- Johnston G., Trussell, R.E. 1943. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 54, 245.
- 6.- Laarhove, Van, P.H.A. 1967. Arch. Chir. Neerland, Den Haag, 19, 263-73.
- 7.- Lamy, L. 1959. Annales de L'Institut Pasteur, 97, N.º 1, 115-116.
- 8.- Lamy, L. 1960. Ann. Inst. Pasteur, 98, N.º 761-765.
- 9.- Pautrizel, R., Bentz, M., Dargelos, R. Producción de la Facultad de Medicina y Farmacia de Burdeos. Película N.º 711 de la Cineteca de la Embajada de Francia en el Uruguay.
- 10.- Rayner, C.F. 1968. Brit. J. Vener. Dis., London, 44: 63-6 mar.
- 11.- Simintzis, G. 1964. Recueil de Medicine Veterinaire de l'Ecole d'Alfort. Tome CXL. N.º 8 Aout. 625-631.