

**PATOGENIA EXPERIMENTAL DE *Trichomonas vaginalis*
DONNE, 1836 EN EL RATON (*Mus musculus*)**

Por José María Toyos Aparicio

1. INTRODUCCION.—2. REVISION BIBLIOGRAFICA.—2.1. TAXONOMIA.—2.2. VALIDEZ DE LA ESPECIE.—2.3. MORFOLOGIA DE *Trichomonas vaginalis* DONNE, 1836 (T. v.).—2.4. REPRODUCCION.—2.5. CULTIVO.—2.5.1. Mantenimiento.—2.5.2. Medios líquidos de cultivo.—2.5.3. Medios sólidos.—2.6. BIOQUIMICA.—2.7. DIAGNOSTICO.—2.7.1. Toma de muestras.—2.7.1.1. En la mujer. a) Vagina. b) Uretra. c) Otras localizaciones.—2.7.1.2. En el hombre.—2.7.2. Examen colposcópico.—2.7.3. Examen microscópico.—2.7.3.1. Examen en fresco del exudado.—a) Microscopio convencional. b) Examen sobre fondo oscuro. c) Microscopio de contraste de fases. d) Microscopía de fluorescencia.—2.7.3.2. Examen mediante coloraciones vitales.—2.7.3.3. Examen mediante frotis teñidos.—2.7.4. Por serología.—2.7.4.1. Fijación del complemento.—2.7.4.2. Aglutinación.—2.7.4.3. Intradermo-reacción.—2.7.4.4. Otras pruebas.—2.7.4.5. Serotipos.—2.8. PATOGENIA EXPERIMENTAL EN ANIMALES DE LABORATORIO Y CULTIVOS CELULARES.—2.8.1. Vías de infección.—2.8.1.1. Intravaginal. a) Cricetos. b) Ratones. c) Ratas. d) Cobayos.—2.8.1.2. Subcutánea. a) Ratones. b) Cobayos.—2.8.1.3. Intraperitoneal.—2.8.1.4. Otras vías.—2.8.2. Patogenia para cultivos celulares.—INVESTIGACIONES PERSONALES.—3. MATERIALES Y METODOS.—3.1. RECOGIDA DE MUESTRAS Y SIEMBRA.—3.2. MEDIOS DE CULTIVO.—3.3. MANTENIMIENTO.—3.4. PATOGENIA EXPERIMENTAL.—3.4.1. Recuento.—3.4.2. Animales de experimentación.—3.4.3. Experiencias previas.—3.4.4. Proceder definitivo.—3.4.4.1. Cepas aisladas recientemente.—3.4.4.2. Cepas antiguas.—3.4.5. Necropsia.—3.4.6. Valoración de la patogenia.—3.4.6.1. Lesiones en los distintos órganos.—3.4.6.2. Mortalidad durante la experiencia.—4. RESULTADOS Y DISCUSION.—4.1. EXPERIENCIAS PREVIAS.—4.1.1. Necropsia de animales aparentemente sanos.—4.1.2. Inyección de los distintos fármacos.—4.1.3. Administración de fármacos más inoculación de medio de cultivo.—4.1.4. Análisis de los resultados de ambas experiencias.—4.2. PROCEDER DEFINITIVO.—4.2.1. Valoración de la patogenia de las 35 cepas de *T. v.*—4.2.1.1. Análisis de la patogenia en la inyección simultánea de distintas cepas de *T. v.* más los fármacos probados.—4.2.2. Relación entre la patogenia experimental y el cuadro clínico.—4.2.3. Estudio comparativo de los cuatro grupos experimentales.—4.2.4. Patogenicidad de las cepas aisladas recientemente y de las antiguas.—4.2.5. Patogenia residual de *T. v.*—4.2.6. Análisis de la mortalidad en los distintos grupos.—4.2.7. Comparación de los valores asignados por la muerte y lesiones en los distintos órganos.—4.2.8. Análisis del número de ratones vivos al final de la experiencia y valoración de sus lesiones.—4.2.9. Análisis de cepas de *T. v.* procedentes de la misma paciente en distintas épocas.—4.2.10. Anatomía Patológica.—4.2.10.1. Examen macroscópico.—4.2.10.2. Examen microscópico.—5 CONCLUSIONES. 6. RESUMEN. 7. BIBLIOGRAFIA. 8. ILUSTRACIONES.

1. INTRODUCCION

La tricomoniasis humana adquirió gran interés a partir de los hallazgos de HÖHNE,⁵¹ quien al aislar tricomonas en el flujo de una mujer que padecía una colpitis aguda, relacionó la presencia de dicho parásito con las lesiones producidas en la vagina. Estas ideas estaban en contradicción con las mantenidas hasta entonces, pues *Trichomonas vaginalis* (*T. v.*) se consideraba como habitante común de la vagina humana, pero carente de poder patógeno.

A partir de entonces, diferentes investigadores estudiaron su poder patógeno, y aunque al principio las opiniones fueron muy contradictorias, sin embargo, a partir de los últimos veinte años, el poder patógeno de *T. v.* quedó perfectamente establecido.

Otro hito importante en la historia del protozoo fue, sin duda, el llegar a considerar a la parasitosis que produce, como enfermedad venérea; esta hipótesis, que al comienzo tuvo algunos detractores, fue tomando cada vez mayor consistencia hasta llegar al momento actual, en que, si bien se admiten otras formas de producirse el contagio, nadie discute que el principal y casi único modo de transmisión de la enfermedad se realiza durante el acto sexual. Esto explica la gran difusión alcanzada, en la actualidad, por la tricomoniasis, y a ello contribuye la mayor libertad en las relaciones sexuales entre los jóvenes, así como también la supresión de la prostitución oficial, que ha llevado aparejada una falta de control sobre la clandestina; todo ello unido a la buena tolerancia que el varón presenta para el protozoo en la mayoría de las ocasiones, con ausencia casi total de síntomas, lo mismo que ocurre en los casos crónicos de la mujer, en los que el parásito es habitante de la vagina durante años, lo que permite la difusión y el mantenimiento de la enfermedad.

El final de la década de 1950 marca otro jalón importante dentro de la pequeña historia de *T. v.*, consistente en la aparición de los modernos tricomicidas, derivados del imidazol, y que al ser activos, tanto localmente como por vía oral, hicieron posible por vez primera la curación efectiva de la enfermedad, con el tratamiento simultáneo de la pareja. Estos tratamientos resultaban eficaces, de manera brillante, en un elevado porcentaje de casos; pero a medida que se generalizó el uso de estos fármacos se observó, cada vez con mayor frecuencia, la aparición de recidivas después de estos tratamientos, lo cual pudiera ser debido a la selección de cepas resistentes a dichos fármacos o incluso a la aparición de cepas de alto poder patógeno.

No podemos dejar de señalar otro punto importante, y no bien aclarado al presente, que consiste en la relación entre la presencia de tricomonas en la vagina y la aparición de un carcinoma de cervix uterino. Las atipias celulares que aparecen en todas las colpitis por tricomonas, dificultan la lectura de los frotis teñidos por el método de Papanicolau, por lo que resulta conveniente, antes de un informe definitivo, realizar un tratamiento previo de la infección.

A la vista de lo anteriormente expuesto y dada la importancia que, en nuestra opinión, tiene la tricomoniasis en la actualidad, nos hemos propuesto en el presente trabajo, realizar un estudio sobre *T. v.*, intentando valorar la patogenia para el ratón, mediante inoculación intraperitoneal de varias cepas, con el fin de investigar la posible existencia de una correlación entre la intensidad de dicha morbilidad y el cuadro clínico, así como también, valorar las posibles alteraciones en el poder patógeno, al administrar al ratón sustancias antiinflamatorias, hormonales y no hormonales, dotadas las primeras de acción inmunosupresora, simultánea e intensa.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. TAXONOMIA

Siguiendo las normas del Comité de Taxonomía y Problemas Taxonómicos de la Sociedad de Protozoólogos, resumido en la publicación de HONIGBERG y col.,⁵⁸ se encuentra *T. v.* DONNE, 1836 en el siguiente esquema de categorías:

- Phylum PROTOZOA (GOLDFUS, 1818) von SIEBOLD, 1845.
- Subphylum I. Sarcomastigophora HONIGBERG y BALAMUTH, 1963.
- Clase 2. Zoomastigophorea CALKINS, 1909.
- Orden 8. Trichomonadida KIRBY, 1947.
- Familia Trichomonadidae (CHALMERS y PEKKOLA, 1917) KIRBY, 1946.
- Subfamilia Trichomonadinae CHALMERS y PEKKOLA, 1917.
- Género *Trichomonas* DONNÉ, 1836.

Después del trabajo de DONNÉ,³² los géneros de la familia Trichomonadidae se dispusieron según GRASSÉ,⁴⁶ de acuerdo con el número de flagelos anteriores, criterio muy acertado, pero que no pudo impedir, por razones de prioridad, que se siga conociendo como *Trichomonas* a los flagelados que, con las características de la familia, tienen cuatro flagelos libres anteriores, pasando a denominarse *Tritrichomonas* (KOFROID, 1920) los que tienen tres flagelos libres anteriores, *Pentatrichomonas* (MESNIL, 1914) los que tienen cinco, y *Ditrichomonas* los de dos (KUTLER, 1919).

El género *Tritrichomonas*, dentro de la subfamilia Tritrichomonadinae de HONIGBERG, 1963 encierra especies de particular interés en medicina veterinaria, tales como *T. foetus* (RIEDMULLER, 1928) (WENRICH y EMMERSON, 1933) agente causal de abortos y esterilidad en bovinos, *T. suis* GRUBY y DELAFOND, 1943, etc.

La subfamilia Trichomonadinae, HONIGBERG, 1963 comprende los géneros *Trichomonas* DONNÉ, 1836 y *Pentatrichomonas* MESNIL, 1914. El género *Trichomonas* se caracteriza por la posesión de cuatro flagelos anteriores libres y un quinto flagelo posterior, dispuesto a lo largo de la membrana ondulante, formación ésta más corta que el cuerpo; el capítulo del axostilo (microscopio óptico) sólo moderadamente extenso, terminando anteriormente en una delgada pelta; axostilo delgado; cuerpo parabasal en forma de barra o con bifurcación lateral.

Este género cuenta con la especie *T. v.* DONNÉ, 1836, parásito del tracto uro-genital humano y objeto de nuestro trabajo. Además otras tales como *T. tenax* (MULLER, 1737 emend. EHRENBERG, 1838) DOBELL, 1939 (Sinonimia: *T. buccalis*, *T. elongata*) que se encuentra como comensal en la cavidad bucal humana; *T. gallinae* (RIVOLTA, 1878), STABLER, 1938 (sinonimia: *T. columbae*) parásito de gallinas y palomas, etc., etc.

El otro género de la subfamilia, *Pentatrichomonas*, se caracteriza por la posesión de cinco flagelos libres anteriores, cuatro formando un grupo funcional y uno independiente en su ritmo de batido; con el flagelo posterior más largo que en el género anterior y la membrana ondulante extendiéndose hasta la terminación del cuerpo; capítulo del axostilo terminado en una extensa pelta; cuerpo parabasal compuesto de uno o varios granos rodeados de una zona elíptica o esférica. La especie *P. hominis* (DAVAINE, 1860) WENRICH, 1931 es comensal del intestino humano.

2.2. VALIDEZ DE LA ESPECIE

El concepto de que *T. v.* es solamente una variedad de *P. hominis* o de *T. tenax* ha sido sugerido por varios autores, entre otros GROLLET y MONTAGE (1957), cit. por JIROVEC y col.,⁶³ pero la mayoría de los parasitólogos que han estudiado este problema no están de acuerdo con esta tesis. En efecto, aparte de las diferencias morfológicas existentes entre dichas especies, más evidentes desde la aparición del microscopio electrónico, así como las diferencias biológicas respecto a su localización en el cuerpo humano y su comportamiento en los medios de cultivo, son concluyentes las experiencias realizadas, en primer lugar, por WESTPHAL¹²⁴ intentando inocularse *T. v.* por vía oral, así como las posteriores de BAUER⁴ que no consiguió inocular *T. intestinalis* y *T. bucalis* en la vagina de mujeres. Otras múltiples experiencias han sido asimismo infructuosas, KESSEL y GAFFORD;⁶⁷ STABLER, FEO y RAKOFF.¹¹⁴

Por último, los estudios epidemiológicos de las tres especies de tricomonas, abonan la idea de que se trata de tres entidades distintas. JIROVEC y col. (1942) y DE CARNERI y GIANNONE (1964), (cit. por JIROVEC y PETRU)⁶³ CERVA y CERVOVA.²³

2.3. MORFOLOGIA DE *T. vaginalis*, DONNE, 1836

La forma de este protozoo flagelado es variable, la más frecuente adoptada es la piriforme, aunque en ocasiones puede ser también ovoidea, reniforme, elipsoidal, fusiforme y muchas veces, esférica. Todas las cepas pueden adoptar formas ameboides, extendiendo prolongaciones del cuerpo a manera de pseudópodos.^{55,94}

El tamaño varía entre $4-32 \times 2,4-14,4 \mu$ (valor medio $9,7 \times 7 \mu$).⁵⁵

Las formas pequeñas, muy móviles, corresponden a los individuos más jóvenes. Se observan con mayor frecuencia en los cultivos que en las extensiones en fresco procedentes de personas infectadas. El tamaño más grande corresponde a individuos viejos o en fase de degeneración.^{6,48}

Los flagelos, en los individuos en reposo generacional, se disponen en un grupo de cuatro dirigidos hacia delante, más uno dirigido hacia atrás, bordeando la membrana ondulante. Los flagelos anteriores, libres, baten por delante del cuerpo y son, aproximadamente, de la misma longitud que el mismo. Cuando se tiñen, pueden aparecer aglutinados en toda su longitud o en parte, lo que ha inducido no pocas veces, a errores sobre el número de los mismos. Por los medios de observación usuales hasta la generalización del microscopio electrónico, parecía que todos los flagelos, tanto los anteriores como el posterior, partían de un gránulo basal común y complejo.⁵⁵ Al microscopio electrónico, INOKI y col.,⁶⁰ LUDVIK y col.,⁸¹ y NIELSEN y col.,⁹⁴ se comprobó que poseen la estructura común a los flagelos y cilios del resto de los animales —nueve fibrillas periféricas y dos centrales rodeadas por la membrana plasmática—. Cada flagelo nace en el extremo anterior del cuerpo, de un blefaroplasto o corpúsculo basal con la estructura fibrilar periférica típica y el gránulo axial. Los cuatro blefaroplastos de los flagelos anteriores están dispuestos radialmente alrededor del quinto blefaroplasto, el que da origen al flagelo posterior. El sistema cinético y el de sostén del flagelado, se encuentran unidos por las fibras falciformes y sin estriación, que asocian los blefaroplastos con al menos dos fibras (costillas) y el filamento parabasal. La costa se asocia al blefaroplasto del flagelo recurrente. Mientras que las costillas y el filamento parabasal ocupan una situación central en el citoplasma, la costa es de posición periférica y paralela a la situación de la membrana ondulante. Tanto la costa como el filamento poseen una estriación transversal uniforme en toda su longitud.

La membrana ondulante, en la microscopía normal de *T. v.*, parte del extremo anterior, como los flagelos y la costa, dirigiéndose hacia atrás acompañada del flagelo recurrente; no alcanza el extremo posterior del cuerpo.⁵⁵ Al microscopio electrónico se comprobó que tiene una cierta estructura independiente del flagelo que se adosa a ella en toda su longitud, posee una lámina o fibrilla en el borde externo que le da sostén.⁹⁴

El axostilo, clásicamente considerado como un eje rígido de sostén, se identifica por microscopía de contraste de fases como un elemento aplanado en el extremo anterior y cilíndrico en el posterior, asemejando a una espátula. La porción ancha abraza al núcleo, que yace entre esta porción y la membrana ondulante. La porción cilíndrica se proyecta fuera del citoplasma, sin romper la membrana plasmática, formando el apéndice caudal.⁵⁵

El axostilo, de acuerdo con NIELSEN y col.,⁹⁴ consta de una sola capa de fibras tubulares que conforman una lámina en la porción media y un tubo a modo de tirabuzón, al enrollarse sobre sí mismas, en la porción cilíndrica caudal. La parte superior del axostilo se continúa con la pelta, lámina semilunar, también constituida por una capa de fibras y en relación con los cinetosomas flagelares; de esta manera, como vemos, todo el sistema cinético y de sostén del protozoo se halla conectado.

El cuerpo parabasal, se interpretó clásicamente como formado por dos porciones: una ancha, semilunar, de posición yuxtannuclear y una estrecha, caudal, a modo de mango. Esto es ahora la asociación del aparato de Golgi, de constitución ultramicroscópica similar a la misma estructura del resto de las células animales y el filamento parabasal que transcurren entre las vesículas y cisternas del aparato de Golgi y el núcleo celular.^{55,94}

El núcleo, de forma elipsoidal u ovoidea, está situado en la porción anterior del cuerpo, coincidiendo su eje mayor con el del mismo. Su tamaño es de $4 \times 2 \mu$ de diámetro. Es del tipo vesicular con nucleolo o cariosoma y, por lo tanto, con cromosomas ortomitóticos en la interfase.⁹⁴

Sus estructuras ultramicroscópicas, en cuanto a la membrana, cromosomas, etc., son las clásicas de los protozoos.⁶⁰

El citoplasma ofrece distinto aspecto según la edad del parásito, más denso en las formas jóvenes, y de tonalidad más clara en las viejas. En su seno, además de las estructuras ya vistas, existen numerosas vacuolas de tamaño y forma variable, repartidas por la superficie celular de forma caprichosa.⁴⁸

El retículo endoplásmico es muy abundante en los alrededores del núcleo, especialmente dentro del área de la porción espatulada del axostilo. Además de ribosomas, distribuidos por todo el citoplasma, existen dos tipos de gránulos, densos electrónicamente y cromófilos, unos menores, de distribución caprichosa, de 0,05 a 0,1 micras de diámetro y sin membrana limitante. Los otros, grandes (de aproximadamente 0,5 micras de diámetro), de distribución constante, paraaxostilar y paracostal, electrodensos y rodeados de una triple membrana. Estos últimos se ponen de manifiesto también en las clásicas tinciones con eosinato de azul de metileno (Giemsa y variantes) y de Gomori. No existen mitocondrias, lo cual aunque de acuerdo con el sistema metabólico de tricomonas, significa una regresión desde la estructura típica de una célula animal, posiblemente debida al parasitismo. Ultimamente, varios autores quieren identificar los gránulos paraaxostilares antes mencionados, con mitocondrias afuncionales, lo que no deja de ser sugestivo como tema de investigación.^{60,94,110}

En el interior del citoplasma existen, a veces, espermatozoides y gérmenes diversos, que verosímilmente no son fagocitados por el protozoo sino que colonizan al mismo.⁶

Envolviendo al protoplasma se encuentra una triple membrana celular, el periplasto.^{60,94}

La mayor parte de los autores ponen en duda la existencia del citostoma. Formaciones de tipo filópodo sirven, en el extremo posterior, para la toma de alimentos y para permanecer fijos en algún punto.³⁰

Movilidad: es distinta según sea en cultivo o en exudado vaginal. En los cultivos sin obstáculos, se desplaza con bastante rapidez mediante movimientos de látigo de sus flagelos y por movimientos de rueda dentada de su membrana ondulante. En los exudados el desplazamiento se hace con dificultad obstaculizados por leucocitos, células y bacterias. En estos casos muchas veces lo que se desplaza no es el parásito sino los elementos a los que está adosado.

El frío inhibe estos movimientos y en cambio la presencia de suero o sangre parece estimularlos.

Estos flagelados tienen propiedades plásticas que les permite pasar a través de pequeños espacios.

Todas las cepas tienen capacidad para formar extensiones a manera de pseudópodos, que son utilizados para la alimentación o para fijarse a objetos circundantes, pero no como movimientos ameboides.^{6,48,55}

2.4. REPRODUCCION

La forma más frecuente de reproducción es por bipartición o fisión binaria; según HAWES⁴⁹ tiene 5 cromosomas. Los corpúsculos basales pasan al polo opuesto del huso mitótico, pero los detalles de este proceso todavía no se conocen bien.

Después de la división del núcleo, se realiza la del aparato locomotor y finalmente se escinde el citoplasma. La división múltiple es descrita por DYROFF y MICHALZIK,³³ SCARPELLINI y MANNARINO¹⁰⁶ y otros, pero parece, si es que existe, excepcional.

No se ha confirmado la reproducción sexual en *T. v.*, mencionada, no obstante, por GRIMMER.⁴⁷

A veces, se divide el cuerpo celular, pero no el núcleo, y así se excluye una porción anucleada del protoplasma. Este fenómeno de autotomía suele preceder en las células grandes y acaso demasiado viejas, a la etapa de divisiones activas.⁶ También sería posible el caso contrario, divisiones nucleares múltiples sin división citoplásmica, produciéndose tricomonas polinucleares, ya conocidas desde KUPFERBERG, cit. por BEDOYA,⁶ y que parecen encontrarse cuando las condiciones para el desarrollo del parásito son dificultosas (observadas en mujeres tratadas con metronidazol) y quizá incompatibles con una ulterior supervivencia. Esta hipótesis no es compartida por GUEVARA y col.⁴⁸

La mayor parte de los parasitólogos^{6,28,48,63,77} que han estudiado el problema de las formas quísticas, consideran que estas pretendidas formaciones, halladas por BENSEN,⁷ parecen ser tricomonas degeneradas en trance de morir, aunque se las transfiera a un cultivo o pasen a tractos genitales de otros individuos, lo que no ocurriría si se tratara de verdaderas formas quísticas. En las preparaciones teñidas con Giemsa u otros métodos se encuentran también formas redondeadas y sin flagelos, que se deben a la agresión que la tinción produce en el delicado cuerpo del protozoo.

2.5. CULTIVO

El gran interés de los medios de cultivo radica en su utilización con finalidades diagnósticas o de aislamiento, así como para el mantenimiento de las cepas y la realización de las pruebas «in vitro» de quimio-resistencia, etc.

Los cultivos se pueden dividir en líquidos y sólidos, obteniéndose estos últimos por la adición de agar al 1-2 %. JIROVEC y PETRU⁶³ hacen una clasificación de los medios según tengan o no suero en su composición.

El primer cultivo de *T. v.* lo consiguió LYNCH en 1915, usando como medio caldo acidificado. REULING (1921) y FISCHER (1935), emplearon también con éxito, medios simples; al mismo tiempo se emplearon medios más complejos por BOECK y DRBOHLAV (1925); con medios del mismo tipo que los usados por estos últimos investigadores, obtienen buenos resultados ANDREWS (1929), HAWES (1925) y WHITTINGTON (1951), pero todos estos medios tenían en común el inconveniente de favorecer el crecimiento de las bacterias acompañantes, al mismo tiempo que el de los tricomonas. (Tomado de FEINBERG y WHITTINGTON).³⁵

Un paso importante en la evolución de los cultivos se dio al conseguir mantener cultivos de *T. v.* libres de gérmenes. El primer intento con éxito se debe a HESSELTINE (1933), empleando como medio solución de LOCKE y suero humano. A pesar de obtener cultivos puros de *T. v.*, tenía el inconveniente de que éstos no se multiplicaban si no se adicionaban bacterias al medio. (Cit. por GUEVARA y col.)⁴⁸

La aparición de los antibióticos trajo consigo la adición de éstos a los medios con esta finalidad.

ADLER y PULVERTAFT¹ emplean penicilina en la proporción de 250 U.I. por ml.; la asociación de penicilina y estreptomina fue ampliamente usada por diversos autores: JOHNSON y TRUSSELL,⁶⁵ SPRINCE y KUPFERBERG,¹¹³ MACARA y col.,⁸⁴ entre otros, a las dosis habituales de 400 a 1.000 U.I. de penicilina y 100 a 1.000 microgramos de estreptomina por ml. de cultivo líquido.

De la misma manera se utiliza para los primocultivos el cloranfenicol (CARNERI y col.)¹⁸ La estreptomina y polimixina dan también muy buenos resultados. Para la inoculación a animales de experimentación, conviene realizar el crecimiento del inóculo en presencia de un antibiótico macrólido, que actúe sobre los posibles mycoplasmas de origen vaginal, los cuales pueden enmascarar la lesión experimental de los tricomonas.

El empleo de estos medios con fines diagnósticos tiene el inconveniente de su complejidad y costo elevado, que no les hace aptos para el trabajo de rutina en el laboratorio: por ello McENTECART⁸⁶ propuso un medio derivado del de JOHNSON y TRUSSELL⁶⁴ simplificándolo; este medio fue sustancialmente modificado por FEINBERG,³⁴ obteniendo excelente crecimiento del

parásito en sus trabajos experimentales; una última modificación de este medio es recomendada por este mismo autor para el diagnóstico de rutina. Sin embargo, para algunos autores,^{44,82} el empleo de los medios de cultivo parece indispensable para determinar con exactitud, la curación de una tricomoniasis después de un tratamiento.

Si hay sospecha de PPLO se puede añadir al medio 2.500 U./ml. de kanamicina.⁵⁷

Es extraordinariamente frecuente la presencia de levaduras y hongos filamentosos, bien sea debido a estar asociados al material de siembra, o bien por contaminación posterior. Este grave inconveniente en el cultivo de tricomonas puede eliminarse adicionando nistatina a la proporción de 300 gammas por ml. de cultivo⁵⁷ o bien anfotericina B a la proporción de 2 mg. por ml.⁹⁶ IVEY,⁶¹ empleando medio sólido, asocia nistatina a los antibióticos, a la proporción de 25 microgramos por ml. de medio.

Un sistema, a la vez ingenioso y sencillo, que sirve para eliminar de los cultivos tanto las bacterias como las levaduras, es el descrito por DE CARNERI,¹⁵ que consiste en un tubo de 20 cm. de largo por 1 de ancho, acodado en forma de W, en el que se introducen 20 ml. de medio C.P.L.M. El material contaminado se vierte por una de las ramas del tubo, y se incuba a continuación a 37°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, con una pipeta estéril, se extrae por el lado opuesto al que se ha hecho la inoculación, pequeñas cantidades de medio, que se vierten en un tubo normal. El fundamento de este artificio se basa en que el agar del medio impide la difusión hacia la profundidad, actuando como una barrera, de las bacterias y levaduras, mientras que los tricomonas progresan rápidamente hacia el fondo de la primera rama y de allí hasta el segundo brazo, de donde son extraídos fácilmente al segundo día.

Una mejora en los métodos de cultivo fue la señalada por MACARA y col.⁸⁴ utilizando el tubo de HALL, que consiste en un tubo de vidrio con un estrangulamiento en el tercio inferior, sobre el que se coloca una bola de vidrio que impide la difusión del oxígeno de la parte superior a la inferior, creando unas mejores condiciones de anaerobiosis para el crecimiento del parásito.

A pesar de todos los procedimientos descritos, no siempre es posible obtener cepas de cultivos puros. HOLECKOVA-CERVOVÁ⁵² sólo los consigue en el 60-70 % de los casos; la realidad es que algunas cepas se pierden al cabo de varios meses por razones desconocidas. Asimismo, observa diferencias en el crecimiento de varias cepas de *T. v.*; unas lo hacen en forma de gruesos copos y otras en líneas verticales o diagonales.

El número de *T. v.* por ml. de cultivo líquido oscila entre 10.000 y un millón.⁶³

ROIRON-RATNER,¹⁰³ realizando un estudio comparativo de diez medios señala como resumen el interés de ciertos compuestos para el crecimiento de *T. v.*, tales como azúcar, suero fresco, extracto de hígado, oxidorreductores, antibióticos (penicilina y estreptomina), preparando con esta base un medio personal con el cual obtiene excelentes resultados.

Respecto a la posible influencia de las bacterias sobre el crecimiento de *T. v.*, PRAY (1952), observó algunas con carácter estimulante sobre la vida de los cultivos y otras, en cambio, con efecto inhibitorio, moderado o acentuado, sobre los mismos, pero no se encontraron los metabolitos específicos o sustancias antagónicas responsables de estos efectos. La glucosa y la maltosa prolongaron la vida de los cultivos, aún en aquellos que contenían bacterias con efecto inhibitorio sobre los mismos; este efecto no era debido a cambios en el pH o en el potencial redox. Otros estudios sobre este punto fueron efectuados por SOREL (1954), DE CARNERI (1956), FEO (1958) entre otros. Anteriormente HITCHCOCK (1948), ya había observado la inhibición que determinadas bacterias producían sobre el crecimiento de cultivos de *T. v.* y *T. foetus*. (Tomado de JIROVEC y PETRU).⁶³

2.5.1. Mantenimiento

Para el mantenimiento, los cultivos deben incubarse a 35-37°C, siendo necesario realizar resiembras cada 3-5 días.⁶³

Diversos autores han dedicado su esfuerzo a conseguir una mayor supervivencia en los cultivos; WESTPHAL (1935), obtuvo una duración de siete meses y medio, utilizando medio pobre en albúmina; MORENAS (1942), usando asparagina, glucosa, Ringer y suero de caballo coagulado, logró conservar una cepa durante 54 días después de 8 subcultivos. (Cit. por GUEVARA y col.)⁴⁸

DE CARNERI¹⁶ en medio difásico de suero de caballo con *E. coli*, cultivado en agar-carne a 37°C, consigue una supervivencia de más de un mes, haciendo resiembras cada 15 días. El mismo autor, usando un medio de tioglicolato, estudia el comportamiento del parásito frente a distintas cantidades de suero de caballo, estableciendo como óptimas las concentraciones de 0,5 a 1,1 %, que permiten una supervivencia de un mes.

CAVIER y MOSSON,²¹ consiguen mantener cepas de *T. v.* en las vías genitales de ratas castradas y sometidas a un tratamiento con estradiol; la infestación persiste después de suspender el tratamiento hormonal, un tiempo que varía entre 40 y 76 días, técnica que utilizan los autores para las pruebas farmacológicas «in vitro».

FEÖ³⁶ comunica el mantenimiento de *T. v.* en medio S.T.S., sin maltosa, durante 20 meses, adicionando cultivos de *Micrococcus pyogenes*, var. *aureus*.

CHRISTIAN y col.,²⁹ cultivaron *T. v.* sobre células HELA con el medio T.C. 199, o en la solución tamponada de Eagle, suplementada con suero humano o de ternera. En ausencia de células HELA, el parásito no crecía. Un medio de cultivo similar ha sido utilizado posteriormente, con buenos resultados, por SANCHEZ-BAYARRI y col.¹⁰⁵

McENTEGART (1954), y posteriormente, en 1959 conservó *T. v.* durante 26 meses en cultivos con glicerol al 5 %, y a la temperatura de -79°C; y con dimetil sulfóxido del 5-15 % y a la temperatura de -170°C, consiguió mantenerlos vivos durante 35 meses.^{63, 87}

STABLER y col. (1964), cit. por JIROVEC y PETRU,⁶³ encontraron que *T. v.* y *T. gallinae*, conservaban su patogenicidad original para los hospedadores naturales y experimentales, así como para los cultivos tisulares durante muchos meses, utilizando medios con glicerol, a temperaturas inferiores a -70°C. En trabajos similares, HONIGBERG y col.,⁵⁶ conservaban ambas especies, empleando medio de DIAMOND en nitrógeno líquido, en presencia de dimetil-sulfóxido.

DIAMOND y col. (1965) mantuvieron cultivos axénicos de *T. v.* con dimetil-sulfóxido al 5 %, por congelación y conservación a -160°C en atmósfera de nitrógeno líquido. Transcurridos dos años, no existían diferencias significativas entre las pruebas realizadas con estos organismos y las efectuadas con los mismos antes de la congelación, en relación a la virulencia para el ratón, por la inyección intraperitoneal.⁶³

2.5.2. Medios líquidos de cultivo

El medio más frecuentemente usado y a partir del cual han derivado los medios utilizados con más profusión en la actualidad, es el C.P.L.M. (cisteína, peptona, hígado (liver), maltosa), descrito por JOHNSON y TRUSSELL⁶⁴ por primera vez en 1943.

Posteriormente han aparecido otros medios, buscando fórmulas más simples y menos costosas y por tanto más asequibles a un diagnóstico de rutina. Entre ellos tenemos, el S.T.S. (suero tripticasa simplificado) o medio de SPRINCE y KUPFERBERG;¹¹³ el medio de McENTEGART⁸⁶ derivado del de JOHNSON; el medio de FEINBERG,³⁴ así como la variante de este método propuesta por STENTON¹¹⁵ (Oxoid); muy empleado también ha sido el Caldo-Vf de MACARA y col.;⁸⁴ el de HAMADA (1953), usado, entre otros, por BEDOYA con buenos resultados; el de SOREL (1954) (cit. por JIROVEC y col.)⁶³ muy sencillo y sin suero; el de DIAMOND,³¹ del que somos partidarios entusiastas y al que NIELSEN⁹³ encuentra superior, incluso, al C.P.L.M.; y por último, el de ROIRON-RATNER¹⁰³ usado, entre otros, por GOSSELIN y col.⁴⁴ Esta lista podría incrementarse con muchos más nombres de los diversos medios empleados, pero creemos que los citados han sido los más importantes.

2.5.3. Medios sólidos

T. v. se ha cultivado en numerosos medios líquidos. Sin embargo, no son muy abundantes las comunicaciones referidas a su crecimiento en medio sólido. WIRTSCHAFTER,¹²⁵ describió un método de cultivo, en el que logró mantenerlos vivos durante 20 días o más. ASAMI y col.,³ logran crecimiento del parásito, empleando medios sobre placas de Petri.

FILADORO y ORSI³⁷ realizan cultivos de tricomonas en la superficie y profundidad de placas de Petri.

Posteriormente, IVEY,⁶¹ no sólo aísla clones de *T. v.*, sino que realiza pases seriados con éxito.

SAMUELS,¹⁰⁴ efectúa estudios no solamente sobre *T. v.*, sino sobre otras especies del género *Trichomonas*, empleando placas de Petri, tubos de Burry y porta-objetos.

La ventaja de los cultivos sólidos, aparte de la consecución de clones de *Trichomonas*,^{37, 61, 104} es que permite realizar ensayos «in vitro» para valorar la inhibición del crecimiento de determinados agentes tricomonicidas.³⁷

2.6. BIOQUIMICA

T. v. es un protozoo parásito anaerobio, si bien puede utilizar O₂ en algunas circunstancias (aerobio facultativo). El consumo de O₂ se estima en 162 mm³ cada 100 millones de flagelados por hora. No tiene citocromo C, ni mitocondrias y se ve profundamente afectado por las altas concentraciones de O₂. El único gas que se puede determinar que producen en cantidad apreciable, es el CO₂.^{48, 63, 70, 72}

La principal fuente de energía parece ser la glucosa, pero también utilizan la maltosa, galactosa, levulosa y glicógeno (MACARA y col.⁸⁴). Sin embargo, ASAMI (1956), señala que la lactosa y la galactosa no estimulan la multiplicación celular. NINOMIYA y SUZUOKI (1952) demostraron, empleando métodos manométricos, que la glucosa y la maltosa son rápidamente oxidadas, mientras que el piruvato y lactato son metabolizados en la mitad del tiempo que el azúcar.⁶³

Por las condiciones estrictas de anaerobiosis que requiere *T. v.* se precisa añadir a los medios de cultivo sustancias que disminuyen el potencial redox del medio, tales como cisteína, tioglicolato, extracto hepático, etc.⁷⁰

Los requerimientos de aminoácidos son iguales a los de los organismos más elevados. *T. v.* no sólo metaboliza dichos aminoácidos, sino que, según WELLERSON y KUPFERBERG (1962), parece ser capaz de sintetizar casi todos ellos. IYORI (1959), señala que la descomposición de proteínas parece ser más activa cuando el número de organismos decrece en los cultivos, que en las primeras etapas, cuando se multiplican activamente, posiblemente debido a los enzimas liberados por los individuos destruidos. La glucosa parece, en algún grado, restringir la descomposición de las proteínas, cuando se usa como fuente de energía. (Tomado de JIROVEC y PETRU).⁶³

T. v. requiere la presencia de suero inactivado en los medios, para su crecimiento. Por esta razón la mayoría de los medios de cultivo lo llevan como componente esencial.^{30, 48, 63}

SPRINCE y KUPFERBERG,¹¹³ obtienen del suero humano dos fracciones, una soluble en éter y otra en agua; ambas parecen ser necesarias para el crecimiento normal «in vitro» del flagelado.

La concentración óptima de suero equino, es estudiada por DE CARNERI,¹⁷ quien la fija entre 0,5 a 1,1 %.

Como factores de crecimiento tienen valor los ácidos linoléico y pantoténico (KUPFERBERG y col. 1948); el colesterol, en cambio, no parece ser absolutamente imprescindible.^{30, 48}

BACK y col. (1950), comunican que el ácido ascórbico, el ácido glutámico y la colina, producen una estimulación de la multiplicación celular. La glutamina también parece ser necesaria para el desarrollo de los cultivos.⁶³

Se han identificado deshidrogenasas succínicas, málicas y cítricas, indicando la probable existencia de un ciclo TCA. En cambio, no parecen ser capaces de la formación de fermentos proteolíticos.

Los estrógenos no parecen influenciar el crecimiento de los cultivos (KUPFERBERG y JOHNSON).⁷¹

El pH óptimo oscila según PIEKARSKI (1945), entre 5,4 y 6, desarrollándose tanto en medio vaginal ácido como alcalino.³⁰

La temperatura adecuada varía entre 35-37°C.³⁰

Los estudios citoquímicos sobre *T. v.* realizados por LUDVIK y col.,⁸¹ arrojan los siguientes datos: El DNA está presente sólo en el núcleo, como finas granulaciones situadas en la periferia de la membrana (detectado por la reacción nuclear de Feulgen y la tinción con verde de metilo). El citoplasma no contiene DNA y es siempre Feulgen negativo. El RNA fue puesto de manifiesto mediante pironina y azul de toluidina por BRACHET, cit. por JIROVEC y col.,⁶³ como pequeños gránulos cerca del núcleo y del axostilo.

La coloración argéntica con protargol (BODIAN), tiñe todo el aparato locomotor, la membrana ondulante, la costa, el extremo final del axostilo y también el núcleo.

En la mitad anterior del cuerpo y a lo largo del axostilo aparecen gránulos PAS-positivos, algunos aparecen dispersos en el citoplasma.

El glucógeno, teñido con carmín de Best, se halló principalmente bajo la membrana celular. También aparecen gránulos aislados de glucógeno distribuidos irregularmente en el interior del citoplasma. Los ácidos mucopolisacáridos encontrados en esta zona no son tan abundantes como las sustancias PAS-positivas (HALL).

Los lípidos se encuentran en el plasma como pequeñas gotitas y se tiñen con rojo aceite 0, Sudán III, Sudán IV y sulfato azul de Nilo. (Tomado de JIROVEC y PETRU).⁶³

2.7. DIAGNOSTICO

Se realiza mediante la demostración del parásito en cualquiera de las localizaciones del aparato génitourinario.

2.7.1. Toma de muestras

2.7.1.1. En la mujer

a) Vagina.

Se requiere como condición previa, no realizar irrigaciones vaginales, ni aplicar medicaciones locales de cualquier clase.

Previa introducción en vagina de un espéculo estéril sin lubricar, las muestras se toman del contenido vaginal de los fondos de saco, con ayuda de un asa de platino.^{6,35,48,92} BEDOYA,⁶ recomienda realizar simultáneamente un pequeño raspado de las paredes vaginales con asa de platino.

Otros autores recomiendan el empleo de torunda de algodón con introducción posterior en un tubo de ensayo con solución salina estéril,⁷⁶ o medio de cultivo.⁴⁸

FEINBERG y col.,³⁵ efectúan también la toma de muestras con pequeñas cucharas de plástico. Asimismo puede utilizarse, con este fin, la espátula de AYRE.⁹²

En otras ocasiones, la toma de muestras se realiza mediante pipetas de Papanicolau o similares, adaptadas a una pera de goma.¹²

Existe un artificio, que pudiera tener utilidad en aquellos casos en que la cantidad de secreción sea escasa, consistente en practicar una irrigación vaginal con solución salina estéril calentada a 37°C y aspiración posterior del contenido, mediante jeringa,⁴⁸ pipeta de cristal con pera de goma,³¹ o bien con pipetas de plástico de las empleadas en las encuestas masivas para el diagnóstico precoz del carcinoma de cervix.⁹⁰

En el caso de una mujer virgen, se puede aspirar el contenido vaginal con una sonda blanda de goma, o bien exteriorizar el exudado a través del orificio himenal, mediante presión digital de la pared vaginal posterior desde el recto.⁹²

b) Uretra.

Se requiere como condición previa que haya transcurrido el mayor tiempo posible después de la última micción; lo ideal es hacerlo antes de haber efectuado la primera micción de la mañana.

Previa limpieza y desinfección del meato urinario y vestíbulo, algunos autores realizan un pequeño raspado de las paredes uretrales con asa de platino^{6,66,68} especialmente de su pared posterior⁶; en ocasiones se completa con expresión uretral,^{66,108} o con reactivación de la secreción uretral por medio de instilaciones de NO₃Ag al 0,5 %.¹⁰⁸

Algunos autores,^{66,68,109} realizan el diagnóstico a partir del examen del sedimento urinario, previa centrifugación. Sin embargo, este procedimiento no es aceptado por otros.⁶

c) Otras localizaciones.

La búsqueda del parásito se ha llevado a cabo en otras localizaciones del aparato génitourinario: expresión de las glándulas de Bartholino y vestibulares,¹⁰⁸ cervix,^{8,92,109} e incluso en tramos más altos, como BERIC,⁸ que con ayuda de una cánula de Palmer, recogió muestras de

la cavidad uterina, aunque con resultado negativo; este último autor encuentra algunos casos positivos en orina obtenida por cateterismo de uréteres y de pelvis renal.

2.7.1.2. En el hombre

Para la toma de muestras se sigue una técnica similar a la de la recogida de uretra en la mujer,^{6,9,20,38,66} raspando suavemente las paredes a unos 2 ó 3 cm. del meato, insistiendo preferentemente en la fosa navicular; según FIOCARDI,³⁸ SIBOULET realiza la toma mediante una legra pequeña de otorrinolaringología que introduce en uretra, raspando principalmente la fosa navicular. Asimismo se puede realizar el examen del sedimento urinario.^{9,35} A veces, va asociado con el masaje de próstata,³⁸ al objeto de comprobar la existencia del parásito en líquido seminal, y mientras para unos autores,^{6,92} este hallazgo es excepcional, otros,⁹ lo encuentran en elevado porcentaje.

2.7.2. Examen colposcópico

Aunque no es posible realizar un diagnóstico de certeza mediante este procedimiento, recientemente CARRERA y col.¹⁹ describen una serie de lesiones que relacionan con una infección por *T.v.*: así la colpitis con puntos rojos o colpitis geográfica, está producida por tricomonas casi en un 50 % de los casos, señalando como lesión específica la aparición de una «doble cresta papilar» descrita anteriormente por otros colposcopistas.

La colpitis focal o en manchas, pertenece, en algo más del 98 % de las ocasiones, a una infección por *T.v.*, señalando, por último, en las reinfecciones por este protozoo, la aparición de una colpitis hipertrófica o granulosa. BERGSJO y col. (1963), COLLER (1963) y KOLSTAD (1964), (cit. por CARRERA y col.).¹⁹

2.7.3. Examen microscópico

2.7.3.1. Examen en fresco del exudado

El examen debe efectuarse inmediatamente después de realizada la toma, mezclando una gota de exudado con una gota de solución salina templada, sobre todo en tiempo frío, sobre un portaobjetos liso o excavado, haciendo el examen entre porta y cubre o en gota pendiente. En aquellos casos en que se realiza la toma de muestras mediante porta-algodones introducido en tubo de ensayo con solución salina, el examen puede demorarse cierto tiempo, lo cual permite el envío del material al laboratorio. El diagnóstico se basa en la observación de los movimientos típicos, como de látigo, de los flagelos y membrana ondulante, que desplazan, a veces, los leucocitos y células circundantes. La búsqueda del parásito debe realizarse en los bordes de la preparación, pues al ser más escaso el contenido celular, se pueden apreciar más fácilmente los movimientos citados.

La observación del parásito se realiza mediante:

a) Microscopio convencional.

El microscopio es, actualmente, imprescindible en la consulta ginecológica; para este examen es conveniente bajar mucho el condensador y/o diafragma para que la iluminación sea escasa, usando, habitualmente, objetivos de pocos aumentos.⁶

b) Examen sobre fondo oscuro.

COUTTS y col. (1955), cit. por GUEVARA,⁴⁸ observan los flagelos del parásito en color rojo, interponiendo filtros polarizantes.

c) Microscopio de contraste de fases.

Este examen, para algunos autores,⁶ no presenta ventajas sobre el método anterior, por lo laborioso de su procedimiento lo cual es válido también, con mayor motivo, para el empleo del ultramicroscopio.

d) Microscopía de fluorescencia.

Este método, previa tinción con eucrisina, es usado entre otros, por PAVON y col.⁹⁷

2.7.3.2. Examen mediante coloraciones vitales

Algunos autores se muestran partidarios de la adición de colorantes para facilitar la observación de los tricomonas en el examen en fresco. Así BENDER (1935), cit. por BEDOYA, HOLTORFF (1957) cit. por JIROVEC y col.,⁶³ MAYER,⁸⁵ y NICOLI y col.,⁹² emplean el azul de cresil brillante, que tiñe todos los elementos del frotis en azul, permaneciendo los tricomonas sin colorear.

La solución de safranina al 0,1 % es recomendada por MILLER (1936) (cit. por BEDOYA)⁶ y STARZYK y col. (1958) (cit. por JIROVEC y PETRU).⁶³

El rojo neutro en solución acuosa al 1 por 1.000 es utilizado por NICOLI y col.⁹² y entre nosotros por GUEVARA POZO y col.⁴⁸ Estos autores también utilizan en sus estudios el azul de metileno del 1/100 al 1/10.000.

El preparado comercial «Trichomonas Diluent Ortho» tiñe las células y demás elementos del frotis en color rosa mientras tricomonas y leucocitos permanecen incoloros; este procedimiento es recomendado por CONROY (cit. por GUEVARA)⁴⁸ y usado entre otros por GUEVARA y col.⁴⁸

2.7.3.3. Examen mediante frotis teñidos

Una buena tinción será aquella que destaque de una manera clara los flagelos y la membrana ondulante; para conseguirla se requiere que la fijación del frotis sea adecuada, evitando la destrucción del delicado cuerpo del parásito. La fijación se consigue dejando secar al aire la preparación y sumergiéndola, bien en alcohol metílico, o en una mezcla de alcohol de 90° y éter a partes iguales, durante 10 minutos; nunca deberá realizarse la fijación por el calor.

Entre las más empleadas están las tinciones panópticas a base de eosinato de azul de metileno, por ejemplo, la de Giemsa diluida,^{6,48,63} así como la de Wright y la de May-Grunwald. Los tricomonas se reconocen por el color azul celeste del protoplasma y el color rojo violeta del núcleo.

Otro método de tinción empleado ha sido el de Gram; los tricomonas son Gram-negativos, pero su identificación requiere cierta experiencia, dado que el cuerpo celular aparece casi siempre destruido y resulta excepcional el reconocimiento de los flagelos. Para CREE²⁷ los resultados conseguidos con este método de tinción, serían comparables a los obtenidos mediante cultivos.

En la tinción con nigrosina⁶ se pueden observar los tricomonas en blanco, destacando sobre el fondo negro de la preparación.

Otros métodos de tinción usados, han sido los siguientes: tricrómico de Gomori; el verde metileno pironina; el azul de metileno, rechazado, sin embargo, por BAUER;⁵ la hematoxilina férrica;⁹² la safranina y el azul de toluidina, empleadas por CAPET y col.;¹⁴ la fuchsina fenica-da, etc.

Por último, es importante señalar los métodos de tinción para la citología vaginal exfoliativa, que han alcanzado en la actualidad una gran importancia, tanto desde el punto de vista hormonal como de diagnóstico precoz del cáncer genital femenino. Los métodos de tinción empleados más frecuentemente son el de SHORR, generalmente utilizado para el diagnóstico hormonal, y el de PAPANICOLAU, para el diagnóstico de malignidad.

En las preparaciones teñidas con el método de SHORR, los tricomonas aparecen con el cuerpo teñido en verde pálido, sobre el que destaca el núcleo de color rojo; no es frecuente la observación de los flagelos.¹⁰⁰ En las tinciones con el Papanicolau los protozoos tienen aspecto como de burbujas, de color gris, con el núcleo teñido más intensamente que el protoplasma; tampoco es frecuente la observación de los flagelos.^{45,111}

La presencia de tricomonas en los frotis produce una serie de alteraciones en los componentes de los mismos, que en ocasiones, les confieren un aspecto patognomónico; así, por ejemplo, es frecuente la observación de incremento de la acidofilia en las células.⁹⁵ Esta alteración no va acompañada de cariopincosis, por lo que se la denomina pseudoeosinofilia.^{11,89,100,111} Es muy frecuente la observación de halo perinuclear, producido por la retracción del núcleo.^{11,89,95,100} En ocasiones, el núcleo toma un aspecto vacuolado, por la condensación de la cromatina en el borde nuclear, modificación que es típica, en opinión de GRAHAM.⁴⁵ También se ha descrito multinucleación y discariosis.^{11,89} El hallazgo de atipias nucleares fue señalado por vez

primera por PAPANICOLAU y col.⁹⁵ Las alteraciones celulares afectan fundamentalmente a la capa basal e intermedia.⁴⁵

El frotis, considerado en conjunto, presenta un aspecto «sucio», debido a la presencia de leucocitos, flora mixta abundante y, en ocasiones, levaduras; también se observa, ocasionalmente, la coexistencia con bacilos de Döderlein, aunque este hallazgo no sea demasiado frecuente.^{80,89,100} Quizás por ello, al examen macroscópico, estos frotis aparecen casi siempre teñidos más intensamente, lo que nos permite sospechar la presencia de una infección por tricomonas.⁹⁸

Algunos autores^{89,100} señalan la disminución, e incluso la desaparición, de los tricomonas del frotis en la fase preovulatoria, lo cual restaría, evidentemente, valor práctico a este método, desde el punto de vista diagnóstico de la tricomoniasis.

2.7.4. Por serología

El diagnóstico serológico e inmunológico ha tenido solamente un interés teórico hasta el presente, porque el hallazgo de *T.v.* mediante cultivos o examen microscópico directo es más fácil y más digno de confianza. En la mayoría de las tricomoniasis asintomáticas del hombre, sin embargo, tales investigaciones podrían ser importantes desde un punto de vista práctico. Parece que las divergencias señaladas por diferentes autores pueden ser debidas a la distinta estructura antigénica de las diversas cepas de *T.v.* La altura de los títulos también parece tener relación con la sintomatología clínica.⁶³

2.7.4.1. Fijación del complemento

RIEDMULLER (1932), cit. por JIROVEC y col.,⁶³ fue el primero que encontró reacciones de fijación del complemento positivas en cobayos inyectados intraperitonealmente con flujo vaginal conteniendo tricomonas. TRUSSELL y col.,¹²¹ empleando como antígenos una suspensión acuosa de *T.v.*, encontraron positividad en mujeres exentas de *Trichomonas*, por lo que los autores citados no reconocen valor práctico a esta prueba.

HOFFMANN y col. (1966), cit. por JIROVEC y PETRU,⁶³ usando la técnica cuantitativa de Kolmer, en pacientes de ambos sexos, encuentran una positividad más alta en los pacientes con tricomoniasis crónica que en los casos agudos.

JAAKMEESS y col. (1966), recomiendan el empleo simultáneo de antígenos de diferentes serotipos.⁶³

En los pacientes tratados con metronidazol se observa una disminución gradual de los títulos a partir del tercer mes, desapareciendo por completo al cabo de un año.⁶³

2.7.4.2. Aglutinación

TRUSSELL,¹²⁰ estudiando el desarrollo de aglutininas en conejos, encuentra macro y micro-aglutinaciones, los títulos más altos obtenidos fueron de 1/5.000 a 1/10.000.

TATSUKY (1957), encontró reacciones positivas tanto en mujeres infectadas, como en el grupo de control, aunque en este último caso los títulos fueron relativamente bajos (1/30): no obstante, niega valor práctico al método.⁶³ De la misma opinión es MACARA (1957), (cit. por BEDOYA),⁶ que tampoco obtiene buenos resultados con esta prueba.

TERAS (1961), encuentra que el suero humano normal contiene aglutininas contra *T.v.* a los títulos de 1/40 a 1/80. En trabajos posteriores, encuentra que los títulos de aglutinación dependen de los distintos serotipos de *T.v.*, dando algunos serotipos títulos tres o cuatro veces más altos que otros; al mismo tiempo considera como límite normal el título de 1/160; en pacientes con tricomoniasis los títulos fueron de 1/200 a 1/480 y aún más altos. Estos valores descendieron a la normalidad en el plazo de un año en el hombre, y de 16 meses en la mujer; esta tasa de disminución no parece depender ni de las formas clínicas ni de los títulos iniciales. Esta suposición fue confirmada por NICESSEN (1963). (Tomado de JIROVEC y col.)⁶³

Para TERAS,¹¹⁷ y TERAS y col.^{118,119} el diagnóstico de la tricomoniasis uro-genital me-

diente aglutinación y fijación del complemento puede realizarse usando como antígeno los serotipos de las cepas de *T.v.* más comunes en la zona donde se realice el estudio.

2.7.4.3. Intradermo-reacción

ADLER y SADOWSKY² y LANCELEY⁷⁴ obtienen resultados inconstantes con esta prueba, empleando un antígeno obtenido de un cultivo puro de *T.v.*

Posteriormente KAWAI y col. (1961) (cit. por JIROVEC y PETRU),⁶³ obtuvieron dos extractos de *T.v.*: uno sin características específicas, y otro, identificado por cromatografía, que producía una intradermo-reacción específica en mujeres infectadas. La prueba se realizaba en el antebrazo, considerándose positiva, cuando el tamaño del eritema era mayor de 10 mm. de diámetro. Esta prueba se hacía positiva unas dos semanas después del comienzo de la infección y se negativizaba cuando los tricomonas desaparecían de los frotis por la acción del tratamiento. Por tanto, consideran que esta prueba tiene valor diagnóstico en la tricomoniasis.

JAAKMEES y TERAS (1966), obtuvieron mejores resultados con antígenos corpusculares que con antígenos lisados, confirmando los resultados de ANITA-RADTCHENKO (1959) y SINELNIKOVA (1961). En los casos positivos se producía eritema y pápula, encontrando el mayor grado de positividad en mujeres con tricomoniasis aguda y sub-aguda; personas sin tricomonas pueden dar reacción positiva, pero sólo en el caso de que su compañero sexual padezca la infección. (Tomado de JIROVEC y col.)⁶³

2.7.4.4. Otras pruebas

Hemoaglutinación.—McENTEGART⁸⁶ y LANCELEY y McENTEGART,⁷⁵ no encontraron aglutinaciones positivas en mujeres infectadas experimentalmente.

Inmunofluorescencia.—Según JIROVEC y col.,⁶³ McENTEGART (1958) y KUCERA y KRAMAR (1965), obtuvieron resultados positivos con esta prueba, en el suero de 17 mujeres y dos hombres que padecían tricomoniasis en diferentes estadios, mientras que el suero de seis personas sin infección resultó negativo. También entre nosotros, utilizan este método PAVON y col.,⁹⁷ con buenos resultados para el diagnóstico de la tricomoniasis en el varón.

Muco-aglutinación. (MAR).—ROM y DE THIERY (1958), empleando secreción vaginal de mujeres infectadas, no encontraron resultados positivos para esta prueba, en contraste con los hallazgos obtenidos por FLORENT (1938) para *T. foetus*.^{6, 63}

Reacción de SABIN-FELDMAN (SFR).—MICHALZYK⁸⁸ sostuvo la teoría de que la prueba de Sabin-Feldman era inespecíficamente positiva, tanto para las pacientes de toxoplasmosis como de tricomoniasis; pero esta afirmación no pudo ser confirmada, ya que PIEKARSKI y col.⁹⁹ no encontraron esta reacción cruzada.

2.7.4.5. Serotipos

KOTT y ADLER⁶⁹ demuestran, mediante pruebas de aglutinación y absorción cruzada, que *T.v.* no es una especie homogénea desde el punto de vista serológico, sino que consta de varios serotipos distintos, aunque todas las cepas tienen aglutinógenos comunes, encontraron ocho serotipos distintos entre 19 cepas de *T.v.* HOFFMANN y GORCZYNSKI⁵⁰ distinguieron varios tipos serológicos en 23 cepas.

TERAS (1959, 1962, 1963, 1965), NIGESSEN (1963) y JAAKMEES (1965), (cit. por JIROVEC y col.)⁶³ encontraron cuatro serotipos distintos que denominaron TR, TN, TRT y TLR.

De 100 cepas de *T.v.* aisladas, el 43 % pertenecía al serotipo TR, el 29 % al TRT, el 14 % al TN y el 13 % al TLR. Es interesante señalar que de 34 matrimonios examinados las cepas aisladas de ambos cónyuges pertenecían al mismo serotipo en 32 casos y en los dos restantes, en que los serotipos eran distintos, los maridos mantenían relaciones extramaritales. No se encontró relación entre serotipos y cuadro clínico así como tampoco con el grado de virulencia de la cepa.

TERAS,¹¹⁶ considera necesario el uso de un antígeno polivalente obtenido de todos los se-

rotipos conocidos, para valorar las reacciones serológicas en el diagnóstico de las tricomoniasis, así como para la comprobación de los resultados del tratamiento.

2.8. PATOGENIA EXPERIMENTAL EN ANIMALES DE LABORATORIO Y CULTIVOS CELULARES

Los primeros estudios realizados con cultivos xénicos de *T.v.*, o directamente con secreción vaginal conteniendo *Trichomonas* son, en la actualidad, solamente de interés histórico. A partir del momento en que fue posible la utilización de cultivos libres de gérmenes, fueron muy abundantes los trabajos experimentales relacionados con este tema.

2.8.1. Vías de infección

2.8.1.1. Intravaginal

a) Cricetos.

UHLNHUTH y SCHOENHERR¹²² inocularon cricetos dorados con cultivos de *T.v.*, consiguiendo reproducir la infección, después de la primera inoculación, en un 20-30 % de los animales; después de inoculaciones reiteradas, este porcentaje ascendió al 80-90 %; la infección se mantuvo durante más de un año, resultando posible la transmisión a otros animales sanos a partir de secreciones vaginales de los primitivamente infectados.

VERSHINSKII¹²³ inoculando cricetos dorados, consiguió mantener la infestación de dos semanas a varios meses.

b) Ratonos.

SCHNITZER y col.¹⁰⁷ estudian la patogenicidad de diferentes especies de *Trichomonas* para el ratón, con el fin de obtener un método experimental adecuado para la evaluación «in vivo» de la actividad tricomonocida de diversos agentes. Estos estudios sirvieron posteriormente a LYNCH y col.⁸³ para probar la actividad tricomonocida de 21 agentes quimioterápicos.

c) Ratas.

CAVIER y MOSSION,²² logran infectar con éxito ratas en estro permanente, conseguido mediante inyecciones de estradiol; después de suprimido el tratamiento hormonal, persistían *T.v.* en la vagina de las ratas durante 40-76 días. En un trabajo previo, estos mismos autores obtienen los mejores resultados con la suspensión cristalina de benzoato de estradiol, a la dosis de 10 mg. cada 15 días en inyección subcutánea. Los estrógenos de síntesis, administrados por vía oral, dieron resultados inconstantes. Esto sirvió de base para la puesta a punto de una prueba farmacológica de ensayos «in vivo» de medicamentos tricomonocidas.

COMBESCOT y col.,²⁴ realizaron inoculaciones tanto en ratas castradas como en no castradas, empleando en este último caso fuertes dosis de estrógeno (inyección diaria de 100 microgramos de benzoato de estradiol) durante 1 a 3 semanas; consiguen resultados positivos en ambos casos, observando la desaparición rápida de los tricomonas de la cavidad vaginal, tras la inyección intramuscular de 2,5-5 mg. de progesterona durante 3 ó 4 días. En la rata castrada, la administración de estrógenos no modificó sensiblemente el pH vaginal (6,9-7,2).²⁵ La inyección de testosterona por vía parenteral en ratas castradas, da lugar al reposo sexual por una parte, y a la desaparición rápida de los tricomonas de la vagina, por otra.²⁶

MANDOUL y col. (1957), intentaron sin éxito una infección duradera inoculando *T. tenax* a ratas jóvenes castradas mantenidas permanentemente en estro artificial; solamente permanecieron parásitos en la vagina durante 48-96 horas después de la inoculación, lo cual es un dato más para demostrar que ambos protozoos son dos especies distintas.⁶³

c) Cobayas.

GINEL⁴⁰ y SOSZKA y col.¹¹² realizaron estudios bioquímicos sobre variaciones en el DNA y RNA de las células del epitelio vaginal de cobayos infectados con un cultivo puro de *T.v.* KAZANOWSKA (1962), cit. por JIROVEC y PETRU,⁶³ también en cobayos inoculados con cultivos puros de *T.v.*, encuentra alteraciones inflamatorias en el epitelio celular, con núcleos relativamente grandes e hiper cromáticos.

2.8.1.2. Subcutánea

a) Ratones.

La inoculación al ratón de cultivos de *T.v.* por vía subcutánea, produce abscesos en el tejido celular, en los que se encuentra un gran número de protozoos.

HONIGBERG y col.⁵⁴ y posteriormente HONIGBERG,⁵³ pusieron a punto un método para determinar la patogenia de diferentes cepas de *T.v.*, consistente en la inoculación al ratón de cultivos axénicos recientes, midiendo el volumen de las lesiones aparecidas a los 6 días de la inoculación; este mismo autor encontró un paralelismo entre las lesiones producidas en el ratón y la virulencia para el hombre, observando que las cepas de *T.v.*, mantenidas mediante subcultivos, perdían parte de su poder patógeno al cabo de cierto tiempo; por el contrario, la presencia de agar o metilcelulosa en el medio, produjo un aumento de la patogenia.

FROST y HONIGBERG⁵⁹ estudiaron minuciosamente en el ratón, el mecanismo de progresión de las lesiones subcutáneas producidas por la inoculación de varias cepas de *T.v.*, describiendo la influencia de los leucocitos, la multiplicación de los parásitos, la destrucción de los tejidos del hospedador con formación de abscesos, el edema circundante, etc.

IVEY y HALL (1964), cit. por JIROVEC y col.,⁶³ observaron que las cepas procedentes de pacientes con sintomatología, mostraban una mayor virulencia para el ratón, que las obtenidas de pacientes asintomáticos.

Es muy probable que los resultados de estas pruebas experimentales dependan, en parte, de la estirpe de ratones usados, por lo que KULDA (1965), empleando los métodos de HONIGBERG, recomienda un tipo de ratón «standard» (Balb/c) para la valoración de la prueba de patogenicidad.⁶³

HONIGBERG y col.⁵⁷ realizando la «prueba del ratón» con cepas de *T.v.* procedentes de mujeres infectadas, encontraron una correlación evidente entre las lesiones que se producían y la gravedad del cuadro clínico (colpitis, cervicitis, anexitis, etc.).

JEFFRIES y col.⁶² encontraron un aumento en las lesiones producidas por cepas de *T.v.* y *T. foetus* aisladas recientemente, cuando se añadía agar al medio o se administraba cortisona al ratón.

b) Cobayos.

NEWTON y col.⁹¹ inoculan subcutáneamente cobayos, libres de gérmenes, y convencionales, con dos cepas de *T.v.* una cepa C, obtenida de un paciente con infección aguda y la otra, R, de un caso leve. Los resultados indicaron que la cepa C fue más patógena que la cepa R, y los cobayos libres de gérmenes más susceptibles a la infestación que los animales convencionales.

2.8.1.3. Intraperitoneal

Son numerosas las comunicaciones sobre inoculación intraperitoneal al ratón a partir de cultivos de *T.v.* SCHNITZER y col.,¹⁰⁷ HAMADA (1953), YAMAGATA (1954), TERAS (1954-1966), IWAI (1957), VERSHINSKII (1958), PARONIKJAN (1958), HONIGBERG (1961-1966) cit. por JIROVEC y col.,⁶³ REARDON y col.¹⁰² entre otros, describen las lesiones producidas en dicho animal de experimentación, consistentes en peritonitis fibrinosa purulenta, focos necróticos en hígado, páncreas, bazo, ganglios linfáticos y otros órganos abdominales con formación de ascitis. La inoculación se efectuaba con una cantidad variable entre 1-5 y 10 millones de flagelados.

HONIGBERG (1959), encontró que los cultivos en medio a base de agar, metilcelulosa o gelatina, aumentaban la patogenicidad de *T.v.* y *T. gallinae*.⁶³

IWAI (1957-1959), realizando inoculaciones intraperitoneales observó diferencias en el poder patógeno de tres cepas de *T.v.*⁶³

REARDON y JACOBS¹⁰¹ consiguieron aislar dos cepas de *T.v.* una de alta y otra de baja virulencia.

El poder patógeno parece estar en relación con el cuadro clínico; las cepas aisladas de pacientes con colpitis agudas o subagudas, resultaron más patógenas que las aisladas de pacientes con colpitis crónicas.^{10,101,102} También se ha señalado por LINDGREN y col.⁷⁸ una pérdida de la virulencia en la mayoría de las cepas después de 2-3 meses de subcultivos.

TERAS y ROIGAS (1966), realizando estudios sobre 171 cepas aisladas recientemente, encuentran un 43 % de patogenicidad alta, 44 % de patogenicidad media y solamente un 12 % de patogenicidad baja, no hallando ninguna carente de poder patógeno.⁶³

Las lesiones que se encuentran con más frecuencia son: peritonitis fibrinosa purulenta localizada particularmente en la región del hígado y bazo; exudado fibrinoso purulento formando un conglomerado que abarca hígado, estómago, bazo y páncreas; focos necróticos diseminados en mesenterio y peritoneo; por el contrario, las glándulas suprarrenales están afectadas en escasa proporción.¹⁰

LAAN⁷³ estudiando 48 cepas de *T.v.* encuentra, que 26 de ellas fueron de patogenicidad alta, 18 de patogenicidad media y cuatro de patogenicidad baja. La patogenicidad disminuyó al cabo de 32 meses de realizar subcultivos, observando también que ocurría lo mismo con el stovarsol; asimismo, la actividad fermentativa experimentó variaciones; por el contrario la capacidad de aglutinación permaneció invariable frente a prolongados pases «in vivo» e «in vitro».

KARBOWSKI (1966), cit. por JIROVEC y col.⁶³ realizando estudios de inmunofluorescencia, observó la diferente distribución de los tricomonas en los tejidos de ratones infectados con *T.v.*

2.8.1.4. Otras vías

Aparte de las vías citadas anteriormente, se han descrito con menos frecuencia, otras, que, en ocasiones, no han ido seguidas de éxito.

WELD y KEAN (1956), realizaron inoculaciones en el interior del ojo del conejo, resultando el método más adecuado cuando éstas se efectuaron en el interior del cuerpo vítreo. La vía intramuscular proporcionó, al igual que la subcutánea, la formación de profundos abscesos en los que se encontraron multitud de tricomonas. Por el contrario, fracasaron los intentos efectuados en ratones utilizando las vías intranasal, oral e intra-intestinal.⁶³

La vía intravenosa ha sido utilizada por INOKI y HAMADA,⁵⁹ que inoculando ratones con 0,1-0,5 ml. de eritrocitos de pollo lavados y a continuación con cultivos puros de *T.v.*, producían la muerte de los mismos entre los días 14 y 40 post-inoculación; estos mismos autores observaron mutaciones (3 flagelos y membrana ondulante más corta), al sembrar estos tricomonas en medios de cultivo inadecuados; sin embargo, estos cambios o mutaciones de *T.v.* a *T. foetus* no han podido ser confirmados, entre otros, por GOBERT y col.⁴²

2.8.2. Patogenia para cultivos celulares

HONIGBERG y col. (1961-1966), (cit. por JIROVEC y PETRU,⁶³) sembrando varias cepas de *T.v.* de distinta virulencia en diferentes cultivos celulares (células He-La, células de hígado de pollo, fibroblastos, células epiteliales, etc.), observaron que se producían cambios degenerativos, no sólo en los distintos tipos celulares empleados, sino también en filtrados obtenidos de los mismos, comprobándose que estos efectos eran más intensos, cuando se utilizaban cepas de más alta virulencia.

El crecimiento de *T.v.* divide y destruye las células He-La en cultivos celulares; estas células resultaron ser un buen sustituto de la vagina para el estudio de los tricomonas.²⁹

3. MATERIALES Y METODOS

Para la realización de nuestro trabajo se utilizaron 50 cepas de *T.v.* procedentes de 47 pacientes obstetroginecológicas, durante el período comprendido entre el mes de setiembre de 1970 y el mes de abril de 1972.

Del total de cepas recogidas, 35 se utilizaron para el trabajo de patogenia experimental y 15 se emplearon en experiencias previas, al objeto de poner a punto los métodos, siendo posteriormente desechadas.

3.1. RECOGIDA DE MUESTRAS Y SIEMBRA

De las 35 cepas estudiadas, 34 procedían de vagina y 1 de sedimento urinario.

Colocada la mujer en posición de litotomía, se introducía en vagina un espéculo estéril sin lubricar, y una vez visualizados el cuello uterino, fondos de saco y paredes vaginales, se realizaba la toma de secreción vaginal con ayuda de un asa de platino estéril. A continuación se depositaban dos gotas de esta secreción vaginal en un mismo portaobjetos, mezclando una de ellas con solución salina fisiológica y la otra con una gota de una mezcla formada a partes iguales de potasa al 10 % y tinta Parker azul super. Una vez colocados los cubreobjetos, se efectuaba un examen microscópico para determinar la existencia de tricomonas y/o levaduras. En caso de resultar positivo el examen para tricomonas, o en casos dudosos, se efectuaba una nueva toma de secreción vaginal, también con asa de platino, y se introducía cuidadosamente en un tubo de ensayo estéril, con el medio ya preparado, agitando a continuación para facilitar el desprendimiento y homogeneización de la mezcla. Estos tubos se habían conservado a la temperatura de 4°C, hasta 15 minutos antes de su utilización, en que se llevaban a una temperatura de 36-37°C, en la estufa de cultivos o en baño maría.

En ocasiones, sobre todo en los casos crónicos, se efectuó el examen colposcópico, que en algunos casos se complementó con una citología vaginal exfoliativa (Papanicolau), o un frotis teñido por el Giemsa diluido.

Cada muestra fue acompañada de una ficha confeccionada expresamente para estos casos.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

En los primeros intentos de aislamiento se utilizó el Trichomonas Medium (Oxoid), code n.º CM 161. Debido a que los resultados no fueron satisfactorios, se sustituyó en nuestros trabajos por el medio de KUPFERBERG, compuesto por los siguientes elementos:

Bacto-KUPFERBERG *Trichomonas* BASE:

Bacto-Tryptona	20	g
Bacto-Maltosa	1	g
Cisteína (clorhidrato)	1,5	g
Bacto-agar	1	g
Bacto-azul de metileno	0,003	g

Preparación:

Para rehidratar se disuelven 23,5 g en 950 ml. de agua destilada fría y se ayuda

su total disolución con el calor; se esteriliza en autoclave a 1 atmósfera de presión, durante 15 minutos; se enfría a 50°C y se añaden 50 ml. de suero bovino humano estéril; se mezcla hasta obtener una solución uniforme, adicionando 250 U.I. de penicilina y 1 mg. de estreptomina por ml. de medio, o bien 1 mg. de cloranfenicol por ml. de medio.

Este medio resultó útil para el aislamiento del protozoo, pero la multiplicación de tricomonas en los subcultivos no fue satisfactoria, por lo que se abandonó por el medio de DIAMOND, con el cual se obtuvieron excelentes resultados, tanto en lo que se refiere al aislamiento como para el mantenimiento de *T.v.*

El medio de DIAMOND consta de los siguientes componentes:

Tripticasa BBL	2	g
Extracto de levadura	1	g
Maltosa	0,5	g
Clorhidrato de L-cisteína	0,1	g
Acido ascórbico	0,02	g
Agar	0,05	g

Se añaden 90 ml. de agua destilada, llevándolo a pH 6 con ácido clorhídrico, se mezcla y agita, calentándolo hasta que se disuelve el agar.

Se lleva después al autoclave durante 10 minutos a 121°C. A continuación, se enfría en baño maría a 45-48°C añadiendo 10 ml. de suero bovino estéril, inactivado a 56°C durante 30 minutos. Posteriormente se añaden 100.000 unidades de penicilina y 0,1 g. de sulfato de estreptomina.

Por último, se transfiere el medio, en condiciones estériles, a tubos en los que se introducen 5 ml. de medio, y a frascos Pyrex con tapón de rosca, con 250 ml., y se conservan a 4°C; en estas condiciones se pueden mantener durante un mes, o quizás más, sin perder actividad sus componentes. Antes de su uso deben incubarse a 35-37°C durante 30-60 minutos.

3.3. MANTENIMIENTO

Una vez efectuada la siembra, se incuban a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, realizando una observación a las 24 horas con objeto de comprobar la multiplicación del protozoo. A las 48 horas se llevaba a cabo la primera resiembra, para lo cual, con ayuda de una pipeta estéril, se transferían 0,2-0,5 ml. de cultivo, tomados del tercio inferior de la columna líquida del medio, a un nuevo tubo, haciendo la siembra sobre la superficie del medio. Las resiembras sucesivas se realizaron también cada 48 horas, efectuando en cada una de ellas un examen microscópico en fresco para control de la actividad.

En determinadas circunstancias este ritmo de 48 horas se sustituyó por 24-72 horas, aunque consideramos, en general, que el momento óptimo para efectuar las resiembras es a las 48 horas. De esta manera, las cepas pudieron mantenerse du-

rante el tiempo necesario para la realización del presente trabajo. El número máximo de subcultivos fue de 176.

El principal inconveniente que se presentó para el mantenimiento de las cepas, fue la contaminación de los cultivos con hongos y levaduras. En caso de producirse esta contaminación, se añadía nistatina a la dosis de 300 unidades por ml. de medio, aunque el procedimiento más frecuentemente empleado en estos casos, fue el uso del tubo de CARNERI,¹⁵ que a la ventaja de su simplicidad, añade el obtener mejores resultados. Una modificación de dicho tubo realizada por nosotros, consistente en una disminución del calibre y en un alargamiento del mismo mediante una doble acodadura (fig. 1), permitió, no sólo eliminar las contaminaciones, sino también disminuir el número de resiembras al cambiar el ritmo de las mismas de 48 horas a 7-10 días.

3.4. PATOGENIA EXPERIMENTAL

3.4.1. Recuento

Para la obtención del número suficiente de protozoos, se efectuaba una siembra de 2 ml. de un subcultivo de 48 horas, en un frasco Pyrex, conteniendo 250 ml. de medio de Diamond; después de incubado a 37°C durante 48 horas, se sometía a control de vitalidad y pureza, mediante un examen microscópico en fresco y tinción por Gram. A continuación, se procedía a centrifugar el contenido del frasco, repartido en 4 tubos estériles de centrífuga de 12 × 3,5 cm., a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos. Decantando el líquido sobrenadante, se recogían los sedimentos obtenidos en los 4 tubos y se depositaban en un vaso de precipitados estéril, aforado a 100 ml.; a partir de este sedimento, se procedía a un recuento del número de células por medio de una cámara HAWKSLEY de recuento de protozoos. Cuando la concentración de *T.v.* era de 10⁷ por ml. aproximadamente, se procedía seguidamente a la inoculación al ratón.

3.4.2. Animales de experimentación

En todas las experiencias se emplearon ratones blancos, jóvenes, de unos 20 g. de peso, cepa Depar. Pat. Inf. y Parasit. ratones en reproducción endogámica, usándose indistintamente lotes de machos y hembras y mantenidos en jaulas de 20 a 25 individuos.

3.4.3. Experiencias previas

En primer lugar, se dispuso de un grupo de 25 ratones, aparentemente sanos, elegidos al azar, que fueron sacrificados inmediatamente, con el fin de conocer el estado normal de los órganos objeto de valoración posterior.

En una segunda fase, se utilizaron 4 lotes de 25 ratones cada uno. Los ratones del primer grupo fueron inyectados subcutáneamente en el dorso con 0,3 ml. de solución salina fisiológica con penicilina y estreptomycin a la dosis de 140.000 U.I. y 18 mg. por K. de peso respectivamente. A los ratones del segundo grupo, se les administró fenilbutazona en la proporción de 100 mg. por K. de peso (según CAMPBELL).¹³ El tercer grupo recibió betametasona en la proporción de 5 mg. por K. de peso, y el cuarto grupo, fue inyectado con hidrocortisona a la dosis de 50 mg. por K. de peso.¹³ En los tres últimos lotes se utilizó, como eluente básico de los fármacos administrados, la solución antibiótica usada en el primer lote. Este grupo fue inyectado durante 9 días con las mismas sustancias e idénticas dosis. Esta prueba tenía como finalidad determinar si la administración de estos fármacos producía alteraciones apreciables en los distintos órganos del ratón.

Como complemento de las pruebas anteriores, se dispuso otra experiencia en la que 103 ratones recibieron 0,7 ml. de medio de DIAMOND en inyección intraperitoneal. A continuación, se distribuyeron en 4 lotes; al primero, de 26 individuos, se le administró la solución antibiótica; al segundo, también de 26, fenilbutazona; al tercero, de 25, betametasona y a los 26 ratones restantes, hidrocortisona. Todo ello a las mismas dosis e idéntico ritmo que el anterior grupo. El objeto de esta prueba era comprobar si la adición del medio de cultivo, componente del inóculo, producía por sí mismo alteraciones en los órganos internos del ratón.

3.4.4. Proceder definitivo

3.4.4.1. Cepas aisladas recientemente

Se denominaron así aquellas cepas cuyo número medio de resiembras fue de 15,4 ± 1,4. Cada una de las 35 cepas de *T.v.* utilizadas en el presente trabajo, se probaron con grupos de 20 ratones divididos en lotes de 5 individuos, marcados con una solución de ácido pícrico, de acuerdo con un esquema convencional.

Cuando se pudo disponer de mayor número de ratones, se incluyeron en el grupo que fue inyectado con penicilina-estreptomycin (grupo control), y solamente en dos ocasiones en el grupo inyectado con betametasona.

A todos los ratones del grupo, y por medio de una jeringa automática, se les inoculó intraperitonealmente en el cuadrante inferior derecho de la pared abdominal, 10⁷ *T.v.* en un inóculo de 0,82 ± 0,05 ml. de medio de DIAMOND. A continuación se administró por vía subcutánea, a cada uno de los 4 lotes, la solución antibiótica, fenilbutazona, betametasona o hidrocortisona respectivamente, de acuerdo con las pautas seguidas en las experiencias previas.

El empleo de la solución antibiótica, tenía como finalidad evitar la infección asociada que podía alterar sustancialmente los resultados de la experiencia. El primer lote de 5 ratones, que sólo recibió antibióticos, sirvió, por tanto, como grupo control de patogenia de la cepa empleada.

En el segundo lote se empleó la fenilbutazona, fármaco no esteroide, de reconocida acción antiinflamatoria, pensando que su utilización podía modificar la calidad de las lesiones producidas por el protozoo. Esta acción se manifiesta, en los animales de experimentación, inhibiendo total o parcialmente los procesos inflamatorios experimentales agudos y crónicos. El mecanismo de acción parece ser directo sobre los tejidos inflamados, disminuyendo la permeabilidad capilar, muy posiblemente por su antagonismo con las quininas que producen vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar.⁷⁹

En el tercero y cuarto lotes se usaron dos sustancias esteroideas de acción antiinflamatoria: betametasona e hidrocortisona, respectivamente. La primera como representante de los glucocorticoides modificados y la segunda de los glucocorticoides naturales. Ambas hormonas poseen intensa acción antiinflamatoria, similar a su actividad glucocorticoide, pero la betametasona resulta 35 veces más potente que la hidrocortisona. El mecanismo de acción parece consistir en la supresión de la respuesta inflamatoria de los tejidos, especialmente el conectivo, inhibiendo la formación de fibroblastos y de tejido de granulación. Asimismo, empleadas a dosis muy elevadas, manifiestan una acción inmunosupresora por disminución de la producción de anticuerpos debida a la lisis de las células plasmáticas y de los linfocitos.⁷⁹

3.4.4.2. Cepas antiguas

De acuerdo con la metodología anterior también se ensayaron cepas mantenidas en el laboratorio mediante resiembras sucesivas en medio de DIAMOND. El número medio de las mismas fue de $115,4 \pm 10,0$. Estas cepas fueron tomadas al azar entre las utilizadas en la experiencia anterior.

3.4.5. Necropsia

Al décimo día se sacrificaba a los ratones supervivientes, mediante dislocación cervical, realizándose la necropsia a continuación. Asimismo, se realizó la necropsia de todos los ratones que murieron durante el transcurso de la experiencia. Una vez abierta la cavidad abdominal, se tomaban en consideración los siguientes datos:

- Existencia o no de ascitis.
- Necrosis en el punto de inoculación y peritoneo parietal.
- Necrosis de la grasa pélvica.
- Estado de las asas y meso intestinal.
- Estado del bazo.
- Estado del páncreas.
- Estado del estómago.
- Estado del hígado, con especial referencia al lóbulo de Spigelio.
- Estado del diafragma.

En caso de existencia de ascitis, se realizaba un examen en fresco del líquido, para comprobar la presencia de *T.v.* móviles y eventualmente una tinción por el método de Gram, al objeto de comprobar la flora asociada, si es que existía. Asimismo, en algunas ocasiones, se realizaban tomas de muestras de los órganos afectados para su ulterior estudio histopatológico.

3.4.6. Valoración de la patogenia

3.4.6.1. Lesiones en los distintos órganos.

Con objeto de cuantificar las lesiones de forma que los resultados pudieran ser sometidos a los correspondientes estudios estadísticos, se ha ideado un sistema en el que cada lesión observada ha recibido una valoración de acuerdo con su importancia. El criterio seguido ha sido el siguiente:

ASCITIS:

Líquido ascítico escaso (menos de 1 ml.)	1
Líquido ascítico en mediana cantidad (de 1 a 2 ml.)	2
Líquido ascítico abundante (más de 2 ml.)	3

PERITONEO Y GRASA PELVICA

Necrosis en punto de inoculación y/o necrosis puntiforme en número de 1 a 3 y/o asas intestinales dilatadas	1
Necrosis puntiformes múltiples (más de 3) y/o necrosis única de 3 a 5 mm. de ϕ	2
Necrosis múltiples de 3 a 5 mm. de ϕ y/o necrosis única de 5 a 10 mm. de ϕ	3
Necrosis extendida por toda la pelvis	4
Necrosis diseminadas en cavidad abdominal, afectando al meso intestinal y extendiéndose a la zona perirrenal	5

BAZO, PANCREAS Y ESTOMAGO

Necrosis puntiforme en número de 1 a 3, y/o ligera capa superficial de fibrina y/o modificaciones en el tamaño	1
Necrosis puntiformes múltiples (más de 3) y/o necrosis única de 3 a 5 mm. de ϕ	2
Necrosis única de 5 a 8 mm. de ϕ	3
Necrosis de 8 a 10 mm. de ϕ (afectando a más de un órgano)	4
Necrosis de 10 a 15 mm. de ϕ (englobando bazo, páncreas y estómago)	5

Necrosis mayores de 15 mm. de \emptyset (interesando bazo, páncreas, estómago, asas intestinales e hígado) 6

HIGADO

- A) Cara visceral
- Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 y/o fina capa superficial de fibrina sobre el lóbulo de Spigelio 1
- Necrosis de 3 a 5 mm. de \emptyset y/o necrosis parcial del lóbulo de Spigelio 2
- Necrosis de 5 a 8 mm. de \emptyset y/o necrosis total del lóbulo de Spigelio 3
- Necrosis de 8 a 10 mm. de \emptyset 4
- Necrosis afectando a la mayor parte de la superficie 5
- B) Cara diafragmática
- Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 y/o fina capa superficial de fibrina y/o alteraciones en la coloración del órgano 1
- Necrosis de 3 a 5 mm. de \emptyset y/o alteraciones intensas de color 2
- Necrosis de 5 a 8 mm. de \emptyset 3
- Necrosis de 8 a 10 mm. de \emptyset 4
- Necrosis intensa afectando a varios lóbulos 5
- Necrosis extendida a todos los lóbulos y afectando al diafragma 6

3.4.6.2. Mortalidad durante la experiencia

En el caso de que algún ratón muriera durante la experiencia, a la puntuación obtenida por las lesiones encontradas, se sumaba una cifra variable, según la fecha de la muerte.

Los ratones muertos en las primeras 48 horas no se tuvieron en consideración. Se partió del supuesto de que las muertes eran provocadas por accidentes post-inoculación (traumatismos, hemorragias, shock, etc.). A los muertos en el tercer día, con *T.v.* en líquido ascítico, se les dio la puntuación máxima (25 puntos), por considerar que esta cifra debería ser equivalente a la máxima teórica obtenida por lesiones en los distintos órganos, de un supuesto ratón que hubiera muerto al concluir los 10 días de la experiencia. Por cada día transcurrido sin producirse la muerte, se disminuyó esta valoración en 3 puntos, dando una cifra mínima de 4, para aquellos ratones aparecidos muertos al décimo día, fecha en que se sacrificaban los ratones supervivientes a la experiencia.

Día	Puntos
1	0
2	0
3	25
4	22
5	19
6	16
7	13
8	10
9	7
10	4

La cifra obtenida por cada ratón nos proporcionaba un valor numérico de la patogenia de cada cepa; la valoración definitiva se calculaba hallando la media de las cifras obtenidas dentro de cada grupo. Estas cifras quedaban reflejadas en unos esquemas, en los que sobre cada órgano del ratón se colocaban las puntuaciones correspondientes, según la intensidad de las lesiones (fig. 2).

3.4.7. Técnica histológica y fotográfica

El material utilizado para el estudio microscópico, fue fijado en una solución de formol al 10 %, con posterior inclusión en parafina o cortes por congelación, según los casos; en ambas circunstancias, se realizaron cortes de 8 μ aproximadamente. Se emplearon los siguientes métodos de tinción: hematoxilina férrica de Heidemhein y eosina, Sudán IV para grasas y Giemsa para tejidos.

Las fotomicrografías se hicieron con cámara Orthomat sobre microscopio Ortholux de Leitz y película Agfachrome 50 L profesional de 18 DIN, para fotografías en color y Agfa-Gevaert Copex de 9 DIN para blanco y negro. Las fotografías de las lesiones macroscópicas, se realizaron con película Panatomic-X Kodak de 14 DIN.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. EXPERIENCIAS PREVIAS

4.1.1. Necropsia de animales aparentemente sanos

El primer grupo de animales sacrificados constaba de 25 ratones aparentemente sanos, elegidos al azar, para que sirvieran de testigos. Como era de esperar, no se apreciaron alteraciones macroscópicas en los órganos objeto de valoración.

4.1.2. Inyección de los distintos fármacos

En la segunda experiencia, utilizamos cuatro grupos de 25 ratones cada uno, a los cuales se inyectó por vía subcutánea penicilina-estreptomina, fenilbutazona, betametasona o hidrocortisona, respectivamente. Al sacrificio de todos los individuos inyectados a los 10 días, la valoración de las lesiones observadas, arrojó las cifras medias siguientes:

Penicilina-Estreptomina	0,20 ± 0,08
Fenilbutazona	0,47 ± 0,3
Betametasona	0,60 ± 0,16
Hidrocortisona	2,52 ± 0,23

Como puede observarse, aunque las lesiones han sido muy escasas, salvo para la hidrocortisona, se aprecian diferencias muy acusadas para los distintos fármacos estudiados. Con objeto de conocer si estas diferencias eran significativas, se realizó un análisis de la varianza, cuyo resumen aparece en el Cuadro I.

CUADRO I

Análisis de la varianza de las cifras correspondientes a los ratones que recibieron los fármacos aisladamente.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Grupos	3	84	28
Individuos	96	63	0,6
Totales	99	147	

F = 46,6 (p < 0,01)

El valor de F = 46,6, nos indica que existen diferencias altamente significativas (p < 0,01) entre las cifras de valoración de las lesiones producidas por los distintos fármacos probados. Calculado el intervalo fiducial para t 0,05 $\bar{s}x$, se obtuvo una cifra de 0,06, lo que nos indica que las diferencias existentes entre los cuatro grupos son significativas.

4.1.3. Administración de fármacos más inoculación de medio de cultivo

Continuando el esquema trazado, el paso siguiente, como ya hemos indicado, consistió en la inyección intraperitoneal del medio de cultivo empleado para el mantenimiento de *T.v.* (medio de DIAMOND), a cuatro grupos de ratones a los que se administró simultáneamente los cuatro fármacos anteriormente citados. En principio podía pensarse que la introducción en la cavidad peritoneal, de cualquier sustancia (aunque fuera inerte y estéril) pudiera producir alguna lesión de tipo irritativo en relación con la absorción de dicha sustancia a través de la serosa peritoneal.

La valoración de las lesiones presentadas en los ratones, dio lugar a las cifras medias que se indican a continuación:

Antibióticos + medio	0,23 ± 0,08
Fenilbutazona + medio	0,42 ± 0,11
Betametasona + medio	0,64 ± 0,12
Hidrocortisona + medio	3,42 ± 1,10

Al igual que sucedió en la prueba anterior, las lesiones producidas al inyectar los fármacos más el medio de cultivo, también han sido muy escasas. Si se comparan estas cifras con las anteriores, puede apreciarse un evidente paralelismo entre las obtenidas para cada fármaco, sin que parezca que haya existido un efecto negativo apreciable por la adición intraperitoneal de medio. En el caso de la inyección de medio más antibióticos, y medio más betametasona, se ha producido un ligerísimo aumento de las lesiones; este aumento ha sido más acusado en el caso de la hidrocortisona. Por el contrario, al inyectar fenilbutazona más medio, se ha producido una pequeñísima disminución de las mismas. En cualquier caso, las diferencias obtenidas para los distintos fármacos, justifica la realización de un análisis de la varianza, cuyo resumen figura en el Cuadro II.

CUADRO II

Análisis de la varianza de las cifras correspondientes a los ratones que recibieron los fármacos más el medio de cultivo.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Grupos	3	176	58,6
Individuos	99	818	8,2
Totales	102	994	

F = 58,6 : 8,2 = 7,1 (p < 0,01)

El valor obtenido para F, nos indica que existen diferencias significativas (p < 0,01) entre las cifras comparadas. El intervalo fiducial para t 0,05 $\bar{s}x$ fue de 0,20, lo que señala que existen diferencias entre el grupo de hidrocortisona más medio, y todos los demás, y entre el de antibióticos más medio, y betametasona más medio. El error standard correspondiente al grupo de hidrocortisona más medio resultó muy superior al de los otros grupos, debido fundamentalmente a la muerte de dos ratones durante el transcurso de la experiencia. Estas muertes, han sido interpretadas como producidas por la acción directa de las sustancias empleadas.

4.1.4. Análisis de los resultados de ambas experiencias

Si se comparan los resultados obtenidos en las valoraciones de las lesiones observadas en los ratones inyectados con los fármacos solos y en los ratones in-

yectados con los fármacos más el medio, se puede apreciar la existencia de un efecto ligero, pero bastante constante, sobre el aumento de las lesiones en el grupo de ratones inyectados intraperitonealmente con medio. Para aclarar este aspecto, se ha realizado un análisis de la varianza que ha incluido las cifras correspondientes a los 8 grupos de ratones citados, y cuyo resumen aparece en el Cuadro III.

CUADRO III

Análisis de la varianza de las cifras correspondientes a los ratones que recibieron los fármacos solos y los fármacos más el medio de cultivo.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Grupos	7	264	37,7
Individuos	195	880	4,5
Totales	202	1.144	

$$F = 37,7 : 4,5 = 8,3 \quad (p < 0,05)$$

El valor de $F = 8,3$ señala que existen diferencias significativas entre las cifras comparadas. El intervalo fiducial obtenido para t 0,05 \bar{s}_x fue de 0,19 lo que nos indica que los ratones de los grupos inyectados con antibióticos solos y antibióticos más medio, pertenecen a la misma población estadística que fenilbutazona sola y con medio. Los grupos de betametasona, sola y con medio, pertenecientes a la misma población, se diferencian estadísticamente del de los antibióticos solos. A su vez, los animales del grupo de betametasona sola pertenecen a la misma población que los de antibióticos más medio y los de fenilbutazona sola y con medio. Por el contrario, el grupo de la betametasona más medio se diferencia del de antibióticos con medio, perteneciendo a la misma población de los ratones que recibieron fenilbutazona, sola y con medio. Queda, por último, el grupo de los ratones inyectados con hidrocortisona, sola y con medio, los cuales son diferentes no solamente entre sí, sino también con el resto de los grupos.

Estos resultados parecen indicar que la inyección del medio de cultivo no ha dado lugar a la producción de lesiones en los ratones. La diferencia hallada para los grupos en los que se inyectó hidrocortisona ha sido debida según se ha indicado, a la muerte de dos ratones en el grupo que incluyó el medio, lo cual ha determinado que la valoración media de las lesiones haya sido muy superior al resto de los grupos.

4.2. PROCEDER DEFINITIVO

4.2.1. Valoración de la patogenicidad de las 35 cepas de *T.v.*

Una vez realizadas estas pruebas previas, se procedió a llevar a cabo la fase experimental con *T.v.*

En el Cuadro IV figuran los resultados obtenidos al inyectar a los ratones las 35 cepas de *T.v.* acompañadas de los correspondientes fármacos.

CUADRO IV

Resultados obtenidos al inyectar a los ratones las 35 cepas de *T.v.* (Valoración de la patogenicidad de acuerdo con el baremo de lesiones).

CEPAS	FARMACOS			
	Antibióticos	Fenilbutazona	Hidrocortisona	Betametasona
A	9,5	8,2	6,2	2,8
1.146	25,5	18,4	20,2	16,2
CI	9,6	12	13,2	8,2
EF	15,2	18	22	15,8
CII	18	20,4	12,6	11,6
JU	13,6	24,2	13,6	24,2
RI	16,4	20	25,4	10,8
JG	29,2	33,8	23,4	23,2
MM	4	2,2	6,4	3,8
MC	7	9,8	4,6	1,6
NP	2,8	4,6	3,8	3,4
PP	23,8	24,8	22	26,6
CL	9	9	3,6	7,2
JG ²	4,2	7,2	7,6	4,2
NC	15	14,2	9,4	15,8
CA	17	15,8	17	12,6
CV	18,2	18,4	14,8	13,4
SA	19,8	19,6	3,4	17
JG ₃	11,4	14,8	3	9,8
MS	27,4	31,2	14,8	19
CS	26,2	27,8	13,4	17,4
CR	31	33,2	16,4	15
AR	6	11,4	2,4	6,8
EFE	25,4	28,2	22	19,2
MS ₂	20	18	10,6	12,8
AM	14,6	16,2	3	9,6
CC	3,2	4	2,8	0,6
PI	22,8	27,6	9,4	23,2
MLL	3,4	1,2	2,6	0,6
MA	2	3,2	4	2,2
I	18,2	19	16	13
6	25,6	—	—	14,3
18	16,1	—	—	18
1.536	21,6	—	—	12,6
1.346	12,5	—	—	7,8

En el Cuadro IV se observan diferencias notables en la patogenicidad de las distintas cepas de *T.v.*, tanto en los distintos grupos, como dentro de cada grupo experimental.

4.2.1.1. Análisis de la patogenicidad en la inyección simultánea de distintas cepas de *T.v.* más los fármacos probados

Como complemento del apartado anterior, parece conveniente estudiar, en primer lugar, lo que ocurre dentro de cada grupo, como paso previo al estudio del conjunto de lotes experimentales. Así, pues, se ha analizado la varianza para las cifras de patogenicidad obtenidas con cada grupo de ratones, que recibieron los distintos tratamientos. En los Cuadros V, VI, VII y VIII, figuran los resúmenes de los análisis de la varianza correspondiente a cada grupo.

CUADRO V

Análisis de la varianza de las cifras de patogenicidad correspondientes a los ratones que recibieron las distintas cepas de *T.v.* más los antibióticos.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Grupos	34	13.444	395,4
Individuos	174	6.749	38,7
Totales	208	20.193	

$$F = 10,2$$

CUADRO VI

Análisis de la varianza de las cifras de patogenicidad correspondiente a los ratones que recibieron las distintas cepas de *T.v.* más fenilbutazona.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Grupos	30	12.636	421,2
Individuos	124	4.100	33,0
Totales	154	16.736	

$$F = 12,7$$

CUADRO VII

Análisis de la varianza de las cifras de patogenicidad correspondientes a los ratones que recibieron las distintas cepas de *T.v.* más betametasona.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Grupos	34	8.668	254,9
Individuos	145	3.508	24,1
Totales	179	12.176	

$$F = 10,5$$

CUADRO VIII

Análisis de la varianza de las cifras de patogenicidad correspondientes a los ratones que recibieron las distintas cepas de *T.v.* más hidrocortisona.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Grupos	30	7.742	258,0
Individuos	124	4.007	32,3
Totales	154	11.749	

$$F = 7,9$$

Los valores hallados para F en cada uno de los grupos, indican que existen diferencias altamente significativas en la patogenicidad producida por las distintas cepas dentro de cada grupo. Por carecer de interés, no se ha determinado, en este caso, el intervalo fiducial correspondiente a cada grupo, ya que las diferencias entre cepas iban a ser muy numerosas y carentes de significado, dentro del contexto de este trabajo.

Como ejemplo de las diferencias expresadas anteriormente, se presenta la cepa CR que dio la patogenia más alta (31) de las probadas en el presente trabajo; y la cepa MA que correspondió a la de patogenia más baja (2).

4.2.2. Relación entre la patogenia experimental y el cuadro clínico

No obstante, y a la vista de estos resultados, se ha intentado dar un paso más y se ha tenido presente la posibilidad de la existencia de relación entre la patogenicidad en el ratón y la clínica de la tricomoniasis. En el momento de la recogida de las cepas se tuvo presente si la paciente presentaba síntomas agudos o crónicos de la enfermedad. Por ello, dentro de cada grupo experimental, se han formado dos subgrupos con las cepas obtenidas de mujeres con sintomatología aguda o crónica, que se han comparado entre sí. En esta ocasión, la prueba de la significación se realizó por la t de Student, y las cifras obtenidas figuran en el Cuadro IX.

CUADRO IX

Valores de t obtenidos al comparar las cepas procedentes de mujeres con síntomas agudos o crónicos dentro de cada grupo experimental.

Antibióticos	t = 0,34 (no significativo)
Fenilbutazona	t = 1,08 »
Betametasona	t = 1,34 »
Hidrocortisona	t = 0,70 »

Los valores obtenidos para t en las cuatro comparaciones realizadas no han sido significativos en ningún caso, lo cual parece indicar que la sintomatología de la tricomoniasis uro-genital en la especie humana no guarda relación con las lesiones producidas al inyectar intraperitonealmente al ratón las cepas de *T.v.* acompañadas de los fármacos utilizados en estas experiencias. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por IVEY y HALL (cit. por JIROVEC y col.)⁶³ y, en cambio, difieren de los obtenidos por BOGOVSKY y TERAS¹⁰ y REARDON y col.¹⁰² En relación con los primeros autores, estimamos que la diferencia obtenida pudiera deberse a la clasificación clínica de las pacientes, divididas por estos autores en:

- Agudas
- Subagudas y
- Crónicas

Consideramos que esta clasificación resulta artificiosa, por la dificultad de encuadrar adecuadamente las colpitis subagudas, y así resultaría que las pacientes incluidas por ellos en este grupo, corresponderían, en nuestra clasificación, unas veces al apartado de las colpitis agudas y en otras ocasiones al de las crónicas. Asimismo, también difiere la valoración de la patogenia de las cepas, ya que dichos autores la dividen en tres grupos: alta, media y baja, lo cual aumenta el confusiónismo, pues el grupo de alta patogenia estaba integrado, en su mayoría, no sólo por cepas de *T.v.* procedentes de pacientes con colpitis agudas, sino también de subagudas.

Por lo que se refiere al trabajo de REARDON y col.,¹⁰² realizado con 13 cepas procedentes de mujeres con diversa sintomatología, hay que tener en cuenta, en primer lugar, que las cepas antes de ser probadas fueron mantenidas mediante subcultivos en el laboratorio durante un período de tiempo que osciló entre 3 meses y 2 años. Dado que el envejecimiento de las cepas por sucesivos subcultivos produce una disminución en la patogenia experimental, como se comprueba en el Cuadro XI, no es extraño que la cepa R, probada después de dos años en el laboratorio, haya sido la menos patógena de todas, al margen de las circunstancias clínicas de la paciente. Por otra parte, aunque admiten alguna correlación entre la patogenia natural y la experimental, reconocen que en cada caso clínico hay que tener en cuenta, no sólo la virulencia de la cepa, sino también la resistencia individual del hospedador. Ahondando en esta opinión, pensamos que existen factores tales como nivel hormonal, flora vaginal asociada, tratamientos previos, etc., que condicionan en gran manera la patogenia natural de las cepas.

Como prueba de esta falta de correlación entre patogenia experimental y cuadro clínico, presentamos dos ejemplos muy demostrativos. La cepa 1.146 correspondió a una mujer portadora de una colpitis crónica y cuya cifra de patogenia experimental fue de 25,5. Por el contrario, la cepa MM perteneció a una paciente con una colpitis aguda y sintomatología florida y en la que, sin embargo, la cifra de patogenia encontrada fue solamente de 4.

4.2.3. Estudio comparativo de los cuatro grupos experimentales

Estudiadas las diferencias existentes dentro de cada grupo, resta ahora comparar las cifras correspondientes a los cuatro grupos experimentales. Con este fin se ha realizado un análisis de la varianza cuyo resumen figura en el Cuadro X.

CUADRO X

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Grupos	3	4.998	1.666,0
Individuos	695	62.378	89,7
Totales	698	67.376	

$$F = 18,5$$

El valor de $F = 18,5$ indica que existen diferencias altamente significativas en la patogenia de las cepas en los distintos grupos. Calculando el intervalo fiducial para t $0,05$ $s\bar{x}$ se obtiene un valor de 1,13 que señala que los grupos de betametasona e hidrocortisona pertenecen a la misma población estadística y se diferencian significativamente de los grupos de antibióticos y fenilbutazona, que también pertenecen a una misma población. En el Cuadro IV pueden observarse las cifras medias correspondientes a la valoración de las lesiones de los ratones de cada uno de los grupos. A la vista de estos resultados puede pensarse que la fenilbutazona carece de efecto sobre la patogenia de *T.v.*, en tanto que la betametasona y la hidrocortisona impiden, hasta cierto grado, la presentación de lesiones en los órganos internos del ratón. Por lo que se refiere al grupo de la hidrocortisona, nuestros resultados no coinciden con los obtenidos por JEFFRIES y col.,⁶² quienes apreciaron un aumento de las lesiones cuando se administraba cortisona al ratón.

4.2.4. Patogenicidad de las cepas aisladas recientemente y de las antiguas

Un aspecto muy interesante que también ha sido considerado, es el que se refiere a la conservación del grado de patogenia tras una serie de pases en los medios de cultivo. En este trabajo se han utilizado cepas aisladas recientemente y cepas mantenidas en el laboratorio tras un número elevado de subcultivos. Tanto las cepas aisladas recientemente como las antiguas, se inyectaron a los ratones en las mismas condiciones que en las pruebas anteriores, es decir, acompañadas de los antibióticos o de los fármacos ya indicados. Las cifras de patogenia obtenidas con las cepas recientes y antiguas, con los distintos tratamientos, figuran en el Cuadro XI.

En el Cuadro XI se aprecia un descenso muy notable en las cepas antiguas con relación a las aisladas recientemente que llega a representar hasta un 40,2 % en el

CUADRO XI

Patogenicidad de las cepas aisladas recientemente y antiguas.

	Recientes	Antiguas	Descenso de la patogenicidad
Antibióticos	14,05 ± 1,16	5,04 ± 0,56	35,8 %
Fenilbutazona	15,50 ± 1,31	5,40 ± 0,46	34,8 %
Betametasona	11,43 ± 1,16	3,04 ± 0,34	26,5 %
Hidrocortisona	12,72 ± 1,20	5,12 ± 0,60	40,2 %

caso de la hidrocortisona. El descenso menor (26,5 %) ha correspondido a la patogenicidad presentada por los ratones que recibieron las cepas de *T.v.* acompañadas de betametasona, si bien en términos absolutos, dichos ratones han sido los menos afectados, tanto usando cepas aisladas recientemente como antiguas.

Esta disminución de la patogenicidad fue, lógicamente, más acusada cuando se probaron cepas de patogenicidad alta, que cuando se utilizaron de patogenicidad más débil. La cepa JG, aislada recientemente, alcanzó una patogenicidad experimental de 29,2 que después de 145 subcultivos descendió, en la segunda prueba, a 1,8, diferencia, como se ve, muy acusada. La cepa MC, por el contrario, obtuvo en la primera prueba una patogenicidad de 7 que, en la segunda, después de 98 pases, sólo descendió a 4,8.

Para comparar estadísticamente estos resultados, dentro de cada grupo de ratones tratados, se ha realizado una prueba de significación por medio de la t de Student, para comparar la patogenicidad de las cepas aisladas recientemente y de las antiguas. En los cuatro casos las diferencias han sido altamente significativas ($p < 0,001$), y los valores obtenidos para t figuran en el Cuadro XII.

CUADRO XII

Valores obtenidos para t al comparar la patogenicidad de las cepas recientes y antiguas dentro de cada grupo.

Antibióticos	t = 6,9 (p < 0,001)
Fenilbutazona	t = 7,7 (p < 0,001)
Betametasona	t = 7,6 (p < 0,001)
Hidrocortisona	t = 5,8 (p < 0,001)

Esta pérdida de la patogenicidad después de reiterados subcultivos ya había sido señalada por HONIGBERG y col.⁵⁴ y posteriormente por el mismo HONIGBERG,⁵³ inoculando *T.v.* por vía subcutánea. Asimismo LINDGREN y col.⁷⁸ LAAN⁷³ y GOBERT y col.⁴³ comprobaron este mismo efecto empleando la vía intraperitoneal. En nuestro caso, las diferencias de patogenicidad han sido muy notables y concuerdan con los resultados de los autores citados anteriormente.

4.2.5. Patogenicidad residual de *T.v.*

Como una observación al margen del contexto general, puede indicarse la relativa uniformidad de la patogenicidad residual de las cepas. Salvo en el caso de la betametasona, las cifras absolutas han resultado ser muy semejantes. Esto pone en evidencia la necesidad de realizar las pruebas de patogenicidad experimental de *T.v.* con cepas aisladas recientemente, para evitar el descenso de patogenicidad o, en su defecto, exaltar previamente su virulencia mediante pases en el ratón,⁷³ inoculación de hematíes de pollo,^{41,59} adición de un homogenizado de flagelados de distintas cepas⁴³ o por el procedimiento que se estime más oportuno.

4.2.6. Análisis de la mortalidad en los distintos grupos

En el Cuadro XIII figuran las cifras relativas al número de ratones empleados y al de muertos en los distintos grupos.

CUADRO XIII

Mortalidad en los distintos grupos

	Antibióticos	Fenilbutazona	Betametasona	Hidrocortisona
Número ratones	209	155	180	155
Muertos	89 42,5 %	70 45,1 %	36 20 %	65 41,9 %

Como vemos en el cuadro anterior, el número de ratones muertos es muy semejante (42,5; 45,1 y 41,9 %) en los grupos que recibieron antibióticos, fenilbutazona e hidrocortisona, en tanto que con la betametasona el número de bajas se ha reducido aproximadamente a la mitad.

4.2.7. Comparación de los valores asignados por la muerte y lesiones en los distintos órganos.

Como complemento al apartado anterior, se incluye un cuadro en el que figuran los datos referentes a la localización de las lesiones en los ratones inoculados con las cepas de *T.v.* y su comparación con los valores asignados por la muerte. Además, las distintas cifras se expresan como porcentajes del total dentro de cada grupo.

La observación del Cuadro XIV es muy ilustrativa. La inferior valoración de las muertes en el grupo de la betametasona, se produce por llegar un mayor número de ratones vivos al final de la experiencia. Esta circunstancia permite que se desarrollen las lesiones con mayor intensidad y naturalmente, los valores relativos

CUADRO XIV

Valoración por muerte y por lesiones en los distintos órganos.

	Antibió- ticos		Fenilbuta- zona		Betameta- sona		Hidrocor- tisona	
Muerte	935	28 %	829	31,7 %	342	15,6 %	695	39,4 %
Ascitis	261	7,8 %	180	6,9 %	197	8,9 %	126	7,1 %
Grasa pélvica y peritoneo	442	13,2 %	327	12,5 %	308	14 %	177	10 %
Bazo y páncreas	638	19,1 %	473	18,1 %	488	22,2 %	258	14,6 %
Hígado	1053	31,6 %	798	30,6 %	855	39 %	508	28,7 %

de las lesiones de los distintos órganos, serán superiores a los encontrados en los restantes grupos.

En cualquier caso, la tendencia de la localización de las lesiones se mantiene paralela en todos los grupos, siendo el órgano más afectado el hígado, seguido de bazo y páncreas, peritoneo y grasa pélvica. La ascitis acusó la menor valoración.

CUADRO XV

Número de ratones vivos, lesiones totales por grupo y número medio de las lesiones por ratón.

	Antibió- ticos	Fenilbuta- zona	Betameta- sona	Hidrocor- tisona
N.º de ratones vivos	119	85	144	90
Lesiones totales	2.394	1.778	1.848	1.069
M. de lesiones por ratón	20,1	20,9	12,8	10,8

4.2.8. *Análisis del número de ratones vivos al final de la experiencia y valoración de sus lesiones.*

El Cuadro XV confirma lo apuntado para el Cuadro XIV. En efecto, si no se tienen en consideración los ratones muertos y, por tanto, la valoración de las muertes, las cifras de la patogenia referidas a los distintos órganos se hacen muy semejantes para todos los grupos. Hay que hacer constar que la betametasona y la hidro cortisona parecen impedir la presentación de lesiones, ya que el número medio de lesiones por ratón en estos dos grupos es, aproximadamente, la mitad que en los otros dos.

Como puede apreciarse en el Cuadro XVI, la mayor parte de las lesiones (cerca del 50 %) asientan en el hígado, seguidas de bazo y páncreas (25 % aproximadamente). Las lesiones macroscópicas, encontradas en los distintos órganos, coin-

CUADRO XVI

Valoración de las lesiones de los distintos órganos en los ratones vivos.

	Antibió- ticos		Fenilbuta- zona		Betameta- sona		Hidrocor- tisona	
Ascitis	261	10,9 %	180	10,1 %	197	10,6 %	126	11,7 %
Grasa pélvica y peritoneo	442	18,4 %	327	18,3 %	308	16,6 %	177	16,5 %
Bazo y páncreas	638	26,6 %	473	26,6 %	488	26,4 %	258	24,1 %
Hígado	1.053	43,9 %	798	44,8 %	855	46,2 %	508	47,5 %

ciden con las descritas por SCHNITZER y col.,¹⁰⁷ BOGOVSKY y TERAS,¹⁰ HONIGBERG (cit. por JIROVEC y PETRU),⁶³ LAAN⁷³ y GOBERT y col.,⁴² entre otros autores.

4.2.9. *Análisis de cepas de T.v., procedentes de la misma paciente en distintas épocas*

Las cepas JG, JG2 y JG3, así como la MS y MS2, procedían respectivamente, de dos pacientes en épocas distintas. En el primer caso se trataba de una mujer casada, de 33 años y en gestación de un mes. Como antecedentes de interés, figuraba una tricomoniasis en los primeros meses de una gestación anterior, que fue tratada con metilmercadona y que terminó en un parto inmaduro de 5 meses y medio. Posteriormente, se pudo determinar, en un examen en fresco, la persistencia de los tricomonas. En el caso presente fue tratada con metilmercadona, en aplicación vaginal únicamente. La patogenia de esta cepa fue de 29,2. La segunda cepa, JG2, se obtuvo al 7.º mes de gestación, es decir, 5 meses y medio después de la JG. La paciente presentaba una sintomatología aguda y en la siembra efectuada en medio de Diamond, se comprobó crecimiento simultáneo de tricomonas y hongos levaduriformes, por lo que se instauró un tratamiento simultáneo, para ambos cónyuges, con metronidazol y nistatina. La patogenia que se obtuvo fue de 4,2 solamente. Al 8.º mes de gestación, 40 días después de la segunda toma, el examen en fresco del exudado vaginal fue positivo para T.v., cepa JG3 y la patogenia, en este caso, alcanzó un valor intermedio de 11,4.

Las diferencias son suficientemente expresivas, y nos permiten sacar algunas conclusiones, concordantes por completo con las obtenidas por REARDON y col.¹⁰² en un caso similar al nuestro. En primer lugar, pudiera tratarse de cepas distintas, hipótesis muy sugestiva a la vista de la historia clínica. En segundo lugar, hay que considerar la posible alteración del poder patógeno producida por los tratamientos, insuficiente en el primer caso, pero justificado por el tiempo del embarazo, y correcto en la segunda ocasión. Por último, a las anteriores hipótesis, habría que añadir la reacción inmunitaria del hospedador responsable de las variaciones en la patogenia de las cepas.

En el segundo caso, la cepa MS se obtuvo de una paciente con colpitis aguda el 1 de febrero de 1972, y la segunda cepa MS2, el 16 de marzo del mismo año, después de un tratamiento de ambos cónyuges con metronidazol. La cepa MS alcanzó una patogenicidad de 27,4 y la MS2 de 20. Dado el escaso tiempo transcurrido entre ambas tomas, resulta posible se trate de la misma cepa, y la pérdida de patogenicidad que se produjo, verosímilmente, sería debida exclusivamente a efectos del tratamiento.

4.2.10. Anatomía Patológica

4.2.10.1. Examen macroscópico

A los pocos días de inoculación con *T.v.*, los ratones experimentaban una clara pérdida de la vivacidad, al mismo tiempo que desaparecía el aspecto lustroso de la piel. Más tarde, algunos ratones acusaban distensión abdominal, como consecuencia de la presencia de líquido ascítico. Los ratones que llegaban al final de la experiencia con lesiones macroscópicas bien establecidas, presentaban un abdomen típicamente en «batación». Los grupos inyectados con corticoides adelgazaban progresivamente, admitiendo como posible causa el efecto secundario del tratamiento, siendo más acusado este adelgazamiento en los ratones tratados con hidrocortisona.

En ocasiones en que parte del inóculo, por defecto de técnica, se había depositado en el tejido celular subcutáneo, se observaba la aparición de un absceso más o menos voluminoso, de acuerdo con la cantidad de inóculo vertido y la virulencia de la cepa.

Durante la necropsia, al abrir la cavidad abdominal, era frecuente apreciar en el peritoneo parietal, una formación blanquecina del tamaño aproximado de una lenteja, coincidente con el punto de inoculación. Por las características morfológicas de la lesión, así como por su localización, pensamos se trataba de un foco de necrosis por coagulación (fig. 3).

La lesión que encontramos con más frecuencia, en la cavidad abdominal, fue una peritonitis exudativa, que afectaba tanto al peritoneo parietal como al visceral. El exudado presentaba características variables; unas veces era francamente seroso, otras serofibrinoso, y claramente hemorrágico o purulento en aquellos ratones que habían sido inyectados con cepas de mayor poder patógeno. Se realizaron frotis a partir del exudado y se examinaron con microscopio de contraste de fases, hallándose gran cantidad de tricomonas, de morfología variable, pero diferente a la presentada en los medios de cultivo.

Los órganos abdominales, en general, aparecían cubiertos por copos de fibrina, cuya extensión y distribución era variable. Así encontrábamos, en la serie de necropsias realizadas, depósitos de fibrina en órganos genitales y grasa pélvica, que en casos de mayor intensidad, se extendían por toda la pelvis, incluso por la masa intestinal, donde se originaban grandes abscesos recubiertos por asas intestinales adheridas.

Las superficies del bazo y páncreas, ostentaban a menudo formaciones fibrinosas de aspecto irregular, se extendían a la cara anterior del estómago y al lóbulo izquierdo del hígado, sobre cuyas estructuras se adherían las primeras porciones del intestino delgado. Dada la frecuencia de su aparición, así como las características morfológicas de esta última lesión, se considera como típica de la inoculación intraperitoneal con *T.v.* (fig. 4).

Una de las lesiones de mayor interés, encontradas en las distintas necropsias realizadas, son los focos necróticos localizados en la superficie del hígado. En los casos leves, la necrosis se manifestaba con formaciones puntiformes perfectamente delimitadas y rodeadas por un halo hiperémico, localizadas en alguno de los lóbulos hepáticos, siendo el de Spigelio, casi siempre, el más precozmente afectado. En casos de mayor intensidad, los focos de necrosis no solamente se localizaban en la superficie del órgano, sino que afectaban igualmente al parénquima, como demostraba el examen de los cortes del hígado en distintos planos. La morfología de la zona de necrosis era variable, siendo generalmente irregular, con bordes definidos y una zona central amplia, de color blanquecino-amarillento, rodeada por una estrecha franja de color más oscuro, la cual se extendía en forma de «mancha de aceite», partiendo del hilio y afectando por lo general a varios lóbulos. En casos extremos, la necrosis afectaba prácticamente a toda la superficie del órgano, extendiéndose incluso hasta la cara inferior del diafragma (figs. 5 y 6).

Los riñones y anterreñales no solían estar afectados; cuando se observaban lesiones macroscópicas en estos órganos, eran originadas por extensión de las existentes en el peritoneo parietal y propagadas por contigüidad.

Además de las lesiones citadas, en algunos casos observamos atrofia o hipertrofia del bazo y páncreas, así como modificaciones en la coloración de los mismos. En ocasiones, el páncreas perdía su color rosado normal, tornándose blanquecino. Esta circunstancia era frecuente en los ratones inyectados con hidrocortisona. Asimismo, el hígado experimentaba frecuentemente importantes cambios de coloración, ofreciendo un tono pálido, o color grisáceo-amarillento. Otras veces, juntamente con la decoloración del órgano, destacaba el dibujo lobulillar, ofreciendo el hígado, en conjunto, un aspecto que recordaba al de «nuez moscada».

4.2.10.2. Examen microscópico

En relación con los hallazgos de necropsia, se estudiaron microscópicamente las lesiones de los órganos susceptibles de valoración.

Los órganos remitidos para el estudio microscópico de las lesiones, en relación con la intensidad y frecuencia de las mismas, fueron: hígado, riñón, adrenales, bazo, páncreas y ganglios linfáticos.

En el *hígado*, la lesión más importante por su frecuencia fue la *necrosis focal*. Los focos de necrosis adoptan una disposición especial, observándose en ellos tres zonas bien definidas:

Zona central, constituida por un conglomerado de células hepáticas en estado de necrosis por coagulación, que yacen en el seno de una sustancia hialina conteniendo células mesenquimatosas, entre las que abundan los polimorfonucleares neutrófilos, células plasmáticas y linfocitos.

Zona media, constituida por un espacio hialino, ocupado por un líquido inflamatorio seroso y algunas células, en su mayoría polimorfonucleares neutrófilos y linfocitos.

Zona externa, constituida por un tejido hepático, en la que las células más internas y en contacto con la zona media, presentan signos de necrosis por coagulación. Los núcleos, muy picnóticos, hacen que esta zona sea intensamente basófila, pareciendo constituir como una valla. Contribuye al aumento de la basofilia, la existencia, en la porción interna de esta zona, de células inflamatorias (fig. 7).

Solamente en uno de los hígados estudiados microscópicamente, se han encontrado, en la porción más periférica de los *focos de necrosis*, estructuras con características histológicamente semejante a los tricomonas, por lo que se considera, dada su similitud, que se trata de lesiones descritas por otros autores¹⁰ bajo el epígrafe de *granuloma o absceso tricomonádico*. Fuera de estos focos de necrosis y en pleno parénquima hepático, aparentemente sano, se encontraron abundantes tricomonas de diversa localización, tal como entre los conductos biliares intrahepáticos, en los espacios porta y alrededor y dentro de los elementos vasculares (figs. 8 y 9).

La segunda lesión más frecuentemente observada, fue la *degeneración grasa*, la cual, según la marcha de la investigación, ofrecía distintos períodos, desde el inicial de *esteatosis centroacinosa*, hasta hígados que ofrecían el cuadro de una *esteatosis generalizada*. Esta última forma, se asociaba con alguna frecuencia, con *degeneración hialina subcapsular* (fig. 10). En otras ocasiones, se encontró «*balonización*» de las células medio-lobulillares (fig. 11).

La última lesión que se ha apreciado, y que apareció una sola vez, fue una *congestión con ictericia*.

En el *riñón*, donde las lesiones se prodigaban con cierta frecuencia en las necropsias realizadas, la lesión microscópica más frecuente fue la de una *congestión*, más acentuada en la porción cortical que en la medular; en ocasiones, concomitante a la congestión, existía una *tumefacción turbia* del segmento principal de la nefrona y en otras, una *esclerosis* incipiente.

En las *adrenales*, que en la necropsia aparecían ligeramente hipertrofiadas, no se encontró lesión histológica de ningún tipo, excepto en un caso con proceso de *congestión aguda*.

En el *bazo*, las lesiones observadas, se traducían en una *congestión con metaplasia* de los elementos mieloides y en *periesplenitis fibrinosa*.

En el *páncreas*, las lesiones encontradas fueron de una *pancreatitis crónica* con focos de necrosis, abundantes y extensos. Aparecían claramente rodeados por una cápsula de naturaleza conjuntiva. En el interior del foco, en el seno del tejido

necrosado, existían, principalmente, células mesenquimatosas, polimorfonucleares neutrófilos y linfocitos.

Las lesiones pancreáticas, en especial las de tipo necrótico, tienen una gran semejanza con las lesiones de *necrosis hepática*.

En los *ganglios linfáticos*, se han observado lesiones de *adenitis aguda difusa*, con la estructura ganglionar muy alterada. Al lado de una gran hipertrofia de los folículos linfoides, el resto del parénquima ganglionar aparecía destruido y sustituido por células inflamatorias, entre las cuales era posible observar estructuras con aspecto semejante a tricomonas.

Otros ganglios, que macroscópicamente ofrecían características patológicas, eran normales desde el punto de vista histológico.

Estos hallazgos, tanto macroscópicos como microscópicos, coinciden, en líneas generales, con los encontrados por BOGOVSKY y TERAS,¹⁰ REARDON y col.¹⁰² y GOBERT y col.⁴² Estos autores, no obstante, describen la presencia de tricomonas en la zona más externa del foco necrótico; estos hallazgos no han podido ser confirmados por nosotros, aunque, en nuestras experiencias, hemos encontrado, en algún caso, formaciones que bien pudieran tratarse de tricomonas. Sin embargo, al igual que los autores mencionados, hemos encontrado flagelados en pleno parénquima hepático, aparentemente sano, y en distintas localizaciones dentro del mismo.

Con relativa frecuencia, hemos hallado hígados con lipofanerosis o con degeneración hidrópica de las células medio-lobulillares. Dichas lesiones no son referidas por estos autores, por lo que consideramos pudieran estar en relación con los fármacos utilizados en nuestro trabajo.

5. CONCLUSIONES

1. Así como clínicamente se aprecian, con posible independencia del hospedador, diferencias en la patogenia natural de *T.v.*, experimentalmente, en las condiciones de nuestro trabajo, se han encontrado diferencias altamente significativas.

2. La patogenia experimental para el ratón, por vía intraperitoneal, de las cepas procedentes de enfermas portadoras de colpitis agudas, se comparó con la de cepas procedentes de enfermas crónicas, demostrándose, por la ausencia de significación estadística, la falta de correlación entre la sintomatología clínica y la patogenia experimental, en las condiciones de nuestro trabajo.

Esta circunstancia, tampoco se vio modificada por la adición a los animales experimentales de fármacos anti-inflamatorios y hormonales.

3. La fenilbutazona no modifica la intensidad de las lesiones, siendo iguales a las que aparecen en el grupo control, según el análisis estadístico.

4. La betametasona y la hidrocortisona, modifican significativamente la pa-

togenia experimental; en el caso de la betametasona, reduciendo la mortalidad y en el de la hidrocortisona, disminuyendo la intensidad de las lesiones.

5. El cultivo reiterado de una cepa hace disminuir su patogenia de forma altamente significativa. La fenilbutazona no modifica para nada esta pérdida de patogenia. Los corticoides tampoco aumentan el poder patógeno de las cepas viejas.

6. El envejecimiento de las cepas por reiterados subcultivos conduce a una patogenia experimental uniforme, que no se ve modificada por la adición de fármacos que alteran las condiciones del hospedador.

Esta patogenia podría considerarse como la patogenia primaria de la especie, no modificable por la presión de selección contraria que el cultivo reiterado representa.

7. En todos los grupos, la localización de las lesiones fue similar. El órgano más afectado fue el hígado, siguiéndole en orden de frecuencia el bazo y páncreas. La alteración menos constante fue la ascitis.

8. Microscópicamente, *T.v.* produce una necrosis focal, constituida por tres zonas: central, con células del órgano en estado de necrosis por coagulación, juntamente con polimorfonucleares neutrófilos, células plasmáticas y linfocitos; media, con polimorfonucleares neutrófilos y linfocitos en el seno de un líquido seroso; y externa, constituida por células hepáticas con claros signos degenerativos.

No hemos detectado la presencia de tricomonas en los focos necróticos, apareciendo, por el contrario, abundantemente en zonas del hígado aparentemente normales, localizadas tanto en los canalículos biliares como en posición intra o perivascular.

6. RESUMEN

Con el fin de establecer una valoración objetiva del poder patógeno experimental de *T.v.*, y en relación con la patogenia natural, se aislaron 35 cepas de *T.v.*, procedentes de 32 enfermas portadoras de colpitis agudas o crónicas.

Se realizó una experiencia previa con el fin de comprobar si la administración de los distintos fármacos y la inoculación intraperitoneal del medio exento de protozoos, provocaba alguna alteración en los distintos órganos de los animales de experimentación, observándose lesiones de muy escasa importancia en todos los grupos, excepto en el caso de la hidrocortisona que resultaron ligeramente superiores.

Para la prueba definitiva, se recurrió a la inoculación de 1×10^7 protozoos al ratón, por vía intraperitoneal, seguida de necropsia al 10.º día p.i. Los animales experimentales se dividieron en 4 lotes, recibiendo cada uno distintos fármacos. El primero, considerado testigo, recibió penicilina-estreptomycina; el resto, fenilbutazona, betametasona o hidrocortisona, vehiculados en una solución antibiótica idéntica a la administrada al primer lote.

Se estableció un baremo que asignó distintos valores, desde 0 a 50 puntos, para

las lesiones localizadas en la grasa pélvica y peritoneo, bazo y páncreas, e hígado, así como la presencia de ascitis simple con tricomonas y las muertes ocurridas antes del 10.º día. Todo ello, con el fin de valorar estadísticamente los resultados, de acuerdo con las normas de SNEDECOR (1948).

La patogenia experimental de las cepas estudiadas fue muy variable y estadísticamente significativa. No se comprobó relación entre dicha patogenia y el cuadro clínico, lo que parece demostrar que el método que hemos seguido no es suficientemente adecuado para valorar la patogenia natural de *T.v.*, que, por otra parte, parece que no depende sólo de la virulencia de la cepa.

De los fármacos probados, la fenilbutazona no parece tener efecto alguno sobre la patogenia experimental, en tanto que la betametasona disminuye la mortalidad de los ratones y la hidrocortisona reduce la intensidad de las lesiones.

El poder patógeno experimental de las cepas disminuye de acuerdo con el número de pases en el laboratorio.

La lesión más importante fue una necrosis focal, siendo el hígado el órgano más frecuentemente afectado. La distribución de las lesiones resultó similar en todos los grupos.

RESUME

Afin d'établir une détermination objective du pouvoir pathogénique expérimental du *T.v.*, et en relation avec la pathogénie naturelle, on a isolé 35 souches de *T.v.* provenant de 32 brebis malades, porteuses de colpites aiguës ou chroniques.

On effectua préalablement une expérience afin de prouver si l'administration des différents médicaments et l'inoculation intrapéritonéale du milieu exempt de protozoaires provoquent quelque altération dans les différents organes chez les animaux d'expérimentation, et on observa des lésions peu importantes dans tous les groupes, excepté dans le cas de l'hydrocortisone où les lésions furent légèrement plus fortes ou plus graves.

Pour la preuve définitive on eut recours à l'inoculation de 1×10^7 protozoaires à une souris, par la voie intrapéritonéale, suivie de nécropsie le dixième jour après l'inoculation. Les animaux d'expérimentation furent distribués en quatre groupes, et chaque groupe reçut des médicaments différents. Le premier groupe, considéré comme témoin, reçut de la pénicilline et de la streptomycine; les trois autres reçurent de la phénylbutazone, de la bêtametasona ou hydrocortisone, véhiculées dans une solution antibiotique similaire à celle qui fut administrée au premier groupe.

On établit un barème qui assigna des valeurs différentes, de 0 à 50 points pour les lésions localisées dans la graisse du la pelvis, dans le péritoine, le rate, le pancréas, et dans le foie, ainsi que pour la présence ou cas d'ascite simple avec des trichomonas et les morts survenues avant la dixième jour. Tout cela afin de déterminer statistiquement les résultats, selon les règles de SNEDECOR (1948).

La pathogénie expérimentale des souches étudiées fut très variable et statistiquement significative. Aucune relation entre la susdite pathogénie et le tableau clinique ne fut prouvée, ce qui semble démontrer que la méthode que nous avons suivie n'est pas suffisamment appropriée pour déterminer la pathogénie naturelle du *T.v.*, laquelle, d'ailleurs, semble ne pas dépendre seulement de la virulence de la souche.

Parmi les médicaments, la phénylbutazone ne semble avoir aucun effet sur la pathogénie expérimentale, alors que la bêtamétasone diminue la mortalité des souris, et l'hydrocortisone diminue l'intensité des lésions.

Le pouvoir pathogénique expérimental des souches diminue selon le nombre de passages au laboratoire.

La lésion plus importante fut une nécrose focale, étant le foie l'organe le plus fréquemment affecté. La distribution des lésions fut similaire dans tous les groupes.

SUMMARY

35 strains of *T.v.* proceeding from 32 diseased sheep, bearers of acute or chronic colpitis were isolated in order to establish an objective determination of experimental pathogenic power of *T.v.* and in relation with natural pathogeny.

An experiment had previously been carried out in order to check whether the administration of different drugs or the intraperitoneal inoculation of protozoan-free medium caused some alteration in the different organs of experimental animals, and some lesions of small significance were observed in all the groups except in the case of hydrocortisone where lesions resulted to be slightly more intensive.

For the final or conclusive assay, 1×10^7 protozoa were inoculated into a mouse by intraperitoneal route, followed by a necropsy on 10th day p.i. The experimental animals were distributed in four lots or groups, and each group received different drugs. The first group, used as control, received penicillin and streptomycin; the remaining groups received phenylbutazone, betametason or hydrocortisone, vehicled into an antibiotic solution similar to that administered to the first group.

A ready reckoner was established to assign different values, from 0 to 50 points for the lesions located into the pelvic fat, and in the peritoneum, spleen, pancreas and liver, as well as for the occurrence of simple ascitis with trichomonas and for the deaths occurred prior to 10th day. All this, in order to statistically determine the results according to SNEDECOR standards (1948).

The experimental pathogeny of strains studied was very variable and statistically significant. No relationship was observed between said pathogeny and the clinical picture. This seems to show that the method that we have followed is not sufficiently adequate to determine the natural pathogeny of *T.v.* which, on the other hand, seems not to depend upon strain virulence only.

Among the drugs tested, phenylbutazone seems to have no effect on the experimental pathogeny, while betametason decreases mortality in mice and hydrocortisone decreases lesions intensity.

Experimental pathogenic power of strains decreases according to the number of passages in the laboratory.

The most important lesion was a focal necrosis and the liver was the most frequently affected. The distribution of lesions was similar in all the groups.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ADLER, S. y PULVERTAFT, R. J. V. (1944): The use of penicillin for obtaining bacteria-free cultures of *Trichomonas vaginalis*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, **38**: 188-189.
2. ADLER, S. y SADOWSKY, A. (1947): Intradermal reaction in *Trichomonas* infection. *Lancet*, **252**: 867-868.
3. ASAMI, K., NODAKE, Y. y UENO, T. (1955): Cultivation of *Trichomonas vaginalis* on a solid medium. *Expl. Parasit.*, **4**: 34-39.
4. BAUER, H. (1943): *Die Trichomoniasis des Urogenitaltraktes, besonders beim Manne*. Habilit. Schrift Univ., Erlangen.
5. BAUER, H. (1965): Zum Trichomonaden-Nachweis mittels Färbung; Hierbei mögliche Verwechslung von Trichomonadenkernen mit Spermienköpfen. *Geburtsh. Frauenheilk.*, **25**: 396-401.
6. BEDOYA, J. M. (1959): *Trichomoniasis sexual humana*. Edit. Facta, Valencia.
7. BENSEN, W. (1910): Untersuchungen über *Trichomonas intestinalis* und *vaginalis* des Menschen. *Arch. Protistenk.*, **18**: 115-127.
8. BERIC, L. (1958): Importancia de la localización de los *Trichomonas vaginalis* en los uréteres y en la pelvis renal femenina, en las recidivas de la trichomoniasis. *Obst. Gynec. Lat-Amér.*, **16**: 168-171. (Trad. española del original).
9. BERTRAND, P. y LEULIER, J. (1960): Essais cliniques sur la trichomonase des partenaires des femmes infestées. *Gynaec.*, **149**: 93-96.
10. BOCOVSKY, P. A. y TERAS, J. (1958): Pathologic-anatomical changes in white mice in intraperitoneal infection by cultures of *Trichomonas vaginalis*. *Med. Parazit. parazit.*, **27**: 194-199.
11. BRET, A. J., RAUZY, A. y BRUX, J. DE (1963): *Trichomonas*. La valeur du frottis dans son dépistage systématique. *Revue Fr. Gynec.*, **58**: 625-633.
12. BURCH, T. A., REES, C. W. y KAYHOE, D. E. (1958). Laboratory and clinical studies on vaginal trichomoniasis. *Am. J. Obst. Gynec.*, **76**: 658-665.
13. CAMPBELL, W. C. (1968): Effect of anti-inflammatory agents on spontaneous cure of *Trichinella* and *Trichuris* in mice. *J. Parasit.*, **54**: 452-456.
14. CAPET, R. G. y PAYMENT, P. (1968): Diagnostic staining of dry smears for *Trichomonas*. *Obst. Gynec.*, **4**: 564-568.
15. CARNERI, I. DE (1956): Isolation of *Trichomonas vaginalis* from fungi and bacteria. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, **5**: 210-212.
16. CARNERI, I. DE (1956): Conservation of *Trichomonas* in monobacterial cultures. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, **5**: 677-680.
17. CARNERI, I. DE (1956): Influenza del siero di cavallo sulla crescita del *T. vaginales* e *T. hominis* in terreno fluido al tiglicolato. *Riv. di Parassitologia*, **17**: 247-251.
18. CARNERI, I. DE, EMANUELI, A. y SIGNORELLI, I. (1968): Efficiency of microscopic examination of fresh smears and cultures in diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *Am. J. Obst. Gynec.*, **100**: 299-301.
19. CARRERA, J. M., DEXEUS, S., COUPEZ, F. (1973): *Tratado y Atlas de Colposcopia*. Salvat Editores, Barcelona.
20. CATTERALL, R. D. y NICOL, C. S. (1960): Is trichomonal infestation a venereal disease? *Gynaec.*, **149**: 87-92.
21. CAVIER, R. y MOSSION, X. (1956): Essais d'infection expérimentale de la Ratte par *Trichomonas vaginalis*. *C. r. Acad. Sci. (Paris)*, **242**: 2412-2414.
22. CAVIER, R. y MOSSION, X. (1957): Nouveaux essais d'infestation expérimentale de la Ratte par *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1837), *C. r. Acad. Sci. (Paris)*, **243**: 1807-1809.

23. CERVA, L. y CERVOVÁ, H. (1961): V'yskyt *Trichomonas intestinalis* u zen a souvislost této nákazy s vaginální trichomoniasí. *Cs. Epidem.*, **10**: 128-133.
24. COMBESCOT, CH., PESTRE, M. y DOMENECH, A. (1957 a): Action de la progestérone sur l'infestation expérimentale de la Ratte albinos par *Trichomonas vaginalis*. *C. r. Soc. Biol. (Paris)*, **151**: 332-334.
25. COMBESCOT, CH., PESTRE, M. y DOMENECH, A. (1957 b): pH vaginal et infestation expérimentale à *Trichomonas vaginalis* chez la Ratte albinos. *C. r. Soc. Biol. (Paris)*, **151**: 549-551.
26. COMBESCOT, CH., PESTRE, M. y DOMENECH, A. (1957 c): Action de la testostérone sur l'infestation expérimentale de la Ratte albinos par *Trichomonas vaginalis*. *C. r. Soc. Biol. (Paris)*, **151**: 953-954.
27. CREE, G. E. (1968): *Trichomonas vaginales* in Gram-stained smears. *Br. J. vener. Dis.*, **44**: 226-227.
28. CHAPPAZ, G. (1960): Etiologie de la trichomonase féminine. *Gynaec.*, **149**: 1-47.
29. CHRISTIAN, R. T., MILLER, N. F., LUDOVICI, P. P. y RILEY, G. N. (1963): A study of *Trichomonas vaginalis* in human cell culture. *Am. J. Obst. Gynec.*, **85**: 947-954.
30. CHRISTOW, P. (1971): Trichomonose. *Zbl. Bakt., 1 Abt. Ref.* **225**: 1-40.
31. DIAMOND, L. S. (1957): The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasit.*, **43**: 488-490.
32. DONNÉ, A. (1836): Animalcules observés dans les matieres purulentes et le produit des secretions des organes génitaux de l'homme et de la femme. *C. r. Acad. Sci. (Paris)*, **3**: 385-386.
33. DYROFF, R. y MICHALZIK, K. (1954): Untersuchungen über die Biologie von *Trichomonas vaginalis*. *Geburtsh. Frauenheilk.*, **14**: 36-44.
34. FEINBERG, J. G. (1953): A method for the bulk growth of a parasitic protozoan. *Nature (London)*, **171**: 1165-1166.
35. FEINBERG, J. G. y WHITTINGTON, M. J. (1957): A culture medium for *Trichomonas vaginalis* Donné and species of *Candida*. *J. clin. Path.*, **10**: 327-329.
36. FEO, L. G. (1957): Maintenance of *Trichomonas vaginalis* in Simplified Trypticase-Serum medium without maltose. *Les infestations a Trichomonas*. (Reims) pp. 261.
37. FILADORO, F. y ORSI, N. (1958): Cultivation of *Trichomonas vaginalis* on a solid medium and its application to the assay of trichomycin potency. *Antibiotics Chemother.*, **11**: 561-563.
38. FIOCCARDI, R. (1966): Uretriti maschili da *Trichomonas*. *Min. Med.*, **57**: 3189-3191.
39. FROST, J. K. y HONIGBERG, B. M. (1962): Comparative pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas gallinae* to mice. II. Histopathology of subcutaneous lesions. *J. Parasit.*, **48**: 898-918.
40. GINEL, W. (1962): On changes in the vaginal mucous membrane of pregnant animals caused by *Trichomonas vaginalis*. *Wiad. Parazyt.*, **8**: 217-221.
41. GOBERT, J. G., GEORGES, P., GOBERT, N. y SAVEL, J. (1969): Etude de l'endoparasitisme expérimental de *Trichomonas vaginalis* chez la Souris. I. Conditions d'installation et obtention de lésions viscérales avec diverses souches du Flagellé. *Ann. Parasitol.*, **44**: 677-686.
42. GOBERT, J. G., GEORGES, P., SAVEL, J., GENET, P. y PIETTE, M. (1969): Etude de l'endoparasitisme expérimental de *Trichomonas vaginalis* chez la Souris. II. Etude cytologique et histologique. *Ann. Parasitol.*, **44**: 687-696.
43. GOBERT, J. G., GEORGES, P. y SAVEL, J. (1969): Etude de l'endoparasitisme expérimental de *Trichomonas vaginalis* chez la Souris. III. Essais d'installation d'une souche réfractaire de *Trichomonas vaginalis*. Interprétation des résultats. *Ann. Parasitol.*, **44**: 697-708.
44. GOSSELIN, O. y LAMBOTTE, R. (1961): Critères de guérison des affections a *Trichomonas* chez la femme et résultats cliniques de quelques essais thérapeutiques. *Gynec. Obstet.*, **60**: 141-149.
45. GRAHAM, R. M. (1966): *Diagnóstico citológico del cáncer*. Edit. Científico-Médica, Barcelona.
46. GRASSÉ, P. P. (1952). *Traité de zoologie*. Tome I. Première fascicule. pp. 757.
47. GRIMMER, H. (1950): *Trichomonas vaginalis*. *Z. Haut. Geschl. Kr.*, **8**: 188-197.
48. GUEVARA, D. y JIMÉNEZ, J. (1965): Aportación experimental al estudio biológico del *Trichomonas vaginalis* «in vitro». *Revta. ibér. Parasit.*, **25**: 371-440.
49. HAWES, R. S. (1947): On the structure, division and systematic position of *Trichomonas vaginalis* Donné, with a note on its methods of feeding. *J. Micr. Sci.*, **88**: 79-98.
50. HOFFMANN, B. y GORCZYNSKI, M. (1964): Serologic types of *T. vaginalis* strains as encountered in the population of Bialystok Voivodeship. *Wiad. Parazyt.*, **10**: 132-135.
51. HÖHNE, O. (1916): *Trichomonas vaginalis* als häufigen erregar liner typischen colpitis purulenta. *Zbl. Gynäk.*, **40**: 4-15.
52. HOLECKOVA-CERVOVÁ, H. (1960): Kultivae *Trichomonas vaginalis* v klinecké praxi. *Cs. Parasit.*, **7**: 237-243.
53. HONIGBERG, B. M. (1961): Comparative pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas gallinae* to mice: I. Gross pathology, cuantitative evaluation of virulence and some factors affecting pathogenicity. *J. Parasit.*, **47**: 545-571.
54. HONIGBERG, B. M. y BRAUNTHAL, S. D. (1957): Comparative pathogenicity of several strains of *Trichomonas gallinae* and *Trichomonas vaginalis* to mice. *J. Parasit.*, **43**: 40.
55. HONIGBERG, B. M. y KING, V. M. (1964): Structure of *Trichomonas vaginalis* Donné. *J. Parasit.*, **50**: 345-364.
56. HONIGBERG, B. M., FARRIS, V. K. y LIVINGSTON, M. C. (1965): Preservation of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas gallinae* in liquid nitrogen. *Progr. Protozool.*, **91**: 199-200.
57. HONIGBERG, B. M., LIVINGSTON, M. C. y FROST, J. K. (1966): Pathogenicity of fresh isolates of *Trichomonas vaginalis*: «The mouse assay» versus clinical and pathologic findings. *Acta cytol.*, **10**: 353-361.
58. HONIGBERG, B. M., BALAMUTH, W., BOVEE, E. C., CORLISS, J. O., GOJDCIS, M., HALL, R. P., KUDO, R. R., LEVINE, N. D., LOEBLICH, A. R., WEISER, J. y WENRICH, D. M. (1964): A revised classification of the phylum protozoa. *J. Protozool.*, **11**: 7-20.
59. INOKI, S. y HAMADA, Y. (1954). Experimental transmission of *Trichomonas vaginalis* (pure culture) into mice. *J. infect. dis.*, **92**: 1-3.
60. INOKI, S., NAKANISHI, K. y NAKABAYASHI, T. (1960): Electron microscopic observations of *Trichomonas vaginalis* employing the thin-section technique. *Gynaec.*, **149**: 48-54.
61. IVEY, M. H. (1961): Growth characteristics of clones of *Trichomonas vaginalis* in solid medium. *J. Parasit.*, **47**: 539-544.
62. JEFFRIES, L. y HARRIS, M. (1967): Observations on the maintenance of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*; the effects of cortisone and agar on enhancement of severity of subcutaneous lesions in mice. *Parasitology*, **57**: 321-334.
63. JIROVEC, O. y PETRU, M. (1968): *Trichomonas vaginalis* y Trichomoniasis. *Adv. Parasit.*, **6**: 117-188.
64. JOHNSON, G. y TRUSSELL, R. E. (1943): Experimental basis for the chemotherapy of *Trichomonas vaginalis* infestations. I. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **54**: 245-249.
65. JOHNSON, G. y TRUSSELL, M. H. (1944): Physiology of bacteria-free *Trichomonas vaginalis*. VII. Temperature in relation to survival and generation time. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **57**: 252-254.
66. KEAN, B. H. (1960): Conjugal trichomoniasis. *Gynaec.*, **149**: 97-100.
67. KESSEL, J. F. y GAFFORD, J. A. (1940): Observations on the pathologie of trichomonas vaginitis and on vaginal implants with *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas intestinalis*. *Am. J. Obst. Gynec.*, **39**: 1005-1014.
68. KOSTIC, P. (1960): Le *Trichomonas vaginal* du tractus urinaire chez la femme. *Gynaec.*, **149**: 70-75.
69. KOTT, H. y ADLER, S. (1961): A serological study of *Trichomonas* spp. parasitic in man. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **55**: 333-344.
70. KUPFERBERG, A. B. (1960): Metabolic studies and chemotherapy of *Trichomonas vaginalis*. *Gynaec.*, **149**: 114-121.
71. KUPFERBERG, A. B. y JOHNSON, G. (1941): Physiology of bacteria-free culture of *Trichomonas vaginalis*: VI. Effect of female sex hormones on population. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **48**: 516-518.
72. KUPFERBERG, A. B., SINGER, H. D., LAMPSON, G., LEVY, L. y ROMANO, A. H. (1953): Studies on the metabolism of *Trichomonas vaginalis*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **56**: 1006-1015.
73. LAAN, I. (1966): On the effect of passages in vitro and in vivo on the pathogenicity, agglutinative ability and fermentative activity of *Trichomonas vaginalis*. *Wiad. Parazyt.*, **12**: 173-182.
74. LANCELEY, F. (1958): Serological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Br. J. vener. Dis.*, **34**: 4-8.
75. LANCELEY, F. y McENTEGART, M. G. (1953): *Trichomonas vaginalis* in the male. *Lancet*, **4**: 668-671.
76. LANG, W. R., FRITZ, M. A. y MENDUKE, H. (1960): Bacterial and mycotic components of *Trichomonas vaginalis* vaginitis. *Gynaec.*, **149**: 55-62.
77. LEÓN, E. DE (1968): Trichomoniasis. *Protozoal Diseases*, 124-138.
78. LINDGREN, R. D. e IVEY, M. H. (1964): The effect of cultivation and freezing on the virulence of *Trichomonas vaginalis* for mice. *J. Parasit.*, **50**: 226-229.
79. LITTER, M. (1972): *Compendio de Farmacología*. Librería «El Ateneo». Edit. Argentina.
80. LOTFI, H. O. (1968): Influencia de la tricomoniasis en la citología exfoliativa del cuello uterino. *Obstet. Ginec. Lat.-Amer.*, **26**: 186-188.

81. LUDVIK, J., STOKLOSOVA, S. y WECLARSKA, B. (1961): Electronmikroskopická studie *Trichomonas vaginalis*. *Cs. Parasit.*, **8**: 257-267.

82. LUNDSTROM, P. (1960): Criteria of cure in vaginal *Trichomonas* infestation in women with vaginitis: with special reference to testing of trichomonocidal drug. *Acta Obst. Gynec. Scand.*, **39**: 198-221.

83. LYNCH, J. E., HOLLEY, E. C. y MARGISON, J. E. (1955): Studies on the use of the mouse as a laboratory animal for the evaluation of antitrichomonal agents. *Antibiotics Chemother.*, **5**: 508-514.

84. MACARA, M., AMINO, E. y YOKOUTI, E. (1953): One method for the pure culture of *Trichomonas vaginalis*. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, **2**: 267-270.

85. MAYER, M. y LIEVEAUX, A. (1961): L'étiologie des leucorrhées en dehors de la grossesse. *Gynec. Obstet.*, **60**: 12-25.

86. McENTEGART, M. G. (1952): The application of a haemagglutination technique to the study of *Trichomonas vaginalis* infections. *J. clin. Path.*, **5**: 275-280.

87. McENTEGART, M. G. (1954): The maintenance of stock strains of trichomonads by freezing. *J. Hyg.*, **52**: 545-550.

88. MICHALZYK, K. (1953): *Trichomonas vaginalis* und positive Seroreaktion auf Toxoplasmose. *Dt. med. Wschr.*, **78**: 307-309.

89. MONTALVO, L. (1964): *Citología vaginal, endocervical y endometrial, hormonal y maligna*. Edit. Científico-Médica, Barcelona.

90. NACUIB, S. M., COMSTOCK, G. W. y DAVIS, H. J. (1966): Epidemiologic study of trichomoniasis in normal women. *Obst. Gynec.*, **27**: 607-616.

91. NEWTON, W. L., REARDON, L. V. y LEVA, A. DE (1960): A comparative study of the subcutaneous inoculation of germfree and conventional guinea pigs with two strains of *Trichomonas vaginalis*. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, **9**: 56-61.

92. NICOLI, R. M. y TIMON-DAVID, P. (1973): La pratique en gynécologie microbiologique. Le problème de la trichomonase. *Revue fr. Gynec.*, **68**: 173-184.

93. NIELSEN, R. (1965): Experiences with cultivation of *Trichomonas vaginalis*. Proc. Fennoscand. Ass. Derm. (Tomado de Comunicaciones de Statens Serum-Institut, **57**: 118-122 (1966).

94. NIELSEN, M. H., LUDVIK, J. y NIELSEN, R. (1966): On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis* Donné. *J. Microscopic*, **5**: 229-250.

95. PAPANICOLAOU, G. N. y WOLINSKA, W. H. (1955): Vaginal cytology in *Trichomonas* infestation. *Int. Rec. Med.*, **168**: 551-556.

96. PATRONO, D., SERTOLI, G. y CUNESE, F. (1969): Opportunita dell'aggiunta di un antimicotico nel terreno culturale per il *Trichomonas vaginalis*. *Clinica Ost. Gin.*, **22**: 361-363.

97. PAVON, J., NICOLAS, M. DE y SOL, J. R. DEL (1972): Valor comparativo de los distintos métodos de diagnóstico de la Trichomoniasis vaginal. Comunicación a la I Reunión Científica de la Sociedad Española de Citología (Alicante).

98. PEREA, J. A. y GARCÍA-ORCOYEN, J. (1971): Trichomoniasis urogenital (Trichomoniosis). *Arc. Fac. Med.*, **20**: 187-206.

99. PIEKARSKI, G., SAATHOFF, M. y KORTE, W. (1957): Zum Problem der Spezifität der Toxoplasma-Seroreaktion. *Z. Tropenmed. Parasit.*, **8**: 356-367.

100. PUNDEL, J. P. (1968): *Colpocitología hormonal*. Edit. Toray-Masson, Barcelona.

101. REARDON, L. V. y JACOBS, L. (1958): Differences in two strains of *Trichomonas vaginalis* as revealed by intraperitoneal injections into 6 strains of mice. *J. Parasit.*, **44**: 21-29.

102. REARDON, L. V., ASHBURN, L. L. y JACOBS, L. (1961): Differences in strain of *Trichomonas vaginalis* as revealed by intraperitoneal injections into mice. *J. Parasit.*, **47**: 527-532.

103. ROIRON-RATNER, V. (1957): Etude comparative des principaux milieux de culture du *Trichomonas vaginalis*. *Les infestations à Trichomonas*, (Reims), pp. 244-252.

104. SAMUELS, R. (1962): Agar techniques for colonizing and cloning trichomonads. *J. Protozool.*, **9**: 103-107.

105. SANCHIS-BAYARRI, V. y SANCHIS-BAYARRI LAHOZ, V. (1965): Medio de cultivo para el *Trichomonas vaginalis*. *Revta. Esp. Obst. Gynec.*, **143**: 369-373.

106. SCARPELLINI, L. y MANNARINO, T. (1967): Aspetti attuali della trichomoniasi urogenitale. *Min. Gin.*, **33**: 1-36.

107. SCHNITZER, R. J., KELLY, D. R. y LEIVANT, B. (1950): Experimental studies on trichomoniasis. I. The pathogenicity of trichomonad species for mice. *J. Parasit.*, **36**: 343-349.

108. SIBOULET, A. (1960): A propos du traitement de la trichomonase uro-génitale féminine. *Gynaec.*, **149**: 139-142.

109. SLAVTCHEV, N. (1962): Le traitement de la Trichomonase vaginale par l'hydroxy 2 éthyl-1 méthyl-2 nitro-5 imidazole (8823 R. P.). *Revue fr. Gynec. Obstet.*, **2**: 105-109.

110. SMITH, B. F. y STEWART, B. T. (1966): Fine structure of *Trichomonas vaginalis*. *Expl. Parasit.*, **19**: 52-63.

111. SMOLKA, H. y SOOST, H. J. (1966): *Compendio y atlas de citodiagnóstico ginecológico*. 2a. ed., Edit. Labor, Barcelona.

112. SOSZA, S., KAZANOWSKA, W. y KUCZYNSKA, K. (1962): On injury of the epithelium of the vagina caused by *Trichomonas vaginalis* in experimental animal. *Wiad. Parazyt.*, **8**: 209-215.

113. SPRINCE, H. y KUPFERBERG, A. B. (1947): The nutrition of Protozoa. I: A simplified medium for the investigation of unknown factors in blood serum essential for the sustained growth of *Trichomonas vaginalis*. *J. Bact.*, **53**: 435-439.

114. STABLER, R. M., FEO, L. G. y RAKOFF, A. E. (1941): Implantation of international trichomonads (*T. hominis*) into the human vagina. *Am. J. Hyg.*, **34**: 114-118.

115. STENTON, P. (1957): The isolation of *Trichomonas vaginalis*. *J. Med. Lab. Technol.*, **14**: 228-230.

116. TERAS, J. (1965): On the varieties of *Trichomonas vaginalis*. *Progr. Protozool. (London)*, **91**: 197-198.

117. TERAS, J. (1966): Differences in the antigenic properties within strains of *Trichomonas vaginalis*. *Wiad. Parazyt.*, **12**: 357-363.

118. TERAS, J. y TOMPEL, H. (1963): Comparative study of the pathogenicity of monocellular cultures of the serotypes of *Trichomonas vaginalis* TLR and TN. *Acad. Sci. Estonian Ssr. Tallinn*, 43-50.

119. TERAS, J., JAKMEES, H., NICESEN, V., ROIGAS, E. y TOMPEL, H. (1966): The dependence of serologic reactions on the serotypes of *Trichomonas vaginalis*. *Wiad. Parazyt.*, **12**: 364-369.

120. TRUSSELL, R. E. (1946): Microagglutination tests with *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasit.*, **32**: 563-569.

121. TRUSSELL, R. E., WILSON, M. E., LONGWELL, F. H. y LAUGHLIN, K. A. (1942): Vaginal trichomoniasis, complement fixation, puerperal morbidity and early infection of newborn infants. *Am. J. Obst. Gynec.*, **44**: 292-295.

122. UHLENHUTH, P. y SCHOENHERR, K. E. (1955): Untersuchungen über die Übertragungsmöglichkeiten verschiedener Trichomonadenarten auf kleine Laboratoriumstiere. *Z. Immun. Forsch.*, **112**: 48-56.

123. VERSHINSKII, B. V. (1957): Experimental infection of golden hamsters with *Trichomonas vaginalis*. *Zool. Zumal.*, **36**: 1774-1776.

124. WESTPHAL, A. (1936): Zur Morphologie, Biologie und Infektionsfähigkeit der viergeisseligen Trichomonasarten des Menschen. *Z. Bakt.*, **137**: 363-376.

125. WIRTSCHAFTER, S. (1954): The maintenance of *Trichomonas vaginalis* on a solid medium. *J. Parasit.*, **40**: 100.

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Prof. Dr. A. R. Martínez Fernández, bajo cuya dirección se realizó este trabajo, y que nos orientó no sólo en la elección del tema del mismo, sino también en la metódica y técnica para llevarlo a la práctica.

Igualmente, al Prof. Dr. M. Cordero del Campillo, por su ayuda generosa, tanto desde el punto de vista material como científico, que hizo posible la realización de este trabajo.

Así mismo, al Dr. R. Sanz Arias, que llevó a cabo la ardua tarea de confeccionar los datos estadísticos, y a quien nunca agradeceremos bastante sus enseñanzas en este tema.

Del mismo modo, al Dr. A. Escudero Díez, por su labor en la faceta anatomo-patológica, de tanta importancia en nuestro trabajo, consiguiendo preparaciones muy demostrativas.

Finalmente, a los doctores S. Manero Martínez y F. Rojo Vázquez, así como a todo el personal de la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Infecciosas, que de una u otra forma contribuyeron a la culminación de esta Tesis Doctoral.

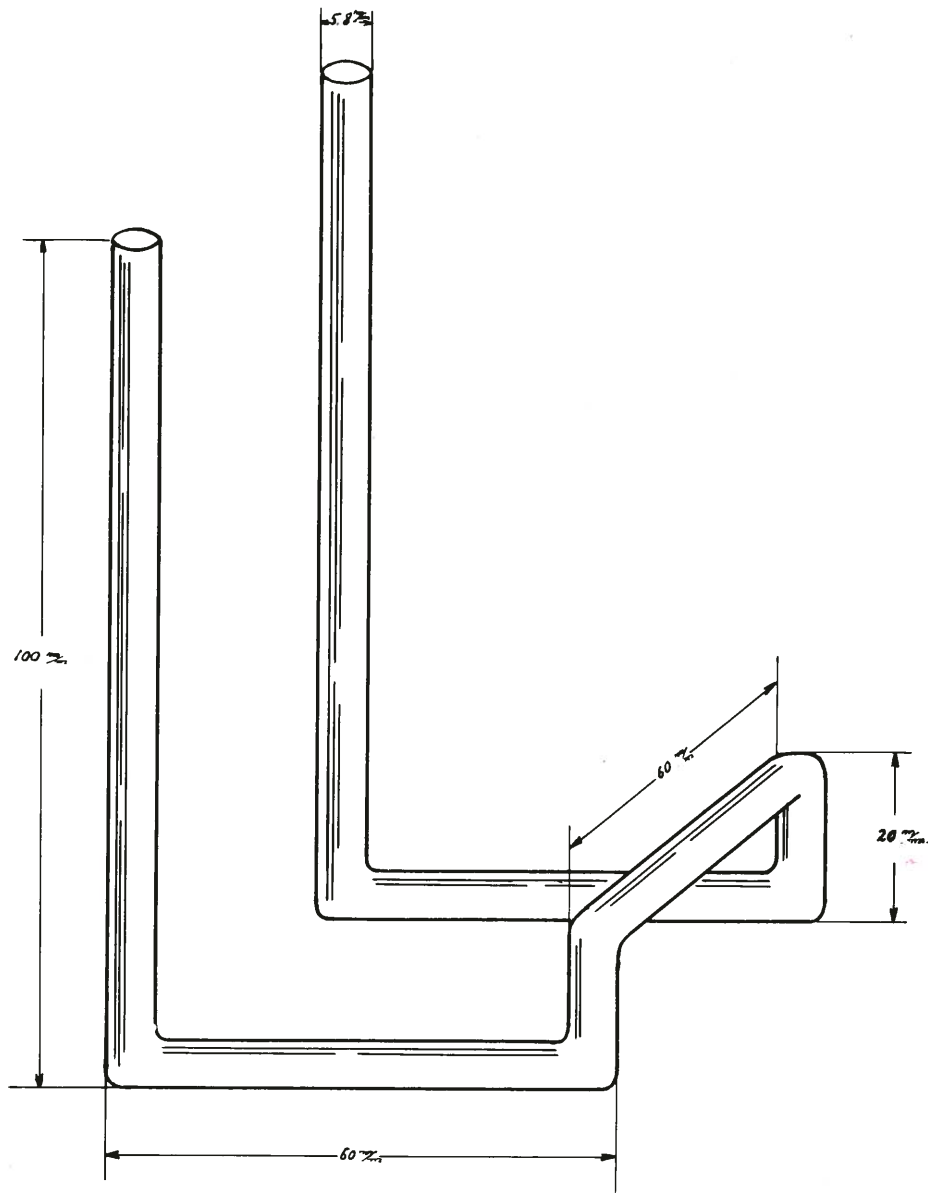


Fig. 1. Tubo de Decarneri (modificado)

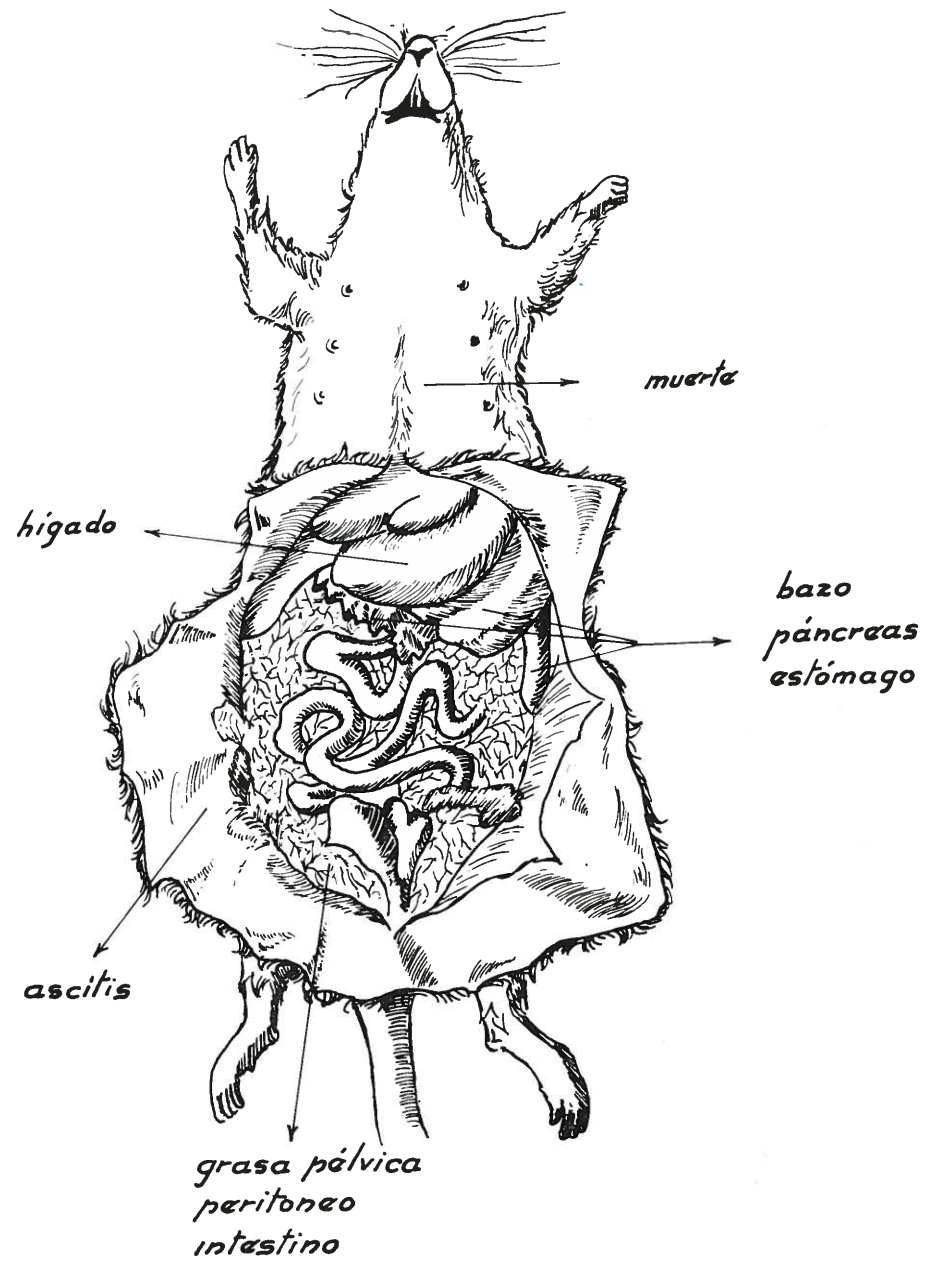


Fig. 2

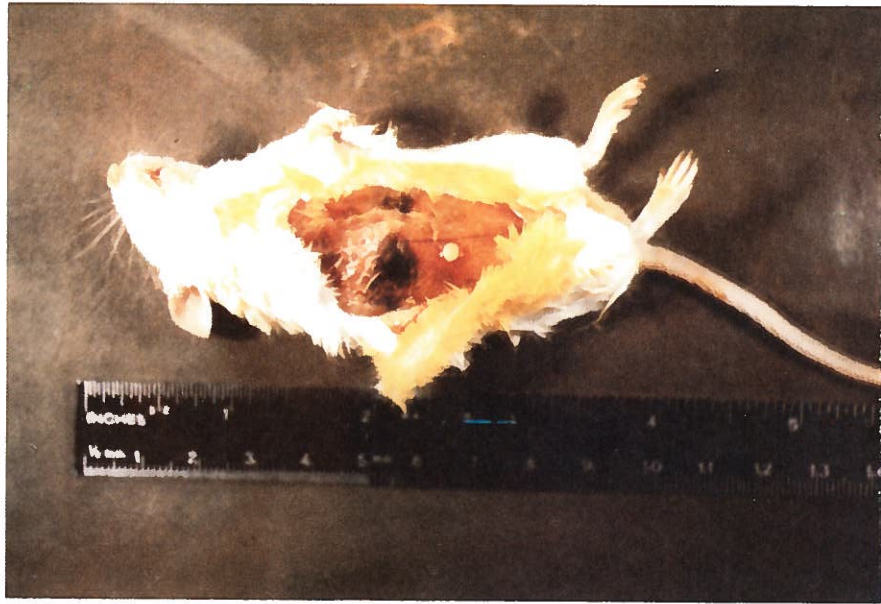


Figura 3.—Necrosis en el punto de inoculación.

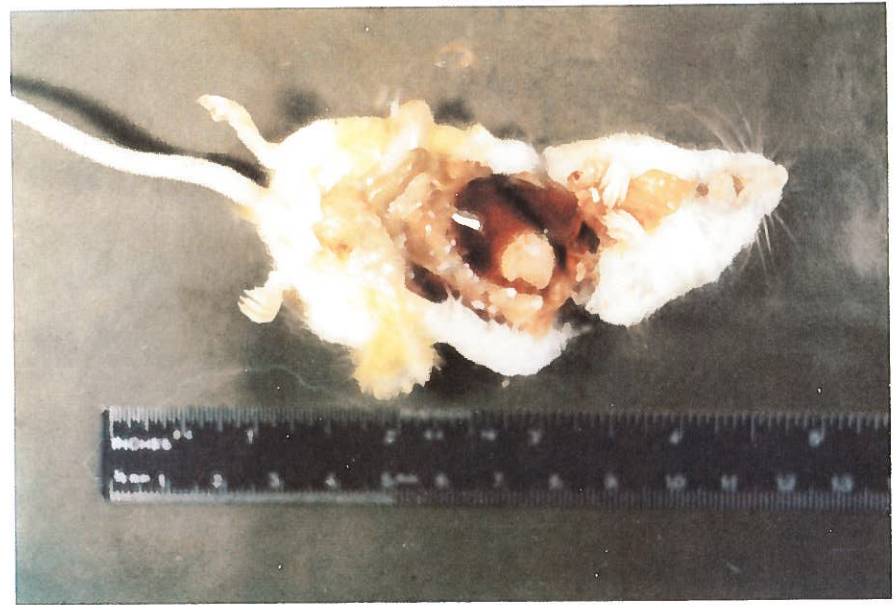


Figura 5.—Necrosis en «mancha de aceite» sobre el lóbulo izquierdo del hígado.

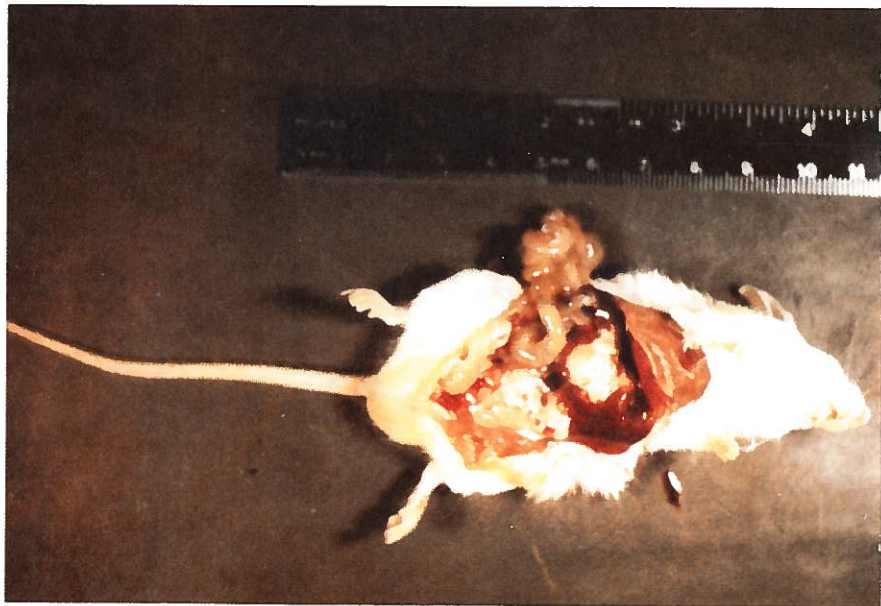


Fig. 4.—Necrosis en grasa pélvica. Intensa necrosis sobre bazo y páncreas (lesión típica), así como en la cara diafragmática del hígado.

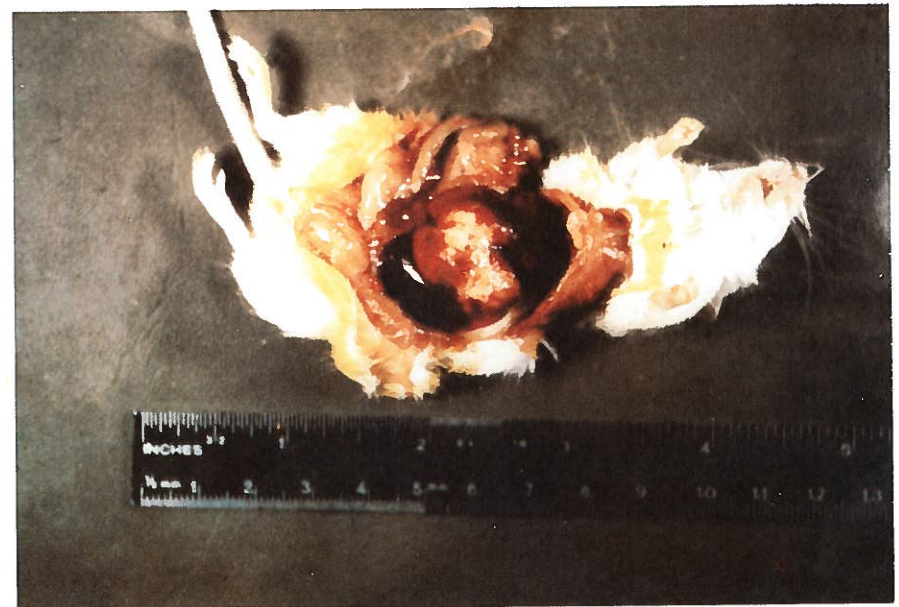


Figura 6.—Extensa necrosis que afecta por completo al lóbulo izquierdo del hígado. Hiper-trofia del bazo.

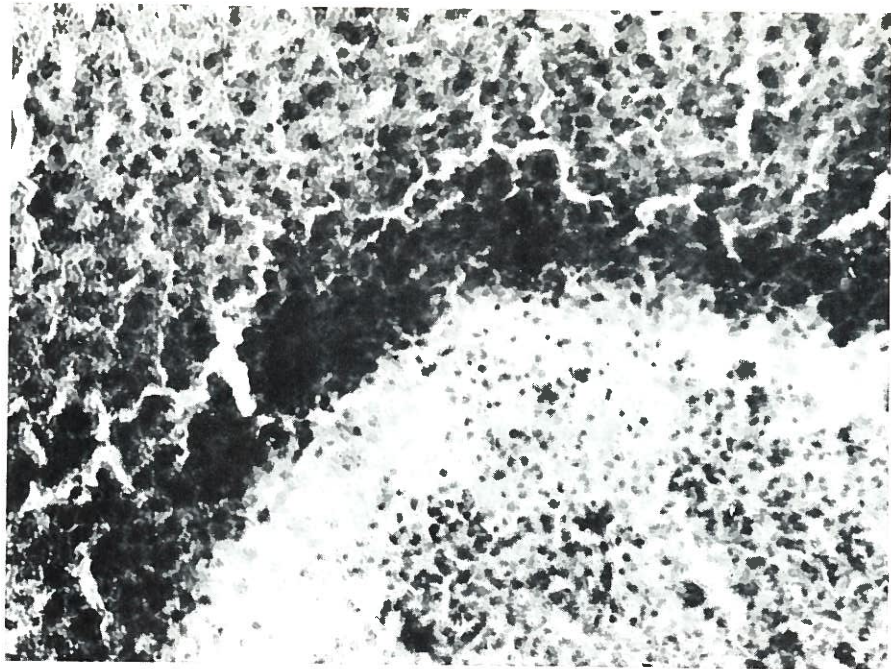


Figura 7.—Necrosis hepática. Se aprecian perfectamente las tres zonas descritas en el texto.

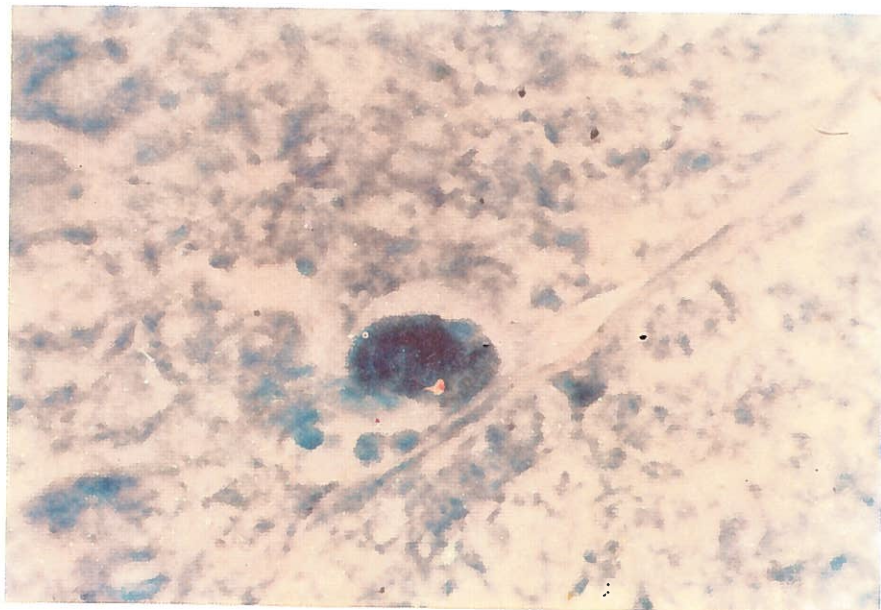


Figura 8.—*T.v.* en el interior de un espacio porta.

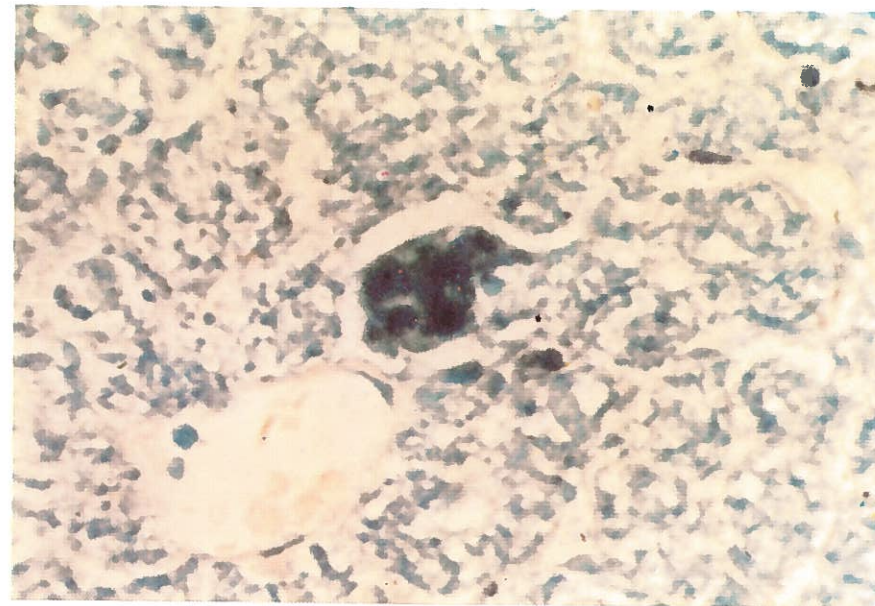


Figura 9.—*T.v.* en el interior de un sinusoide hepático.

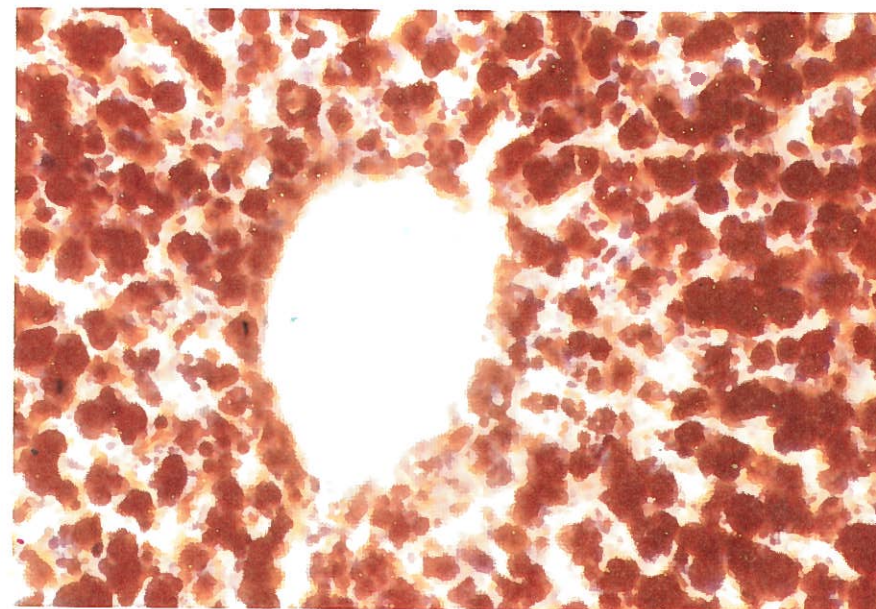


Figura 10.—Lipofanerosis centrolobulillar (SUDAN IV).

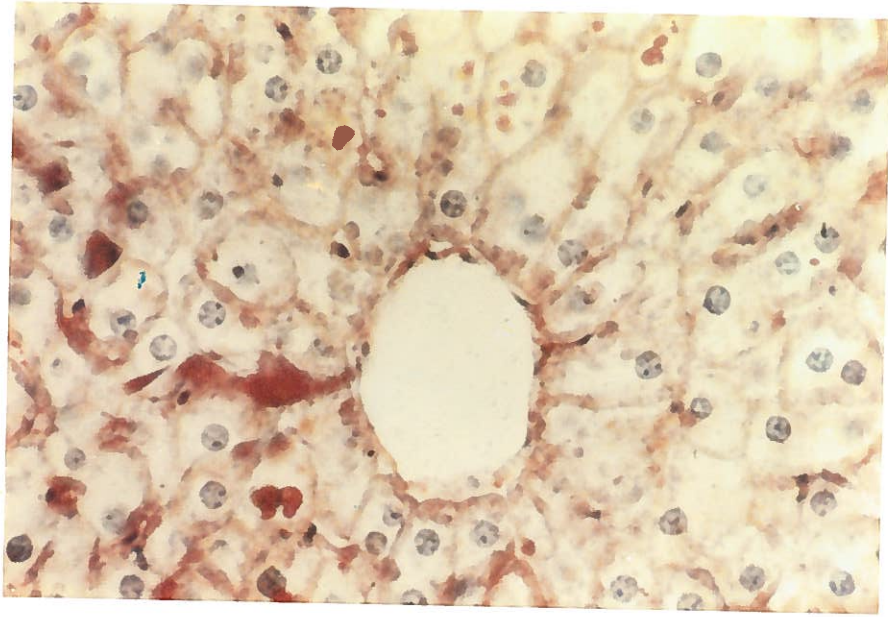


Figura 11.—Balonización de las células hepáticas centro-lobulillares (SUDAN IV).