

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Detección molecular de *Trichomonas vaginalis* en hisopados
cérvico-uterinos de pacientes ambulatorios que asisten a
dos centros de atención médica
Proyecto de Investigación**

Jorge Emilio Puertas Samaniego

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 19 de noviembre de 2015

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Detección molecular de *Trichomonas vaginalis* en hisopados cérvico-uterinos
de pacientes ambulatorios que asisten a dos centros de atención médica**

Jorge Emilio Puertas Samaniego

Calificación:

Cristina Chávez, MSc.

Sonia Zapata, PhD.

Firma del profesor

Quito, 19 de noviembre de 2015

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Jorge Emilio Puertas Samaniego

Código: 100119

Cédula de Identidad: 1720358918

Lugar y fecha: Quito, noviembre de 2015

RESUMEN

La tricomoniasis es la enfermedad de transmisión sexual no viral más común alrededor del mundo. Esta enfermedad es causada por *Trichomonas vaginalis* y es asintomática en un alto porcentaje de las personas infectadas. Por esta razón es necesaria la implementación de pruebas de laboratorio adecuadas que permitan mejorar la capacidad de detección de este patógeno. La detección oportuna y adecuada de este protozooario permite disminuir el riesgo de adquirir VIH y otros patógenos de transmisión sexual. En este estudio se amplificó una región del ADN ribosomal 18S (312pb) y el gen de Beta-tubulina (198pb) para la detección de *T. vaginalis* en 97 muestras de secreciones vaginales provenientes de la red de Sistemas Médicos de la Universidad San Francisco de Quito y de la Clínica de Especialidades Tumbaco. Los resultados mostraron la presencia de *T. vaginalis* en el 3,09% de las muestras y la secuenciación de los productos de PCR confirmó la presencia de *T. vaginalis* en 3 muestras. Estos resultados confirman que la sensibilidad de detección de *T. vaginalis* es mayor al utilizar una PCR convencional que cuando se utiliza el método tradicional de diagnóstico por microscopía directa. Adicionalmente se resalta la importancia del método de diagnóstico molecular como una herramienta útil para detectar *T. vaginalis* en mujeres asintomáticas.

Palabras clave: tricomoniasis, *Trichomonas vaginalis*, PCR, ARNr 18S

ABSTRACT

Trichomoniasis is the most common non-viral sexual transmitted disease worldwide. This disease is caused by *Trichomonas vaginalis* and is asymptomatic in a high percentage of those infected, therefore it is necessary to implement appropriate laboratory tests to improve the detection of this pathogen. The opportune and appropriate detection of this protozoan can reduce the risk of contracting HIV and other sexually transmitted pathogens. In this study a 18S ribosomal DNA and Beta Tubulin genes were amplified to detect the presence of *T. vaginalis* in 97 vaginal secretions samples which came from both “Sistemas medicos Universidad San Francisco de Quito” and “Clínica de Especilidades Tumbaco” Health center. The results showed the presence of *T. vaginalis* in 3,09% of the samples, further sequencing was performed and it confirmed the presence of *T. vaginalis* in 3 samples. These results ratify that the detection sensitivity of *T. vaginalis* is superior using a conventional PCR rather than the traditional method of diagnosis by direct microscopy. Additionally, the importance of a molecular diagnosis method is highlighted as a useful tool to detect *T. vaginalis* in asymptomatic women.

Key words: Trichomoniasis, *Trichomonas vaginalis*, PCR, ARNr 18S

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	11
1.1. Características del Parásito.....	13
1.2. Tricomoniasis.....	16
1.2.1. Distribución.....	14
1.2.2. Tratamiento.....	15
1.3. Patogénesis.....	15
1.4. Métodos de Diagnóstico.....	17
1.4.1. Métodos moleculares para detectar <i>T. vaginalis</i>	19
2. Justificación.....	20
3. Área de Estudio.....	21
4. Objetivos.....	21
4.1. Objetivo General.....	21
4.2. Objetivos Específicos.....	22
5. Materiales.....	22
5.1. Recolección y Almacenamiento de Muestras.....	22

5.2.Extracción de ADN.....	22
5.3.Amplificación de ADN.....	23
5.3.1. Gen de Beta-Actina.....	23
5.3.2. Región de ADN ribosomal 18S.....	24
5.3.3. Gen de Beta-tubulina.....	24
5.4.Electroforesis en Gel de Agarosa.....	25
5.5.Secuenciación y Análisis de Secuencias.....	25
6. Métodos.....	25
6.1. Recolección y Almacenamiento de Muestras.....	25
6.2.Extracción de ADN.....	26
6.3. Amplificación de ADN.....	27
6.3.1. Gen de Beta-Actina.....	27
6.3.2. Subunidad pequeña del ribosoma 18S.....	28
6.3.3. Gen de Beta-Tubulina.....	28
6.4. Electroforesis en Gel de Agarosa.....	28
6.5. Secuenciación.....	29
6.6. Análisis de Secuencias.....	29

7. Resultados.....	29
7.1. Colección de Muestras.....	29
7.2. Análisis molecular.....	31
7.2.1. Estandarización de la PCR.....	31
7.3. Secuenciación y Análisis de Secuencias.....	32
8. Discusión.....	31
9. Conclusiones.....	38
10. Recomendaciones.....	38
11. Referencias Bibliográficas.....	40
12. Tablas.....	46
13. Figuras.....	50
14. Anexos.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Detalle de las muestras que reportaron la presencia de algún microorganismo.....	46
Tabla 2. Reacción de PCR para la amplificación del gen de Beta Actina.....	47
Tabla 3. Condiciones de PCR en el termociclador para la amplificación del gen de Beta Actina.....	47
Tabla 4. Reacción de PCR para la amplificación de ADN ribosomal 18S.....	47
Tabla 5. Condiciones de PCR en el termociclador para la amplificación de ADN ribosomal 18S.....	48
Tabla 6. Reacción de PCR para la amplificación del gen de Beta-Tubulina.....	48
Tabla 7. Condiciones de PCR en el termociclador para la amplificación del gen de Beta Tubulina.....	48
Tabla 8. Información de muestras positivas para <i>T. vaginalis</i>	49
Tabla 9. Resultados de la secuenciación de las 5 muestras positivas para <i>T. vaginalis</i> utilizando el set de primers TV1-TV2.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de Vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	50
Figura 2. Mapa de la distribución mundial de <i>Trichomonas vaginalis</i>	51
Figura 3. Porcentaje de muestras de ADN que amplificaron B-Actina y que amplificaron positivo para <i>T. vaginalis</i> utilizando el set de primers TV1-TV2.....	51
Figura 4. Electroforesis en gel de Agarosa (1,5%) de la amplificación de un segmento del ADN ribosomal 18S de los controles positivos obtenidos en el centro de salud No 3 “La Tola”.....	52
Figura 5. Electroforesis en gel de Agarosa (1,5%) de la amplificación de un segmento del ADN ribosomal 18S a partir de hisopados cérvico-uterinos.....	52
Figura 6. Electroforesis en gel de Agarosa (1,5%) de la amplificación de un segmento del gen de Beta Tubulina a partir de hisopados cérvico uterinos.....	52
Figura 7. Picos de secuenciación claros en la muestra C2+ utilizando el set de primers TV1-TV2.....	53
Figura 8. Picos de secuenciación con ruido en la muestra C2+ utilizando el set de primers BTUB1-BTUB2.....	53
Figura 9. Secuencia de la muestra C2+ alineada con la accesión más similar en la aplicación BLAST del NCBI.....	53

INTRODUCCIÓN

1.1. Características del Parásito

Trichomonas vaginalis (*T. vaginalis*) es un protozooario flagelado unicelular de forma ovoide, pertenece a la clase *Parabasalia*, orden *Trichomonadida* (Uribarren Berrueta, 2015), tiene una longitud de 10 a 30 μm y de 10 a 18 μm de ancho. Su estructura se encuentra atravesada por un axostilo que parte del polo anterior y se extiende hasta el polo posterior, posee cuatro flagelos y una corta membrana ondulante que recubre a todo el trofozoito parasitario; ambas estructuras son responsables de su motilidad (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2010) . El núcleo celular de este parásito es grande, ovalado y bien localizado. (Castro Arteaga & González Cabrera, 2013). El ser humano es el único hospedero natural de *Trichomonas vaginalis*, la cual es capaz de sobrevivir y reproducirse en la mucosa de las vías urinarias y genitales tanto de hombres como mujeres. (Castro Arteaga & González Cabrera, 2013).

El trofozoíto de *T. vaginalis* crece en condiciones anaerobias, no produce quistes, su reproducción es por fisión binaria y se alimenta fagocitando bacterias y otras partículas. Este parásito puede sobrevivir en concentraciones bajas de oxígeno siempre y cuando la presión parcial de CO_2 sea la adecuada. Como consecuencia de su estilo de vida anaerobio, las que fueron alguna vez mitocondrias de *T. vaginalis* evolucionaron en una serie de orgánulos conocidos como hidrogenosomas, los cuales poseen una doble membrana, su metabolismo es básicamente anaerobio y producen hidrógeno molecular y ATP. (Kusdian & Gould, 2015). Por esta razón *T. vaginalis* ha desarrollado mecanismos sofisticados para prevenir la inactivación de enzimas como ferredoxinoreductasas y Fe-hidrogenasas y también para remover especies reactivas de oxígeno cuando los niveles de O_2 suben demasiado. Estos mecanismos comprenden la activación de enzimas como NADH-, NADPH-oxidases, súper-óxido dismutasas y peroxiredoxinas (Kusdian & Gould, 2015)

El ciclo de vida de *T. vaginalis* (Figura 1) empieza con un trofozoito en estado libre el cual es transmitido entre parejas sexuales. Dentro del hospedero, el periodo de incubación del patógeno toma entre 4 a 28 días, se reproduce por mitosis y adopta una forma ameboide para insertarse en el epitelio vaginal (Santos Diéguez, 2014). El trofozoito parasitario se puede transportar en secreciones como flujo vaginal, líquido seminal y orina. Su transmisión generalmente es por contacto sexual, aunque existen casos de infección mediante el uso de fómites. Este parásito no tiene forma de quiste (Diaz, Dessi, Dessole, Fiori, & Rappelli, 2010) y pueden llegar a establecer una simbiosis con *Mycoplasma hominis*, una bacteria del tracto genital inferior que está implicada en enfermedades inflamatorias pélvicas y complicaciones del embarazo. (Rappelli, et al, 2001)

El genoma de *T. vaginalis* contiene alrededor de 60.000 genes codificadores de proteínas, 1.100 genes de ARN ribosomal, y al menos 14.390 marcos de lectura transponibles (ORF). El borrador de la secuencia del genoma de *T. vaginalis* de 160Mb fue aislado y publicado en el 2007 como un conjunto muy fragmentado. En comparación con genomas de parásitos como *Entamoeba* (20Mb), *Plasmodium* (25 Mb), y *Toxoplasma* (63 Mb), el genoma de *T. vaginalis* es más grande. El tamaño inusual del genoma se da gracias a la gran cantidad de elementos transponibles, los cuales comprenden entre un cuarto a un tercio del genoma total (Conrad, Bradic, Warrin, Gorman, & Carlton, 2013), además *T. vaginalis* presenta secuencias repetitivas que abarcan hasta el 65% del genoma. Se piensa que el rol de las proteínas codificadas por estos elementos transponibles y secuencias repetitivas está relacionado con las diferencias en la capacidad de adherencia al epitelio cervical entre diferentes cepas, las diferencias entre infecciones masculinas y femeninas y entre infecciones sintomáticas y asintomáticas (Conrad, Bradic, Warrin, Gorman, & Carlton, 2013; Kusdian & Gould, 2015).

1.2. Tricomoniasis

La tricomoniasis causa síntomas en aproximadamente la mitad de las mujeres infectadas, se caracteriza por flujo vaginal, irritación e inflamación vulvar, y micro hemorragias cervicales puntiformes. Los hombres suelen permanecer asintomáticos, pero pueden sufrir inflamación de la uretra, secreción uretral y disuria. (Sherrard, et al, 2014). A pesar de que la tricomoniasis tiene una prevalencia tan alta como la clamidiasis y gonorrea, la investigación de este patógeno es descuidada en comparación con otros organismos causantes de infecciones de transmisión sexual (ITS) (Hobbs & Seña, 2013). Las infecciones de *T. vaginalis* están asociadas con enfermedad pélvica inflamatoria, resultados adversos en el embarazo, infertilidad, mayor incidencia de cáncer de próstata, y muchos estudios evidencian aumento en la transmisión de virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Brahmbhatt, et al, 2014; McClelland, et al, 2007).

En mujeres embarazadas se pueden dar complicaciones como: aborto, parto prematuro, ruptura prematura de membranas fetales, infección del feto y endometritis postparto. (Uribarren Berrueta, 2015)

Se piensa que *T. vaginalis* puede aumentar la incidencia de cáncer cérvico-uterino y cáncer de próstata ya que el metabolismo anaerobio de este parásito produce nitrosaminas, lo cual genera una fuerte respuesta inflamatoria por parte del sistema inmune del hospedero. (Lazenby, et al, 2014). Esta respuesta inflamatoria sumada al aumento de riesgo de contracción del virus de papiloma humano (HPV), son las principales causas del aumento de riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer en el futuro (Sutcliffe, et al, 2006; Lazenby, et al, 2014).

1.2.1. Distribución

La tricomoniasis es una enfermedad endémica o potencialmente endémica para todos los países del mundo y es la enfermedad de transmisión sexual no viral más recurrente a nivel mundial (GIDEON Informatics, 2015; CDC, 2014). La organización Mundial de la Salud (WHO) estima que en el 2008 existieron alrededor de 276,4 millones de casos de tricomoniasis alrededor del mundo. La prevalencia global de esta enfermedad ha sido estimada en 8,1% en mujeres y 1% en hombres. (Kissinger, 2015). Los sectores poblacionales con mayor riesgo para adquirir *T. vaginalis* son mujeres entre 20 y 40 años de edad con acceso limitado a cuidado médico e individuos que presentan comportamiento sexual riesgoso. En países en vías de desarrollo es común encontrar tasas de prevalencia de tricomoniasis tan altas como el 15% (Schmid, 2003). La CDC (Center for Disease Control and Prevention) estima que existen alrededor de 3,7 millones de personas que padecen tricomoniasis solo en Estados Unidos, dentro de las cuales la poblaciones de mujeres afroamericanas y mujeres de descendencia hispana se encuentran más afectadas. (CDC, 2014).

En el caso de Ecuador, un estudio realizado en la Clínica Humanitaria Fundación Pablo Jaramillo Crespo en Cuenca, en el cual se analizaron 150 muestras de secreciones vaginales provenientes de mujeres entre 18 y 45 años reportó un 2% de prevalencia de *Trichomonas vaginalis*. (Castro & González Cabrera, 2013). Otro estudio realizado en el Hospital gineco-obstétrico Enrique C. Sotomayor de la ciudad de Guayaquil, comparó a un grupo de mujeres adolescentes embarazadas con un grupo control de estatus socio-económico bajo. Esta publicación reportó una incidencia de 11,4% de *T. vaginalis* en el grupo de adolescentes versus 5% de incidencia en el grupo control y concluyó que el embarazo adolescente combinado con la presencia de infecciones cérvico-vaginales resultan en un aumento de riesgo de bajo peso neonatal y complicaciones en el labor de parto. (Hidalgo, Chedraui, & Chávez, 2005)

1.2.2. Tratamiento

El tratamiento para curar la tricomoniasis tiene como primera opción el uso de metronidazol. La guía publicada por la CDC indica que se puede administrar una dosis única de metronidazol de 2g o también se pueden administrar dosis de 500 mg cada 12 horas durante un periodo de 7 días, siendo esta última opción la más recomendable actualmente. Es importante señalar que el tratamiento debe ser recibido por ambos miembros de la pareja sexual. La CDC estima que existe de un 2.5% a un 5 % de resistencia a este fármaco y en este caso se considera como una opción el uso de tinidazol. (Uribarren Berrueta, 2015)

1.3.Patogénesis

Es importante mencionar que la patogenicidad de este parásito es multifacética ya que abarca tanto interacciones con el tejido del hospedador como con la microbiota del tracto urogenital. Todavía no se conocen todos los aspectos de su patogénesis pero se sabe que involucra mecanismos de adhesión, hemólisis y secreción de factores solubles (Petrin, Delgaty, Bhatt, & Garber, 1998).

Se conoce que *T. vaginalis* reacciona de forma dramática a la presencia de sus células blanco. En el epitelio vaginal, una vez que el parásito entra en contacto con la célula del hospedador, este cambia su morfología de forma de pera hacia una estructura ameboide. Este cambio también acarrea una serie de modificaciones en la expresión de factores de virulencia. La forma ameboide se adhiere fuertemente al epitelio celular formando muchas proyecciones citoplasmáticas que se entrelazan con la micro-vellosidad de las células blanco. (Fiori, Rapelli, & Addis, 1999). La adhesión del parásito al epitelio se encuentra mediado por cuatro adhesinas: AP65, AP51, AP33 y AP23. La expresión de estas moléculas de adhesión se encuentra en gran parte regulada por la concentración de hierro en su micro ambiente. (Arab-Mazar & Niyiyati, 2015). La capacidad de *T. vaginalis* para someterse a cambios morfológicos está directamente

relacionada con su virulencia (Kusdian & Gould, 2015). La morfogénesis de este parásito se da principalmente por la acción de la proteína alfa-actinina, la cual controla la redistribución de la actina a lo largo del parásito. Cuando *T. vaginalis* tiene forma de pera, la alfa-actinina se encuentra difusa por todo el citoplasma celular, esta distribución cambia radicalmente cuando el parásito se adhiere y toma forma ameboide (Fiori, Rapelli, & Addis, 1999).

La primera barrera que atraviesa este parásito es la matriz extra celular (ECM) de las células epiteliales humanas, esta barrera conforma una lámina basal interconectada por colágeno, fibras y polisacáridos. *T. vaginalis* hace uso de adhesinas y enzimas líticas para degradar la ECM, de esta forma también es posible que el protista pueda migrar a otras locaciones en su hospedador y unirse de forma directa a la membrana celular. (Kusdian & Gould, 2015).

Una vez que el protozoario ha hecho contacto con el tejido del hospedador, este es capaz de modificar las condiciones de su micro-ambiente mediante la regulación del pH, la temperatura y la concentración de Ca^{2+} . Cuando el parásito está en un ambiente con las condiciones ideales, empieza a producir proteínas formadoras de poros. Estas proteínas son capaces de insertarse en la bicapa lipídica de las células anfitrionas y formar canales transmembrana que producen muerte celular por lisis osmótica. (Fiori, Rapelli, & Addis, 1999). También se conoce que *T. vaginalis* secreta una serie de proteasas como un mecanismo para combatir el sistema inmune del hospedador. El parásito secreta cisteín-proteasas (CPs) que pueden degradar anticuerpos IgG e IgA y ECM. La síntesis de estas proteasas es a su vez regulada por factores ambientales como la concentración de hierro y poliaminas, pH y temperatura (Kusdian & Gould, 2015). En las épocas de menstruación se observa un fenómeno interesante, mientras que la sangre menstrual aporta complemento que resulta citotóxico para *T. vaginalis*, también aporta grandes cantidades de eritrocitos que son una fuente de hierro para el parásito. De esta forma aunque la cantidad de parásitos decrece durante la menstruación gracias a la acción del complemento, los

factores de virulencia que son mediados por la concentración de hierro aumentan la sintomatología durante esta época (Santos Diéguez, 2014). Las CPs secretadas por el parásito también tienen la capacidad de degradar la porción C3 del complemento y de esta forma puede evadir cierta destrucción mediada por el mismo (Petrin, Delgaty, Bhatt, & Garber, 1998).

Otro de los aspectos importantes en la patogenicidad de *T. vaginalis* es su interacción con la flora vaginal. Por ejemplo, la presencia de flora bacteriana no patógena como *Lactobacillus acidophilus* puede causar inhibición de la adhesión de este parásito, (Arab-Mazar & Niyyati, 2015) pero cuando el pH de la vagina aumenta, se reduce la población de *Lactobacillus* y *T. vaginalis* empieza a secretar proteínas similares a perforinas que forman agujeros en las células del hospedero y de la flora vaginal (Petrin, Delgaty, Bhatt, & Garber, 1998). Este mecanismo de hemólisis es usado para lisar y fagocitar linfocitos, monocitos, levaduras y bacterias como *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Pseudomonas*. (Kusdian & Gould, 2015).

Se conoce que ciertos virus de cadena doble de ARN (dsRNA) pueden infectar a *T. vaginalis* y causar implicaciones en su patogénesis y expresión de factores de virulencia. La infección por estos virus causa cambios fenotípicos como el aumento en la regulación y síntesis de cisteín-proteasas y cambios morfológicos de las proteínas inmunogénicas. Aislamientos compuestos por *Trichomonas vaginalis* virus-negativo se denominan "tipo I", mientras que aquellos con parásitos virus-positivo se denominan "tipo II". (Wendel, Rompalo, Erbeling, Chang, & Alderete, 2002).

1.4.Métodos de Diagnóstico

Dado que las manifestaciones clínicas de tricomoniasis no son específicas y la infección es generalmente asintomática, el diagnóstico adecuado y correcto de *T. vaginalis* requiere de

pruebas de laboratorio apropiadas. Las técnicas de detección de este microorganismo comprenden básicamente 4 categorías: microscopía directa, cultivo del parásito, pruebas moleculares serológicas y técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (Hobbs & Seña, 2013).

La evaluación por microscopía directa de secreciones vaginales con solución salina es la técnica de diagnóstico más común para detectar infecciones por *T. vaginalis* en mujeres. Esta técnica es 100% específica para *T. vaginalis* y su sensibilidad de detección se encuentra entre el 44% al 68%. Hay que tomar en cuenta que la sensibilidad de esta prueba se reduce significativamente con tiempos de espera tan cortos como 10-30 minutos (Garber, 2005; Hobbs & Seña, 2013).

Las técnicas de cultivo usan medios especiales y son incubadas a 37°C por un periodo de 5 días, donde cada día se toma una muestra para ser analizada bajo el microscopio. La especificidad de este método es del 100% y su sensibilidad tiene un rango que va del 44% al 75%. (Hobbs & Seña, 2013).

Las pruebas serológicas tienen la ventaja de ser muy rápidas, su uso generalmente no requiere de entrenamiento especializado y su sensibilidad va del 40% al 95%. Estas pruebas utilizan anticuerpos que se unen a un antígeno específico de *T. vaginalis* y son capaces de cambiar de coloración si son positivos (Santos Diéguez, 2014).

Finalmente, las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos son altamente específicas y su sensibilidad va del 76% al 100%. Su alta sensibilidad se da gracias a que se utilizan sondas de nucleótidos específicas para una región del genoma del organismo de interés. (Bachmann, et al, 2011). Estas técnicas pueden resultar muy importantes para detectar infecciones en pacientes asintomáticos en los cuales existe baja cantidad de *Trichomonas vaginalis*. Las desventajas de las pruebas moleculares es que se necesita de personal calificado, su tiempo de espera puede

ser mayor a 48 horas y requiere de instrumentación especializada y costosa. (Hobbs & Seña, 2013). Una tabla que resume las características de estas técnicas se encuentra en el (Anexo 1).

El método de diagnóstico considerado como el estándar de oro para detectar *T. vaginalis* es el cultivo del patógeno (Association of Public Health Laboratories, 2013). Existen medios de cultivos comerciales como “InPouch TV” (Biomed) que permiten el crecimiento de *Trichomonas vaginalis* en un medio selectivo que inhibe el crecimiento de bacterias y levaduras. Este sistema no requiere la preparación de una placa en fresco para visualizar los parásitos y permite realizar cultivos a partir de secreciones vaginales, líquido seminal y orina. (Association of Public Health Laboratories, 2013; Biomed Diagnostics, 2015).

A pesar de que muchos métodos moleculares de diagnóstico de tricomoniasis han sido descritos como altamente sensibles y específicos, probablemente el cultivo del protozoo se mantenga como el gold standard para la identificación de *T. vaginalis*. Esto se debe a la incapacidad de dichos métodos de preservar microorganismos viables, los cuales son indispensables para realizar pruebas de resistencia a fármacos en casos de infecciones persistentes. (Hobbs & Seña, 2013)

1.4.1. Métodos moleculares para detectar *T. vaginalis*

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs) tienen una sensibilidad de detección inherentemente mayor a los métodos tradicionales de diagnóstico como microscopía, cultivo y detección de antígenos (Hobbs & Seña, 2013). Actualmente se han descrito y validado varios ensayos de PCR para la detección de *T. vaginalis* en varios laboratorios. Existen estudios donde se han probado reacciones de PCR convencional y en tiempo real, por ejemplo, Caliendo y colaboradores realizaron una PCR en tiempo real para detectar *T. vaginalis*. En este estudio la sensibilidad de la prueba fue del 100% y la especificidad fue de 99,6%. (Caliendo , et al,

2005). En el año 2011 la “Food and Drug Administration” (FDA) de los Estados Unidos aprobó la prueba comercial in vitro APTIMA (Hologic Gen-Probe Inc) para detección de *T. vaginalis*. Esta es una prueba de amplificación mediada por transcripción (TMA), reporta una sensibilidad de detección del 100% y especificidad de 99%. (Schwebke, et al, 2011).

La presente investigación aplica el uso de una PCR convencional utilizando dos pares de primers para la detección de *Trichomonas vaginalis* a partir de hisopados cérvico-uterinos. Se logró confirmar la presencia de *T. vaginalis* en las muestras mediante la secuenciación de los productos de PCR.

JUSTIFICACIÓN

Existe una alta prevalencia de *T. vaginalis* que se concentra en países en vías de desarrollo y en especial en sectores socioeconómicos desatendidos. (Prakash Dwivedi S. , Husain, Singh, & Malla, 2012). Es importante mencionar que las infecciones con *T. vaginalis* son asintomáticas en 10 al 50% de las mujeres infectadas y este porcentaje aumenta aún más en hombres (Prakash Dwivedi S. , Husain, Singh, & Malla, 2012).

En Ecuador no existen muchos estudios que se enfoquen en infecciones por *T. vaginalis*, y tampoco se ha establecido un protocolo de detección molecular específico para este parásito. Tradicionalmente, se diagnostica en base a síntomas clínicos, pero como ya se mencionó, cerca del 50% de los casos de infección por *T. vaginalis* son asintomáticos o varían de persona a persona. Existen métodos de laboratorio para detección de *T. vaginalis* como las preparaciones en fresco que tienen una sensibilidad de detección de hasta el 68% pero dependen de la experiencia del analista. Por otro lado, los cultivos de este protozooario pueden llegar a ser más sensibles pero requieren de mayor cantidad de tiempo, su costo es elevado, son susceptibles a contaminación y requieren una cantidad mínima de parásitos para que el cultivo sea viable. (Prakash Dwivedi S. , Husain, Singh, & Malla, 2012)

Los métodos de detección molecular basados en PCR para *Trichomonas vaginalis* han demostrado ser altamente sensibles y específicos por lo que pueden ser implementados en el laboratorio de Microbiología de la USFQ para realizar análisis de rutina a pacientes ambulatorios que asisten tanto a los Sistemas Médicos Universidad San Francisco de Quito como a la Clínica de Especialidades Tumbaco y determinar si son portadores de este protozoario. De esta forma los pacientes pueden recibir diagnóstico oportuno, un tratamiento adecuado y se pueden prevenir complicaciones más graves como las anteriormente mencionadas.

ÁREA DE ESTUDIO

Las secreciones cérvico-uterinas utilizadas para este estudio fueron provistas por los Sistemas Médicos Universidad San Francisco de Quito a través de todas sus sucursales: Matriz campus Cumbayá, sucursal Valle de los Chillos, sucursal Carcelén, sucursal La Carolina y además también se procesaron muestras provenientes de la Clínica de Especialidades Tumbaco. Se procesaron todas las muestras sin discriminación de edad que llegaron entre julio de 2014 y marzo del 2015 hasta completar cien muestras. Los datos de las pacientes fueron anónimos por lo que no se obtuvo el consentimiento informado de las mismas. La extracción de ADN de las muestras, así como su análisis molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito (Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales), Cumbayá-Ecuador.

OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Detectar *Trichomonas vaginalis* mediante pruebas moleculares a partir de hisopados cérvico-uterinos de pacientes ambulatorios que asisten a dos centros de atención ambulatoria.

4.2. Objetivos específicos

Estandarizar la PCR de los dos genes con un control positivo de referencia para comparar las muestras positivas obtenidas en el transcurso del estudio.

Confirmar la presencia de *T. vaginalis* con la secuenciación de productos de PCR de los segmentos de ADN correspondientes a los genes de Beta tubulina y 18S.

MATERIALES

5.1. Recolección y Almacenamiento de Muestras

- Muestras de Hisopados cérvico-uterinos
- Tubos de ensayo plásticos de 5ml con tapa
- PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 1.4mM KH₂PO₄, pH7).
- Centrífuga (Gemmy PLC 05)
- Micropipeta 1ml (Boeco)

5.2. Extracción de ADN

- PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 1.4mM KH₂PO₄, pH7)
- CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4M, EDTA 20Mm pH 8, HCl 100Mm pH 8)
- Proteinasa K (Invitrogen)
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)
- Etanol al 100%
- Etanol al 70%
- Buffer TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 0.1mM EDTA)
- Tubos eppendorf 1,5ml

- Micropipetas (Boeco)
- Baño de arena
- Micro centrífuga Eppendorf ®
- Vortex (Labnet)

5.3. Amplificación de ADN

5.3.1. Gen de Beta-Actina

- H₂O grado PCR
- Buffer 5X
- MgCl₂ 25mM
- dNTPs 2mM
- Primer B-Actina Forward 10uM (5' ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA3')
- Primer B-Actina Reverse 10uM (5' CGG AAC CGC TCA TTG CC3')
- Taq Polimerasa (GoTaq®)
- ADN
- Termociclador (Biorad)
- Tubos eppendorf de 0,2ml
- Micropipetas (Labnet)

5.3.2 Región de ADN ribosomal 18S

- H₂O grado PCR
- Buffer 5X
- MgCl₂ 25mM
- dNTPs 2mM
- Primer TV1 10uM (5' TAA TGG CAG AAT CTT TGG AG 3')

- Primer TV2 10uM (5' GAA CTT TAA CCG AAG GAC TTC 3')
- Taq Polimerasa (GoTaq®)
- ADN
- Termociclador (Biorad)
- Tubos eppendorf de 0,2ml
- Micropipetas (Labnet)

5.3.3. Gen de Beta-tubulina

- H₂O grado PCR
- Buffer 5X
- MgCl₂ 25mM
- dNTPs 2mM
- Primer BTUB1 10uM(5' GGA CAG TGC GGT AAC CAA AT T 3')
- Primer BTUB2 10uM (5' GAA CTT TAA CCG AAG GAC TTC 3')
- Taq Polimerasa 5U/ul (GoTaq®)
- ADN
- Termociclador (Biorad)
- Tubos eppendorf de 0,2ml
- Micropipetas (Labnet)

5.4. Electroforesis en Gel de Agarosa

- Cámara de electroforesis horizontal (marca)
- TBE 1X
- Agarosa
- Bromuro de etidio 1%

- Amplicones (TV1-TV2; BTUB1-BTUB2)
- Ladder 100pb (Invitrogen)
- Micropipetas (Painin)
- Balanza analítica
- Microondas

5.5. Secuenciación y Análisis de Secuencias

- Amplicones TV1-TV2
- Amplicones BTUB1-BTUB2
- Programa MEGA 6

MÉTODOS

6.1. Recolección y Almacenamiento de Muestras

Las secreciones cérvico-uterinas utilizadas para este estudio fueron provistas por los Sistemas Médicos Universidad San Francisco de Quito a través de todas sus sucursales: Matriz campus Cumbayá, sucursal Valle de los Chillos, sucursal Carcelén, sucursal La Carolina y además también se procesaron muestras provenientes de la Clínica de Especialidades Tumbaco. Se elaboró una tabla (tabla 1), donde se indica la procedencia de la muestra: MR para muestras provenientes de la Clínica de Especialidades Tumbaco y CU para identificar a las muestras de los Sistemas Médicos Universidad San Francisco de Quito, edad de la paciente, fecha de recolección y si el reporte microbiológico indica presencia de *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* y *Candida no albicans*.

Los hisopados cérvico-uterinos fueron transportados en medio de Cary Blair hasta el laboratorio donde se realizó un cultivo previo en los medios de agar sangre humana, agar chocolate y Mackonkey lactosa. Después se sumergió el hisopo completamente en un tubo de ensayo

plástico de 5ml con medio PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 1.4mM KH₂PO₄, pH7) y se agitó vigorosamente para desprender la mayor cantidad de material en el tubo. Posterior a esto, se centrifugó el tubo a 8000 rpm por 10 minutos, a continuación se desechó el sobrenadante y se añadió 3ml más de medio PBS 1X para lavar el pellet. Se centrifugó nuevamente el tubo a 8000 rpm por 10 minutos y se desechó una vez más el sobrenadante. Cada lavado permitió eliminar residuos de inhibidores de los medios de cultivo por los que pasó el hisopo. Finalmente se guardó el tubo con el pellet debidamente rotulado en una congeladora a -20°C.

6.2. Extracción de ADN

Primero se colocó 1000 µl de PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 1.4mM KH₂PO₄, pH7) en el tubo que contenía la muestra y se realizó un lavado con esta solución. Luego se centrifugó la muestra a 8000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se transfirió el pellet a un tubo eppendorf de 1ml. Posteriormente se agregó 700 µl de CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4M, EDTA 20Mm pH 8, HCl 100Mm, pH 8) y 5µl de Proteinasa K. Esta solución se incubó por al menos 2 horas a 65°C, agitando cada 15 minutos para facilitar la ruptura de las membranas celulares. Después de la incubación se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se agregó 700 µl de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló invirtiendo el tubo hasta formar una emulsión y luego se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos. Se obtuvo dos fases, la inferior u orgánica (cloroformo/alcohol isoamílico) y la superior u acuosa con el ADN en suspensión. A continuación se transfirió 500µl de la fase superior a un nuevo eppendorf rotulado, sin tocar la interfase para evitar contaminar la muestra con proteínas celulares. Seguidamente se agregó 1000 µl de etanol al 100% a -20°C y la muestra se dejó toda la noche en un congelador a -20°C.

El siguiente día se centrifugó la muestra a 12000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante cuidadosamente. En seguida se lavó el pellet que contiene el ADN con 1000 µl de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Finalmente se dejó el tubo eppendorf boca abajo sobre papel absorbente por 15-20 minutos para que se evapore el etanol y una vez seco se re suspendió la muestra en 50 µl de buffer TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 0.1mM EDTA) y se almacenó en un congelador a -20°C.

6.3. Amplificación de ADN

6.3.1. Gen de Beta Actina

Como control interno, se amplificó una región de 289 pb del Exón III del gen de Beta actina humana. Los primers utilizados para la amplificación de este segmento fueron: B-Actina Forward: 5'ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA3' y B-Actina Reverse: 5'CGG AAC CGC TCA TTG CC 3'. El volumen final de cada reacción fue 20 µl, para la cual se utilizó 2 µl de ADN. Las condiciones de PCR están descritas en la tabla 2 y en la tabla 3.

Las muestras que no amplificaron B-actina la primera vez fueron sometidas a un nuevo lavado con alcohol al 70% con el fin de eliminar posibles compuestos inhibitorios de la PCR. Posteriormente se volvió a realizar la amplificación de este gen en las muestras que no presentaron banda la primera vez.

6.3.2. Subunidad pequeña del ribosoma (18S)

Se amplificó una región de 312 pb del gen de ARN Ribosomal 18S de *Trichomonas vaginalis*. Los primers utilizados para la amplificación de este segmento fueron: TV 1: 5' TAA TGG CAG AAT CTT TGG AG 3' y TV2: 5' GAA CTT TAA CCG AAG GAC TTC 3'. El volumen final de cada reacción fue 20 µl, para la cual se utilizó 2 µl de ADN. Las condiciones de PCR están descritas en la tabla 4 y en la tabla 5

6.3.3. Gen de Beta-Tubulina

Se amplificó una región de 198 (pb) de una región bien conservada del gen de beta-tubulina de *Trichomonas vaginalis*. Los primers utilizados para la amplificación de este segmento fueron BTUB 1: 5' GGA CAG TGC GGT AAC CAA AT T 3' y BTUB 2: 5' GAA CTT TAA CCG AAG GAC TTC 3'. El volumen final de cada reacción fue 20 µl, para la cual se utilizó 3 µl de ADN. Las condiciones de PCR están descritas en la tabla 6 y en la tabla 7.

6.4. Electroforesis en Gel de Agarosa

Se realizó electroforesis en gel de Agarosa (concentración 1.5%) con bromuro de etidio (0,01%) para visualizar los productos de la PCR. Como primer paso se armó la cámara de electroforesis horizontal. A continuación se pesó 1g de agarosa y se colocó en un Erlenmeyer, se agregó 70ml de buffer TBE 1X y se calentó la mezcla en el microondas para que esta se disuelva. Una vez que la agarosa se disolvió completamente, se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente y luego se añadió 0,7 µl de bromuro de etidio, se homogenizó la solución y se vertió la misma sobre el molde de la cámara de electroforesis. Después se dejó polimerizar la agarosa hasta que se solidifique, se retiró el peine y se vertió 700ml de TBE 1X reciclado en la cámara de electroforesis hasta que cubra por completo el gel. Finalmente se cargó 4 ul de cada muestra por pocillo y también se cargó un ladder de 100pb (invitrogen). La electroforesis se realizó a 90V y 200mA por 40 minutos.

6.5. Secuenciación

Se envió las muestras positivas para su secuenciación al laboratorio Functional Biosciences, localizado en Wisconsin, Estados Unidos. Se envió un total de diez muestras con un volumen final de 40ul cada una: cinco productos de PCR correspondientes a los primers TV1-TV2 y cinco productos de PCR correspondientes a los primers BTUB1-BTUB2. Dentro de las cinco muestras se incluyó dos controles positivos: C1+ y C2+.

6.6. Análisis de Secuencias

Se utilizó el programa MEGA6.0 para realizar los alineamientos correspondientes para cada set de primers. Cuando se obtuvo la secuencia final, se procedió a realizar una búsqueda de la misma con la ayuda de la aplicación en línea BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI. El programa compara estas secuencias con accesiones del Genbank para finalmente determinar la identidad de los fragmentos secuenciados en base a un porcentaje de similitud y un valor de confianza E que representa la probabilidad de que esa secuencia se una a un molde de ADN al azar.

Para el set de primers TV1-TV2, se realizó un alineamiento de cada una de las secuencias de las muestras en el programa MEGA 6 y luego se realizó un BLAST donde se optimizó la búsqueda para secuencias altamente similares y se la comparó con bases de datos de nucleótidos no redundantes.

Con los primers BTUB1-BTUB2 se pudo realizar una alineación manual con la ayuda del programa MEGA 6 y obtener secuencias consenso para las muestras TV 36 y C2+. Estas secuencias se utilizaron para realizar un BLAST donde se optimizó la búsqueda para secuencias algo similares y se las comparó con bases de datos de nucleótidos no redundantes.

RESULTADOS

7.1. Colección de Muestras

Se colectó un total de 100 muestras (TV001-TV100) de hisopados cérvico-uterinos provenientes de las diferentes sucursales de los Sistemas Médicos Universidad San Francisco de Quito y de la Clínica de Especialidades Tumbaco.

De las 100 muestras, 24 provinieron de la Clínica de Especialidades Tumbaco (MR) y 76 muestras fueron obtenidas de las diferentes sucursales de los Sistemas Médicos USFQ. Se

reportó 14 muestras con presencia de *Gardnerella vaginalis* (14%), 12 muestras presentaron *Candida albicans* (12%), dos muestras reportaron presencia de *Candida no albicans* (2%) y tres muestras presentaron *Trichomonas vaginalis* (3%) (Tabla 1). En total 25 muestras (25%) de la población presentaron algún microorganismo que posiblemente esté causando una infección vaginal. De estas 25 muestras, 7 (28%) provinieron de la Clínica de Especialidades Tumbaco y 18 muestras (72%) provinieron de la red de Sistemas Médicos de la Universidad San Francisco de Quito. A su vez, las 7 muestras que reportaron presencia de algún microorganismo corresponden al 29% del total de muestras que provinieron de la Clínica de Especialidades Tumbaco, mientras que las 18 muestras representan el 23,7% de las 76 muestras provenientes de los Sistemas Médicos USFQ.

El 5% de las muestras reportó la presencia de al menos dos microorganismos, siendo la asociación *Gardnerella-Candida sp* la más común. Una muestra presentó tres microorganismos (*T. vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* y *Candida albicans*) y otra mostró la presencia de *T. vaginalis* con *C. albicans*.

7.2. Análisis molecular

Se logró la amplificación del gen de Beta Actina en 97 de las 100 muestras. Tres muestras no presentaron banda. (Figura 3).

7.2.1 Estandarización de la PCR

La estandarización de la prueba molecular se realizó con 2 controles positivos obtenidos del centro de salud No 3 “La Tola” de la ciudad de Quito. Las muestras de secreciones vaginales fueron conservadas en solución salina hasta transportarse al Laboratorio de Microbiología de la USFQ. En el Laboratorio se realizó una placa en fresco de cada muestra y se confirmó la presencia de trofozoitos parasitarios mediante el microscopio.

Se amplificó el gen de ADN ribosomal 18S en los dos controles positivos (C1+, C2+) con el set de primers TV1-TV2. Se aumentó la temperatura de annealing en 5 grados centígrados con respecto al paper de referencia reportado por Prakash Dwivedi. La electroforesis de los amplicones reveló una banda que coincide con el tamaño esperado de 312pb (figura 4).

Se obtuvo 3 muestras positivas que corresponden a TV36, TV46 y TV92 cuando se utilizó el set de primers TV1-TV2 (Figura 5) que amplificaron una banda de 312 pb. De estas solamente TV36 y TV92 amplificaron una banda de 198 pb con los primers BTUB1-BTUB2 (figura 6)

7.3. Secuenciación y Análisis de Secuencias

Del total de las 10 muestras positivas enviadas para su secuenciación, se obtuvo secuencias claras para 5 muestras (C1+, C2+, TV-36, TV-46 y TV-92) amplificadas con el set de primers TV1-TV2 (figura 7). El tamaño de la secuencia alineada para este set de primers estuvo entre 264 nucleótidos en la muestra TV-46 y 269 nucleótidos alineados en la muestra C2+. Los porcentajes de identidad estuvieron entre el 99% y el 100% y los valores E fueron bastante bajos con rangos entre $7e-129$ y $2e-135$. (Tabla 9).

Se obtuvieron espectros de secuencias poco claros cuando se utilizó el set de primers BTUB1-BTUB2 (Figura 8). El porcentaje de identidad para TV-36 fue del 89% y su valor E fue de $6e-24$, mientras que para la muestra C2+, su porcentaje de identidad fue del 87% y su valor de confianza E fue de $3e-19$. (Tabla 9).

DISCUSIÓN

En el Ecuador así como en muchos países alrededor del mundo, la tricomoniasis es una infección desatendida. En el país no existen muchos datos epidemiológicos que se enfoquen en infecciones causadas por *T. vaginalis*. Sin embargo, se conoce que esta infección tiene una tasa de prevalencia más alta en mujeres que presentan sintomatología de vaginosis (Kissinger,

2015). En el presente estudio se evidenció que el **3,09%** de las muestras estaban infectadas con *T. vaginalis*. El rango de edad de las mismas estuvo entre 2 años y 36 años. Estos resultados se relacionan con estudios previos hechos en la Clínica Humanitaria Fundación Pablo Jaramillo Crespo en Cuenca, donde se reportó un 2% de prevalencia de *T. vaginalis* en mujeres sintomáticas y asintomáticas entre 18 y 45 años (Castro Arteaga & González Cabrera, 2013), y en Guayaquil, donde se reportó porcentajes de prevalencia de *T.vaginalis* del 11,4% y 5% para dos grupos diferentes de mujeres con sintomatología de vaginosis (Hidalgo, Chedraui, & Chávez, 2005).

Las tasas más altas de infección por *T. vaginalis* se encuentran en mujeres entre la edad de 20 a 40 años, se piensa que la causa de este fenómeno es porque la tricomoniasis no tratada puede convertirse en una condición crónica (Cudmore & Garber, 2010). En el presente estudio se encontró que las edades de las pacientes infectadas con *T. vaginalis* fueron de 20 años, 36 años y 2 años (Tabla 1). Tomando en cuenta que la paciente de 2 años de edad es un caso poco frecuente, las otras dos muestras que fueron positivas están dentro del grupo de mujeres en edad fértil y probablemente sexualmente activas, este es el grupo que reporta el mayor porcentaje de riesgo de contraer tricomoniasis y otras ITS de acuerdo a la literatura. (Schmid, 2003). Las infecciones por *T. vaginalis* en infantes son casos poco comunes y muchos de ellos se relacionan con bajos estándares de higiene y sanitación. También es posible que la madre del infante sea la fuente de infección, es importante recalcar que la madre puede permanecer asintomática y generalmente cuando la madre embarazada no presenta síntomas de infección vaginal, no se realizan pruebas para detectar *T. vaginalis* (Littlewood & Kohler, 1966).

El método de diagnóstico más usado en el Ecuador y alrededor del mundo para detectar *T. vaginalis* es la visualización de este parásito a través de placas en fresco por microscopía directa. Este método de detección tiene una sensibilidad baja que se debe principalmente a la pérdida de motilidad del parásito conforme pasa el tiempo (Hobbs & Seña, 2013). A las

muestras de hisopados cérvico-uterinos que llegan al Laboratorio de Microbiología se les realizan varios análisis con el fin de encontrar un posible microorganismo patógeno, uno de estos análisis es realizar una placa de tinción GRAM en fresco de la secreción para su observación bajo el microscopio. En el caso de este estudio, estas muestras de hisopados cérvico-uterinos pueden permanecer en espera hasta por 24 horas antes de ser procesados en el laboratorio, tiempo que es suficiente para que muchos microorganismos parasitarios mueran o pierdan gran parte de su motilidad y por lo tanto no puedan ser observados en la placa en fresco. Esta investigación evidenció que este método tradicional de diagnóstico usado en el laboratorio de Microbiología puede pasar por alto muestras positivas para *T. vaginalis*. En este caso no se reportó la presencia de *T. vaginalis* en ninguna de las 100 muestras que fueron analizadas bajo microscopía directa, mientras que la prueba molecular de amplificación de ácidos nucleicos mostró la presencia del parásito en tres muestras como se puede observar en la (tabla 10).

Cuando se amplificó la región de ARNr 18S con los primers TV1-TV2, es importante señalar que se aumentó la temperatura de annealing de 52°C del protocolo de referencia (Prakash Dwivedi S. , Husain, Singh, & Malla, 2012) a 57°C para evitar la amplificación de bandas no específicas como se muestran en el (Anexo 3). Esta temperatura de annealing elevada está de acuerdo a un estudio realizado por Mayta y colaboradores que también utilizó el set de primers TV1-TV2 para amplificar el gen 18S de *T. vaginalis* y reporta un protocolo de amplificación con una temperatura de annealing de 58°C. (Mayta, et al, 2000). De esta forma se obtuvo una amplificación sin bandas inespecíficas.

Cuando se realizó la secuenciación de los productos de PCR con este set de primers se obtuvo secuencias claras. Al comparar esta secuencia con las accesiones del genbank, se observa que se está amplificando una región de ADN que codifica para ARN ribosomal 18S. Este gen tiene una longitud de 1500 nucleótidos y la amplificación con el set de primers TV1-TV2 tiene lugar entre la posición 840 a 1110 de este gen (Figura 9). La correcta amplificación de esta región de

ADN se puede dar gracias a que los genes ribosomales tales como 5.8S, 18S y 28S se encuentran bien conservados intra-específicamente y existe alta repetitividad de los mismos a lo largo del genoma de *T. vaginalis*. (Mayta, et al, 2000). Para probar la especificidad de estos primers sería interesante realizar pruebas de amplificación con este par de cebadores de otras especies pertenecientes al género *Trichomonas*, por ejemplo, *Trichomonas tenax* que es un parásito que se puede encontrar en la cavidad bucal de las personas. De esta forma se podría determinar qué tan específico es este par de primers para detectar únicamente a *Trichomonas vaginalis* y no a otras especies del mismo género (Mayta, et al, 2000).

El set de primers BTUB1-BTUB2 que se utilizó en la presente investigación fue diseñado para amplificar regiones bien conservadas y específicas de los 3 genes (btub1, btub2 y btub3) que codifican la secuencia de aminoácidos para producir la proteína Beta tubulina presente en *T. vaginalis*. (Madico, Quinn, Rompalo, Mckee, & Gaydos, 1998; Prakash Dwivedi S. , Husain, Singh, & Malla, 2012). Sin embargo, cuando se realizó la secuenciación de estas muestras se obtuvo secuencias con ruido. Este fenómeno puede darse ya sea por la existencia de fragmentos homólogos de beta tubulina pertenecientes a otros organismos que fueron amplificados al usar primers que no fueron tan específicos para este patógeno o también porque existe variación en los genes de Beta tubulina entre cepas diferentes de *T. vaginalis* (Mayta, et al, 2000). Un estudio conducido por Madico y colaboradores también amplificó una región de los genes de beta tubulina de *T. vaginalis* y utilizó los primers BTUB 9: 5' CAT TGA TAA CGA AGC TCT TTA CGA T 3' (posición 850 a 874); y BTUB 2: 5' GCA TGT TGT GCC GGA CAT AAC CAT 3' (posición 961 a 938). Este último set de primers difiere más con las regiones de beta tubulina de organismos como *Homo sapiens* y *G. lamblia* y por lo tanto son teóricamente más específicos que los usados en este estudio. (Madico, Quinn, Rompalo, Mckee, & Gaydos, 1998). Ya que este set de primers no amplificó una de las muestras que si fue positiva cuando

se amplificó el gen 18S, se puede concluir que la sensibilidad de detección de los primers BTUB1-BTUB2 fue menor que la de los primers TV1-TV2.

La tricomoniasis, candidiasis y vaginosis bacteriana son responsables del 90% de los casos de vaginitis con origen infeccioso. Una revisión conducida por Adad y colaboradores en el 2001 encontró que los estudios realizados en las últimas cuatro décadas han encontrado tasas de infección por *Gardnerella vaginalis* que varían del 8% al 75%, *Candida albicans* ha presentado tasas que van desde el 2,2% al 30% y porcentajes de infección por *Trichomonas vaginalis* que van entre cero y 34% (Adad, et al, 2001). En esta misma revisión se indica que la prevalencia en un Laboratorio privado en Belo Horizonte, Brasil, la tasas de infección por *Gardnerella* tuvieron una frecuencia de 14,1%, *Candida albicans* 6,9% y *T. vaginalis* 1,1%. Las infecciones bacterianas se producen cuando existe una alteración de la flora vaginal normal comúnmente compuesta por *Lactobacillus*. En estos casos, existe una proliferación abundante de organismos anaerobios como *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides sp*, *Peptostreptococcus*, *Molibuncus sp*. (Adad, et al, 2001). La vaginosis bacteriana no se transmite por contacto sexual pero es un factor de riesgo que aumenta la probabilidad de contraer enfermedades de transmisión sexual como la tricomoniasis. (Vaca, et al, 2009). Los resultados del presente estudio se enmarcan de acuerdo a lo reportado por la literatura, se encontró que el agente más común que puede estar causando una infección cérvico-vaginal es *Gardnerella vaginalis*, seguido por *Candida sp* y *Trichomonas vaginalis*, juntos, estos tres agentes infecciosos conformaron el 25% del total de hisopados cérvico uterinos que llegaron al Laboratorio de Microbiología de la USFQ. Estos resultados se apegan a la hipótesis que las infecciones vaginales muchas veces tienen más de un agente etiológico y que existe una compleja red de interacciones que todavía no se comprende muy bien entre los microorganismos causantes de infecciones vaginales (Adad, et al, 2001).

El nivel socio económico de la población también es un factor predisponente para encontrar altas tasas de ITS. Las razones de esta alta prevalencia en sectores rurales son la falta de conciencia en la población, bajas tasas de alfabetización, nivel socioeconómico bajo, falta de higiene personal y falta de un comportamiento adecuado en la búsqueda de tratamiento (Brij, Megha, Naiya, & D. R. Arora, 2014). En la presente investigación se tomaron muestras que provinieron de dos centros de atención médica. Por un lado, la red de sistemas médicos de la USFQ atiende a pacientes ambulatorios generalmente pertenecientes a un área urbana y de un sector socioeconómico estable. En contraste, la Clínica de Especialidades Tumbaco atiende a pacientes que pueden provenir de un área sub urbana e incluso rural donde el nivel socioeconómico de las personas atendidas puede ser menor que aquellas que acuden a la red de sistemas médicos de la USFQ. Esta diferencia se puede ver reflejada en los resultados ya que las 7 muestras provenientes de la Clínica de Especialidades Tumbaco que reportaron presencia de algún microorganismo representan el 30% del total de muestras que provinieron de dicho centro. Este porcentaje es mayor al representado por las 18 muestras que provinieron de la red de sistemas médicos de la USFQ y que corresponden al 23,7% del total de muestras provenientes del mismo.

En países desarrollados o en sectores socio económicos más estables, la gente tiene fácil acceso a centros de atención médica y por lo general acude al doctor tan pronto como sientan malestar abdominal o malestar en el tracto urogenital. Al contrario, en sectores socio económicos desatendidos, generalmente la gente no busca atención médica a menos que los síntomas de la enfermedad sean muy graves. Asimismo, los centros médicos de estos sectores suelen carecer de recursos técnicos y económicos para realizar pruebas específicas para la detección de patógenos por lo cual generalmente a los pacientes que presentan síntomas de infección del tracto genitourinario se les receta antibióticos apropiados para tratar la causa más probable de

infección. Esta forma de tratamiento empírica no es la adecuada para reducir la tasa de prevalencia de *T. vaginalis* ya que los antibióticos recetados son inefectivos para tratar a este protozoo. El tratamiento basado solo en síntomas falla cuando existen infecciones asintomáticas e incluso cuando existe tricomoniasis ya que sus síntomas tales como malestar abdominal, descarga urogenital y uretritis son muy parecidos a los síntomas provocados por bacterias u hongos. De esta forma los pacientes con tricomoniasis que son asintomáticos y aquellos que fueron tratados con antibióticos pueden permanecer como reservorio del parásito por mucho tiempo. (Cudmore & Garber, 2010).

En este estudio fue posible extraer ADN genómico de buena calidad al utilizar el método de CTAB. Es importante mencionar que en algunas de las muestras de ADN fue necesario realizar un segundo lavado con etanol al 70% ya que no amplificaron ninguna banda al utilizar los primers Beta-Actina Forward y Reverse. Este fenómeno puede ser explicado en gran parte por la utilización del hisopo para sembrar la muestra en medios de cultivo antes de ser utilizado para la extracción de ADN. En este proceso es posible que se pierda cierta cantidad de material microbiológico, este problema podría ser evitado si se utilizara hisopos exclusivos para pruebas moleculares o se puede añadir un agente quelante como Chelex 100 (Biorad) para atrapar y eliminar posibles agentes inhibidores de la PCR. (Madico, Quinn, Rompalo, Mckee, & Gaydos, 1998).

Esta investigación es importante ya que permite la utilización de técnicas moleculares que son capaces de ofrecer mejores resultados que las técnicas tradicionales. En este caso existen estudios suficientes que reportan mejores resultados en la sensibilidad de identificación de *T. vaginalis* cuando se emplean métodos moleculares como la PCR. Existen varias ventajas de estos métodos sobre los tradicionales como por ejemplo menor tiempo de detección y un umbral mínimo de detección más bajo. *T. vaginalis* es un microorganismo que infecta a millones de personas alrededor del mundo pero ha sido dejado de lado ya que es relativamente fácil de tratar

y muchas veces no produce mayor sintomatología. Precisamente porque es un organismo fácil de tratar, es necesario que las técnicas de detección mejoren. De esta manera se puede tratar al paciente de forma oportuna y se pueden evitar un sin número de complicaciones.

Es necesario tomar en cuenta que este no es un estudio epidemiológico o de prevalencia de esta enfermedad. Sería importante realizar estudios epidemiológicos y de prevalencia que ofrezcan un panorama más claro en cuanto a que sector de la población ecuatoriana se encuentra más propenso a este tipo de infecciones.

CONCLUSIONES

- Este estudio logró identificar *Trichomonas vaginalis* en 3 muestras de hisopados cérvico-uterinos provenientes 2 centros de salud mediante la utilización de una técnica de PCR convencional.
- Hasta la fecha este es el primer estudio en el Ecuador que utiliza una técnica molecular como la PCR para identificar el parásito *T. vaginalis* en muestras de secreciones vaginales
- Se comprobó que la técnica de PCR es más sensible en la detección de *T. vaginalis* comparado a la técnica de microscopía en fresco actualmente utilizada en el Laboratorio de Microbiología de la USFQ, esto debido principalmente al tiempo en que se tarda la muestra desde su recolección hasta ser procesada en el Laboratorio.

RECOMENDACIONES

- Para estudios moleculares futuros que utilicen secreciones vaginales colectadas a través de hisopados cérvico uterinos, se recomienda destinar un hisopo exclusivo para realizar los análisis moleculares. De esta forma se puede evitar la pérdida de muestra y la

contaminación con posibles compuestos inhibidores que pueden estar presentes en los diferentes medios de cultivo.

- Se debería analizar una muestra más grande para que los resultados de prevalencia de esta enfermedad reflejen de manera más veraz la situación de la población ecuatoriana en cuanto a esta enfermedad.
- Aunque la identificación de *T. vaginalis* en hombres es más difícil, se podría realizar un análisis molecular de muestras de orina para conocer la situación de este segmento de la población donde el porcentaje de casos asintomáticos es mucho mayor que en las mujeres.
- Se recomienda la utilización de los primers TV1-TV2 para la identificación de rutina en el laboratorio en el caso que exista la sospecha de una infección por *T. vaginalis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adad, J., Vaz de Lima, R., Zahir, E. S., Gobo Silva, M. L., Hazarabedian de Souza, M. A., Saldanha, J. C., . . . Candido Murka, E. F. (2001). Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. *Sao Paulo Medical Journal*, 200-205.
- Arab-Mazar, Z., & Niyyati, M. (2015). *Trichomonas vaginalis* Pthogenesis: a Narrative Review. *Novelty in Biomedicine*, III(3), 148-154.
- Association of Public Health Laboratories. (2013). Advances in Laboratory Detection of *Trichomonas vaginalis*. *Laboratory detection of Trichomonas*, 1-6.
- Bachmann, L., Hobbs, M., Seña, A., Sobel, J. D., Schwebke, J., Krieger, J., . . . Workowski, K. (2011). *Trichomonas vaginalis* Genital Infections: Progress and Challenges. *Sexually Transmitted Disease Treatment Guidelines*, 5160-5172.
- Biomed Diagnostics. (2015). *Clinical Tests Inpouch TV (Trichomonas vaginalis)*.
Obtenido de <http://biomeddiagnostics.com/clinical/clinical-featured/trichomonas-vaginalis>
- Brahmbhatt, H., Musoke, R., Makumbi, F., Kigozi, G., Serwadda, D., Wawer, M., & Gray, R. (2014). *Trichomonas vaginalis* Incidence Associated with Hormonal Contraceptive Use and HIV Infection among Women in Rakai, Uganda. *Journal of Sexually transmitted Diseases*, 1-10.
- Brij, B., Megha, M., Naiya, D., & D. R. Arora. (2014). Prevalence of Trichomoniasis, Vaginal Candidiasis, Genital Herpes, Chlamydiasis, and Actinomycosis among Urban and Rural Women of Haryana, India. *Journal of Sexually Transmitted Diseases*, 2014, 1-5.

- Caliendo, A. M., Jordan, J. A., Green, A. M., Ingersoll, J., Diclemente, R. J., & Wingood, G. M. (2005). Real-time PCR improves detection of *Trichomonas vaginalis* infection compared with culture using self-collected vaginal swabs. *Infectious diseases in Obstetrics and Gynecology*, 145-150.
- Castro Arteaga, E. M., & González Cabrera, A. N. (2013). *Prevalencia de Vaginosis y Vaginitis en Mujeres de 18 a 45 Años que Acuden a Consulta Externa de la Clínica Humanitaria Fundación Pablo jaramillo Crespo*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- CDC. (Junio de 2014). *2015 sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines*. Recuperado el 14 de Octubre de 2015
- Conrad, M. D., Bradic, M., Warrin, S. D., Gorman, A. W., & Carlton, J. M. (2013). Getting trichy: tools and approaches to interrogating *Trichomonas vaginalis* in a post genome world. *Trends in parasitology*, 17-26.
- Cudmore, S. L., & Garber, G. E. (2010). Prevention or treatment: The benefits of *Trichomonas vaginalis* vaccine. *Journal of Infection and Public Health*, 47-53.
- Diaz, N., Dessi, D., Dessole, S., Fiori, P. L., & Rappelli, P. (2010). Rapid detection of coinfections by *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* by a new multiplex polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 30-36.
- Fiori, P. L., Rapelli, P., & Addis, M. F. (1999). The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbes and Infection*, 149-156.

- Garber, G. E. (2005). *The Laboratory diagnosis of Trichomonas vaginalis*. Ottawa: Canadian STI Best Practice Laboratory Guidelines.
- GIDEON Informatics. (2015). *Trichomoniasis: Global Status*. GIDEON Informatics Inc.
- Hidalgo, L. A., Chedraui, P. A., & Chávez, M. J. (2005). Obstetrical and neonatal outcome in young adolescents of low socio-economic status: a case control study. *Archive of Gynecology and Obstetrics*, 207-211.
- Hobbs, M. M., & Seña, A. C. (2013). Modern Diagnosis of Trichomonas vaginalis. *Sexual transmission Infections*, 434-438.
- Kissinger, P. (2015). Trichomonas vaginalis: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infectious Diseases*, 2-8.
- Kusdian, G., & Gould, S. B. (2015). The biology of Trichomonas vaginalis in the light of urogenital tract infection. *Molecular & Biochemical Parasitology*. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.01.004>
- Lazenby, G. B., Taylor, P. T., Badman, B. S., Mchaki, E., Korte, J., Soper, D. E., & Young Pierce, J. (2014). An association Between Trichomonas vaginalis and High-Risk Human Papillomavirus in Rural Tanzanian Women Undergoing Cervical Cancer Screening. *Clinical Therapeutics*, 38-45.
- Littlewood, J. M., & Kohler, H. G. (1966). Urinary Tract Infection by Trichomonas vaginalis in a Newborn Baby. *Archive of Childhood Diseases*, 693-695.
- Madico, G., Quinn, T., Rompalo, A., Mckee, K., & Gaydos, C. (1998). Diagnosis of Trichomonas vaginalis Infection by PCR using Vaginal Swab Samples . *Journal of Clinical Microbiology*, 3205-3210.

- Mayta, H., Gilman, R., Calderon, M. M., Gottlieb, A., Soto, G., Tuero, I., . . . Vivar, A. (2000). 18 S Ribosomal DNA-Based PCR for Diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2683-2687.
- McClelland, R. S., Sangaré, L., Wisal, H., Lavreys, L., Mandaliya, K., Kiarie, J., . . . Baeten, J. (2007). Infection with *Trichomonas vaginalis* Increases the risk of HIV-1 Acquisition. *The journal of Infectious Diseases*, 000-000.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2010). *Microbiología Médica* (Quinta ed.). Madrid, España: Elsevier.
- OIE. (2008). Validación y control de calidad de los métodos de la reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. En O. M. Animal, *Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008*.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., & Garber, G. (1998). Clinical and Microbiological Aspects of *trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 300-317.
- Prakash Dwivedi, S., Husain, N., Singh, R. B., & Malla, N. (2012). 18S ribosomal DNA based PCR diagnostic assay for *Trichomonas vaginalis* infection in symptomatic and asymptomatic women in India. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 133-138.
- Prakash Dwivedi, S., Husain, N., Singh, R., & Malla, N. (2012). PCR based diagnostic assay targeting the beta tubulin gene for the detection of *Trichomonas vaginalis* infection in vaginal swab samples of symptomatic and asymptomatic women in India. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 352-357.
- Rappelli, P., Carta, F., Delogu, G., Addis, M. F., Dessi, D., Cappuccinelli, P., & Fiori, P. L. (2001). *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis:

multiplicity of infection and transmissibility of *M. hominis* to human cells. *Archives of Microbiology*, 70-74.

Santos Diéguez, I. (2014). Tricomoniiasis: una visión amplia. *IATREIA*, 198-205.

Schmid, G. (28 de Julio de 2003). *Trichomoniasis treatment in Women: RHL commentary*. Geneva: The WHO Reproductive Health Library, World Health Organization. Recuperado el 14 de Octubre de 2015, de http://apps.who.int/rhl/rti_sti/gscorm/en/

Schwebke, J. R., Hobbs, M. M., Taylor, S. N., Sena, A., Catania, M. G., Weinbaum, B. S., . . . Gaydos, C. A. (2011). Molecular testing for *Trichomonas vaginalis* in Women: results from Prospective U.S. Clinical Trial. *Journal of Clinical Microbiology*, 4106-4111.

Sherrard, J., Ison, C., Moody, J., Wainwright, E., Wilson, j., & Sullivan, A. (2014). United Kingdom National Guideline on the Management of *Trichomonas Vaginalis* 2014. *International Journal of STD & AIDS*, 541-549.

Sutcliffe, S., Giovannucci, E., Alderete, J. F., Chang, T.-H., Gaydos, C. A., Zenilman, J. M., . . . Platz, E. (2006). Plasma Antibodies against *Trichomonas vaginalis* and Subsequent Risk of Prostate Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers*, 939-945.

Uribarren Berrueta, T. (Agosto de 2015). *Departamento de Microbiología y Parasitología-Recursos en Parasitología*. Recuperado el 13 de Octubre de 2015, de Universidad nacional Autónoma de Mexico: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/tricomoniiasis.html>

Vaca, M., Guadalupe, I., Erazo, S., Tinizaray, K., Chico, M., Cooper, P., & Hay, P. (2009). High Prevalence of bacterial vaginosis in Adolescent Girls in a Tropical Area of Ecuador. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 225-228.

TABLAS

Tabla 1. Detalle de las muestras que reportaron la presencia de algún microorganismo

Muestra	Microorganismo(s) presente(s)	Fecha de Recolección	Procedencia	Edad (años)
TV 07	<i>C. albicans</i>	Julio 2014	CU	19
TV 09	<i>G. vaginalis</i> , <i>C. albicans</i>	Julio 2014	MR	25
TV 11	<i>G. vaginalis</i>	Julio 2014	CU	24
TV 18	<i>G. vaginalis</i>	Agosto 2014	CU	14
TV 19	<i>G. vaginalis</i>	Agosto 2014	CU	9
TV 20	<i>G. vaginalis</i> , <i>C. No albicans</i>	Agosto 2014	MR	21
TV 21	<i>G. vaginalis</i>	Agosto 2014	MR	18
TV 32	<i>C. albicans</i>	Agosto 2014	CU	12
TV 34	<i>C. albicans</i>	Septiembre 2014	CU	19
TV 36*	<i>G. vaginalis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>T. vaginalis</i>	Septiembre 2014	MR	20
TV 41	<i>G. vaginalis</i>	Septiembre 2014	CU	21
TV 42	<i>G. vaginalis</i>	Septiembre 2014	CU	24
TV 44	<i>G. vaginalis</i>	Septiembre 2014	CU	54
TV 45	<i>C. albicans</i>	Septiembre 2014	CU	45
TV 46*	<i>T. vaginalis</i>	Septiembre 2014	CU	2
TV 49	<i>G. vaginalis</i> , <i>C. albicans</i>	Septiembre 2014	CU	37
TV 55	<i>C. albicans</i>	Octubre 2014	MR	29
TV 56	<i>C. albicans</i>	Octubre 2014	CU	48
TV 57	<i>C. no albicans</i>	Octubre 2014	CU	31
TV 58	<i>C. albicans</i>	Octubre 2014	MR	51
TV 61	<i>C. albicans</i>	Octubre 2014	CU	26
TV 63	<i>G. vaginalis</i>	Octubre 2014	CU	23
TV 78	<i>G. vaginalis</i>	Noviembre 2014	MR	33
TV 81	<i>G. vaginalis</i>	Noviembre 2014	CU	56
TV 92*	<i>T. vaginalis</i> , <i>C. albicans</i>	Enero 2015	CU	36

*Muestras positivas para *T. vaginalis* detectadas mediante el uso de una PCR convencional con el set de primers TV1-TV2

Tabla 2. Reacción de PCR para la amplificación del gen de Beta Actina

Reactivos	Concentración	Volumen (ul)
H ₂ O de PCR		6,9
Buffer	1X	4
MgCl ₂	1,25mM	1
DNTPs	200uM	2
B-actina Forward	1uM	2
B-actina Reverse	1uM	2
Taq polimerasa	0,5U/ul	0,1
ADN		2

Tabla 3. Condiciones de PCR en el termociclador para la amplificación del gen de Beta Actina

Ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización Inicial	94°C	2 minutos	1
Desnaturalización cíclica	92°C	50 segundos	35
Primer annealing	45°C	50 segundos	
Extensión	72°C	50 segundos	
Extensión final	72°C	2 minutos	1

Tabla 4. Reacción de PCR para la amplificación de ADN ribosomal 18S

Reactivos	Concentración	Volumen (ul)
H ₂ O de PCR		6,9
Buffer	1X	4
MgCl ₂	1,25mM	1
DNTPs	200uM	2
TV1 Forward	1uM	2
TV2 Reverse	1uM	2
Taq polimerasa	0,5U/ul	0,1
ADN		2

Tabla 5. Condiciones de PCR en el termociclador para la amplificación de ADN ribosomal 18S

Ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización Inicial	94°C	4 minutos	1
Desnaturalización cíclica	94°C	10 segundos	
Primer annealing	57°C	45 segundos	40
Extensión	72°C	15 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

Tabla 6. Reacción de PCR para la amplificación del gen de Beta-Tubulina

Reactivos	Concentración	Volumen (ul)
H ₂ O de PCR		5,9
Buffer	1X	4
MgCl ₂	1,25mM	1
DNTPs	200uM	2
BTUB 1 Forward	1uM	2
BTUB 2 Reverse	1uM	2
Taq polimerasa	0,5U/ul	0,1
ADN		3

Tabla 7. Condiciones de PCR en el termociclador para la amplificación del gen de Beta-Tubulina

Ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización Inicial	94°C	4 minutos	1
Desnaturalización cíclica	94°C	45 segundos	
Primer annealing	49°C	45 segundos	30
Extensión	72°C	45 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

Tabla 8. Información de muestras positivas para *T. vaginalis*

Código	Procedencia	Fecha de Recolección	Edad (años)	Presencia de <i>G. vaginalis</i>	Presencia de <i>C. albicans</i>	Presencia de <i>C. no albicans</i>
TV-36	MR	04/09/2014	20	SI	SI	NO
TV-46	CU	19/09/2014	2	NO	NO	NO
TV-92	CU	16/01/2015	36	NO	SI	NO

Tabla 9. Resultados de la secuenciación de las muestras positivas para *T. vaginalis* utilizando los sets de primers TV1-TV2 y BTUB1-BTUB2.

Set de Primers	Muestra	Longitud de Secuencia	Porcentaje de identidad	Valor E	Resultado	Accesión más Similar
TV1-TV2	TV-36	268 nucleótidos	100%	2e -135	<i>Trichomonas vaginalis</i>	JF513197.1
	TV-46	264 nucleótidos	99%	2e -130	<i>Trichomonas vaginalis</i>	KM603351.1
	TV-92	265 nucleótidos	99%	2e -130	<i>Trichomonas vaginalis</i>	KM603351.1
	C1+	268 nucleótidos	99%	2e -134	<i>Trichomonas vaginalis</i>	JF513197.1
	C2+	269 nucleótidos	99%	7e -129	<i>Trichomonas vaginalis</i>	KM603351.1
BTUB1-BTUB2	TV-36	142 nucleótidos	89%	6e -24	<i>Trichomonas vaginalis</i>	KM603351.1
	C2+	86 nucleótidos	87%	3e -19	<i>Trichomonas vaginalis</i>	KM603351.1

Tabla 10. Tabla comparativa entre los métodos de diagnóstico de *T. vaginalis*

Centro de Salud	No. De Muestras	No. (%) Positivas por microscopía	No. (%) Positivas por PCR
Sistemas Médicos USFQ	74	0 (0%)	2 (2,70%)
Clínica de Especialidades Tumbaco	23	0 (0%)	1(4,3%)
Total	97	0(0%)	3(3,09%)

FIGURAS

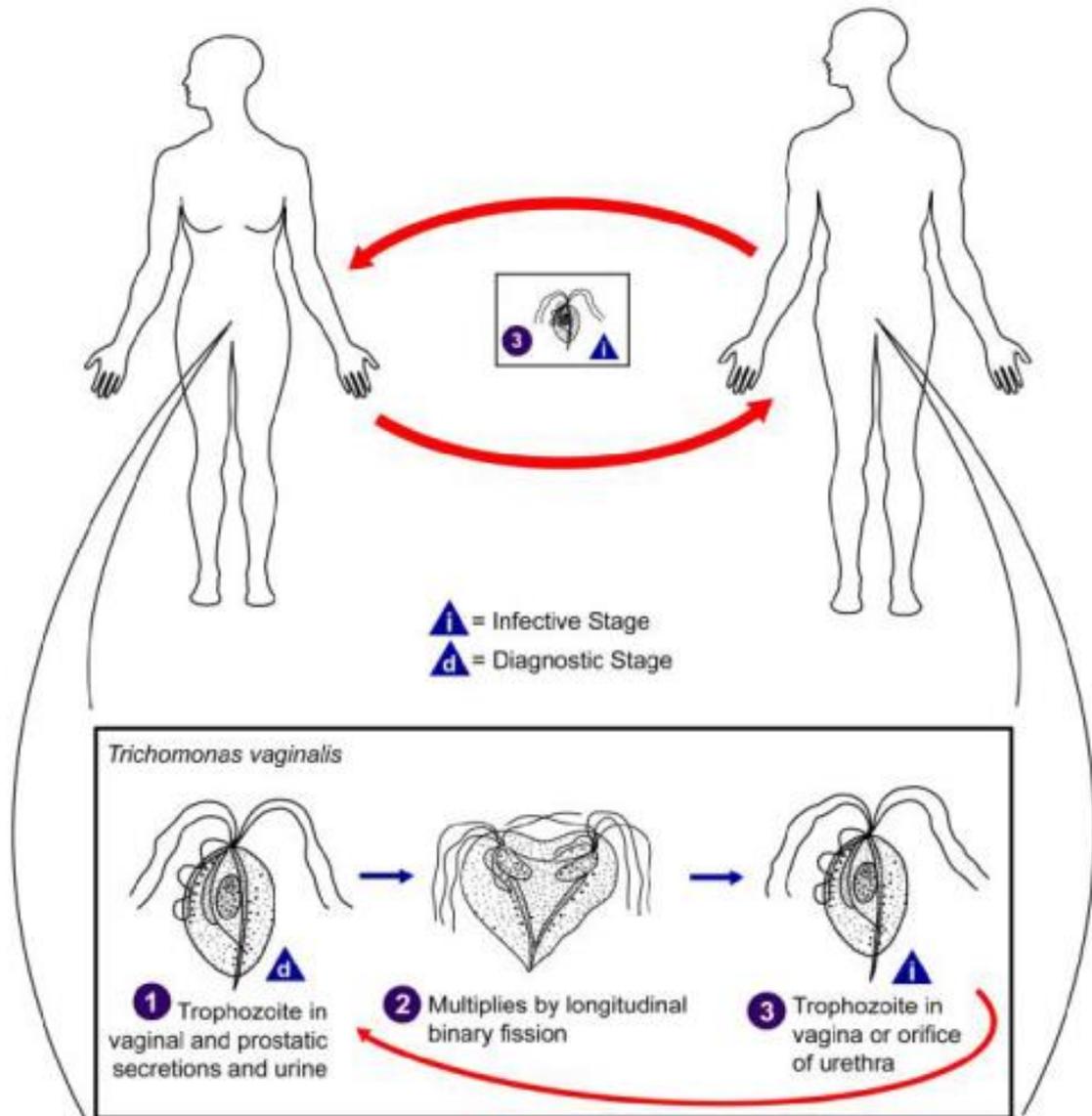


Figura 1. Ciclo de Vida de *Trichomonas vaginalis*. (GIDEON Informatics, 2015)

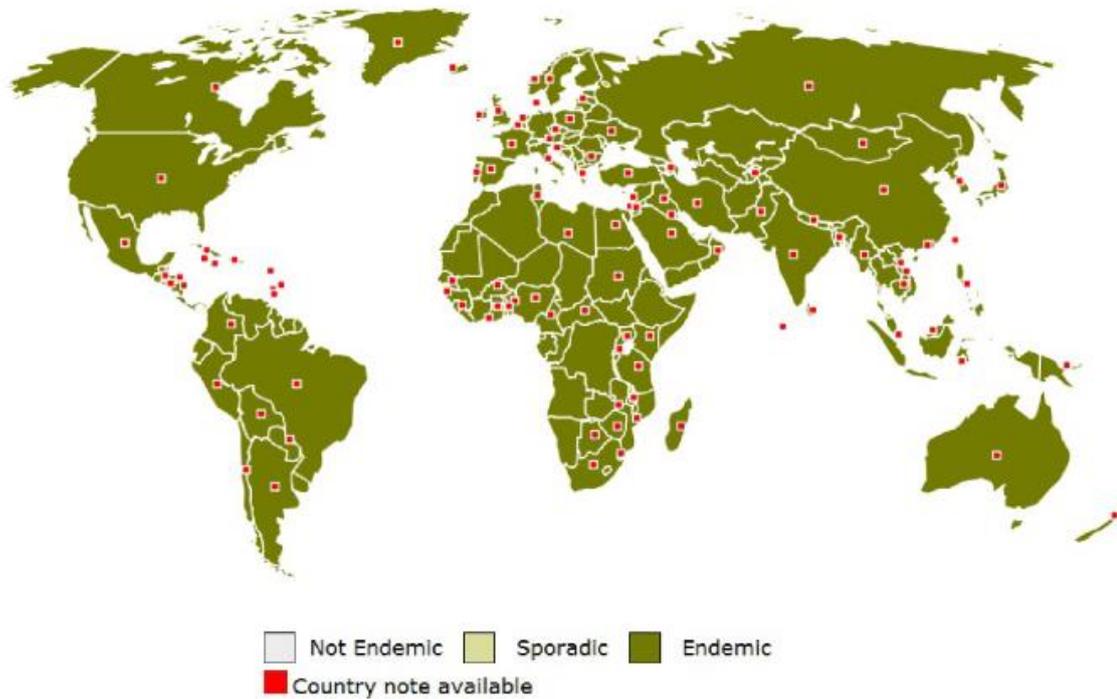


Figura 2. Mapa de la distribución mundial de *Trichomonas vaginalis*. (GIDEON Informatics, 2015)

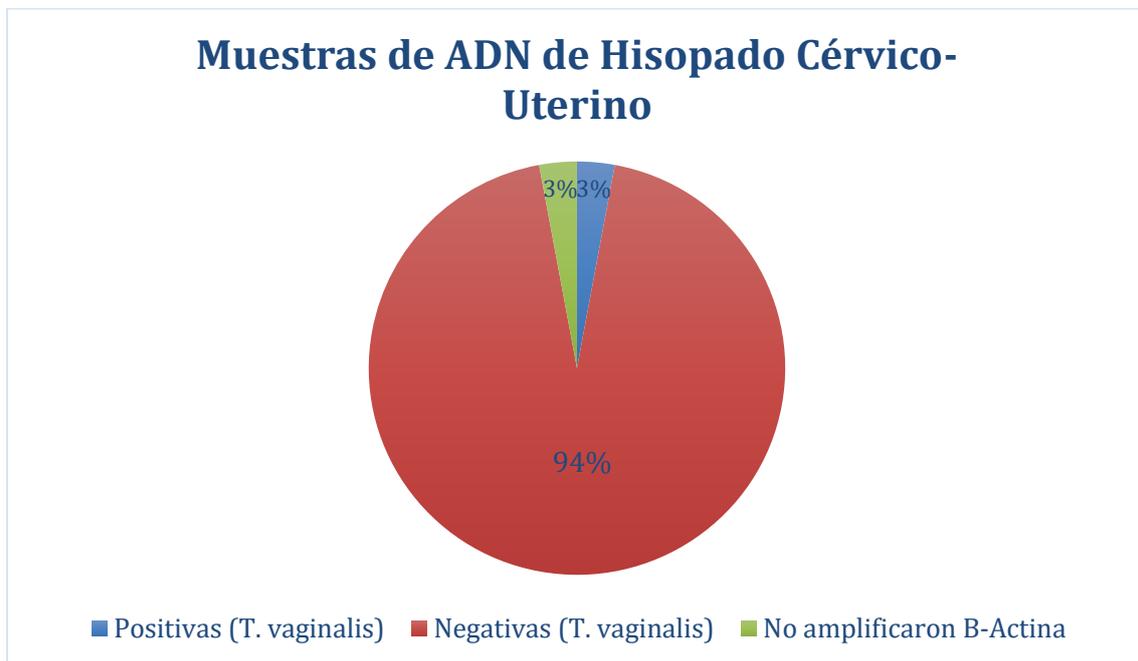


Figura 3. Porcentaje de muestras de ADN que amplificaron B-Actina y que amplificaron positivo para *T. vaginalis* utilizando el set de primers TV1-TV2

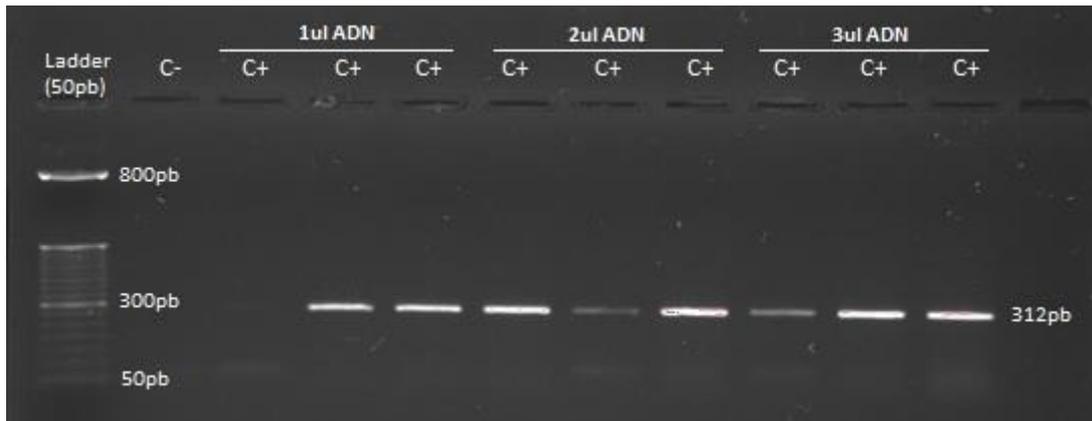


Figura 4. Electroforesis en gel de Agarosa (1,5%) de la amplificación de un segmento del ADN ribosomal 18S de los controles positivos obtenidos en el centro de salud No 3 “La Tola”

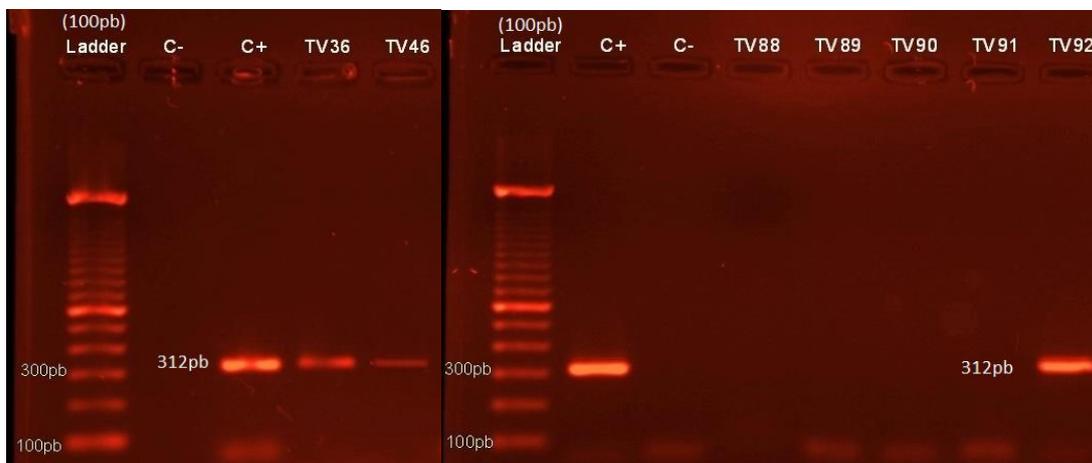


Figura 5. Electroforesis en gel de Agarosa (1,5%) de la amplificación de un segmento del ADN ribosomal 18S a partir de hisopados cérvico-uterinos.

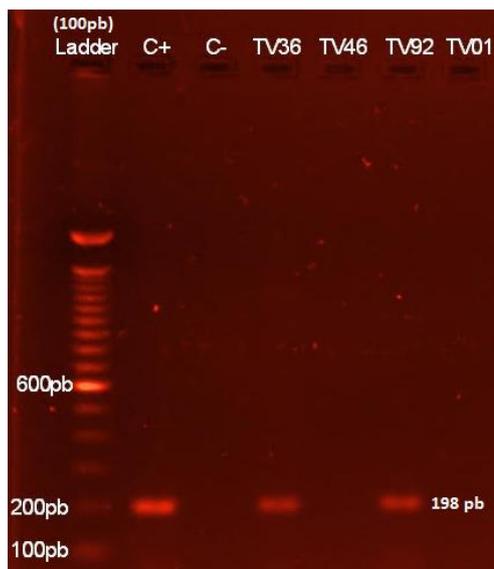


Figura 6. Electroforesis en gel de Agarosa (1,5%) de la amplificación de un segmento del gen de Beta Tubulina a partir de hisopados cérvico uterinos

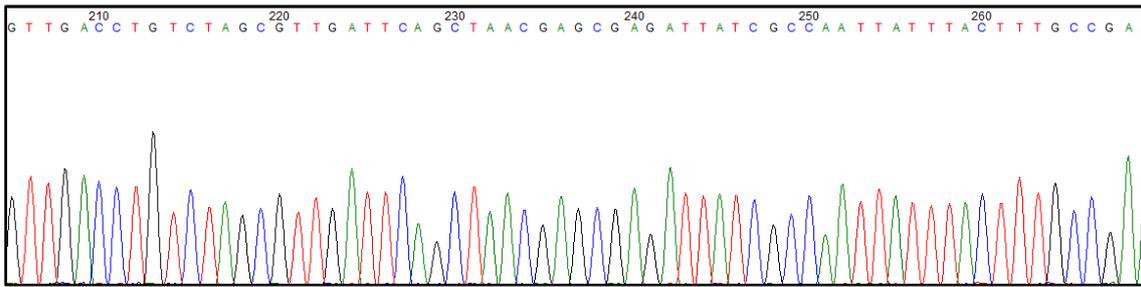


Figura 7. Picos de secuenciación claros en la muestra C2+ utilizando el set de primers TV1-TV2

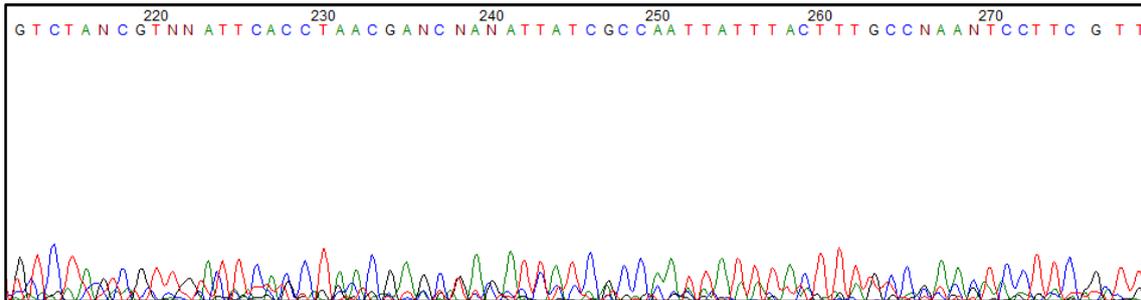


Figura 8. Picos de secuenciación con ruido en la muestra C2+ utilizando el set de primers BTUB1-BTUB2.

Trichomonas vaginalis voucher XY-5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial
 Sequence ID: [gij857024763/gbj/KM603351.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gij857024763/gbj/KM603351.1) Length: 1504 Number of Matches: 1

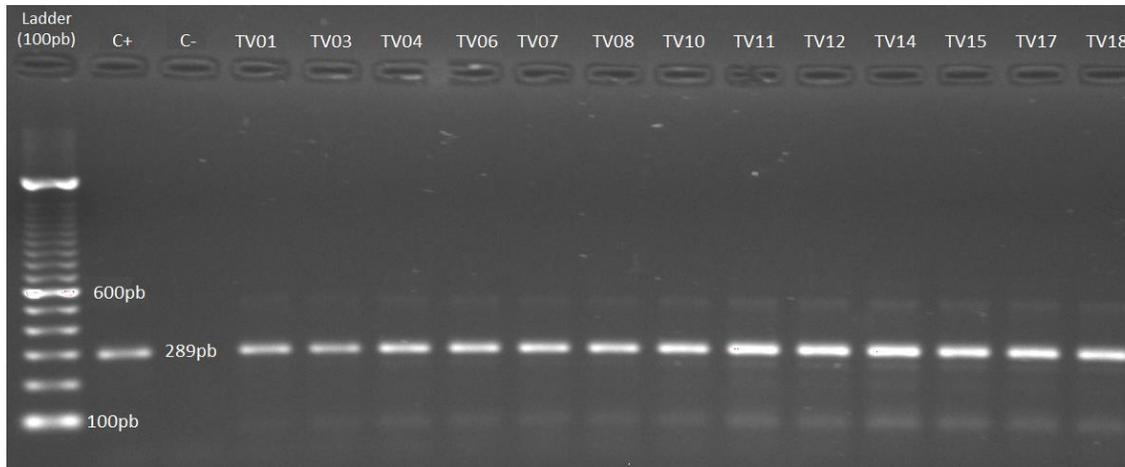
Range 1: 841 to 1109 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
490 bits(265)	6e-135	268/269(99%)	1/269(0%)	Plus/Minus
Query 1	ATCTCGCTCGTTAGCTGA-TCAACGCTAGACAGGTCACCCACGCACCACCAACGGCCAT	59		
Sbjct 1109	ATCTCGCTCGTTAGCTGAATCAACGCTAGACAGGTCACCCACGCACCACCAACGGCCAT	1050		
Query 60	GCACCACCAAAAACAATATCCTGAAAGACCCGAAGCCTGTCAGTCATAAAAAACATCTGG	119		
Sbjct 1049	GCACCACCAAAAACAATATCCTGAAAGACCCGAAGCCTGTCAGTCATAAAAAACATCTGG	990		
Query 120	TCCTGGTAAGTTTCCCGTGTTGATTCAAATTAAGCCACAGGCTCCACCCTGGTGTGCC	179		
Sbjct 989	TCCTGGTAAGTTTCCCGTGTTGATTCAAATTAAGCCACAGGCTCCACCCTGGTGTGCC	930		
Query 180	CTTCCGTCAATTCCTTCAAGTTTCAGCCTTGC GGTCGTAGTTCCCCAGAGCCCAAGAAC	239		
Sbjct 929	CTTCCGTCAATTCCTTCAAGTTTCAGCCTTGC GGTCGTAGTTCCCCAGAGCCCAAGAAC	870		
Query 240	TATGATTTCTCCAAAGATTCTGCCATTAA	268		
Sbjct 869	TATGATTTCTCCAAAGATTCTGCCATTAA	841		

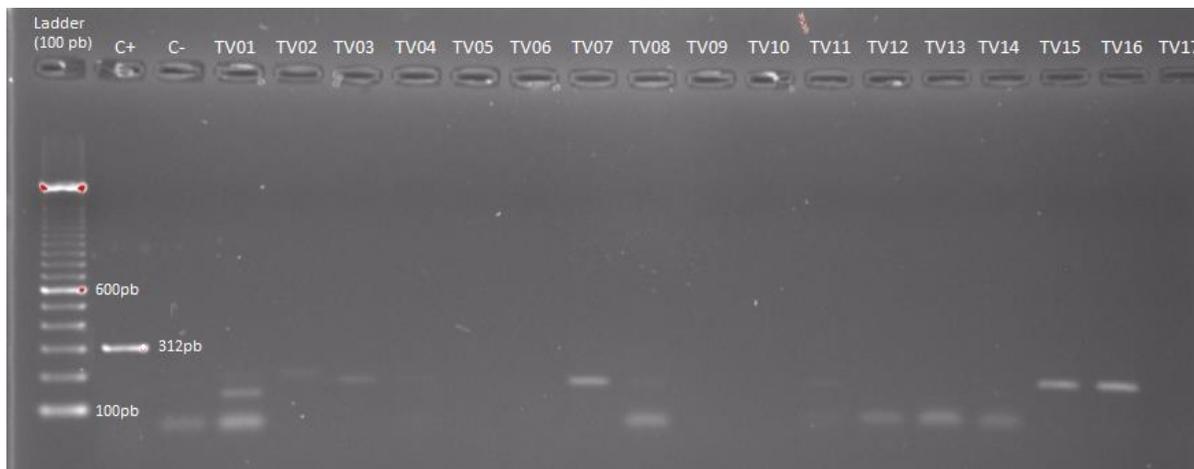
Figura 9. Secuencia de la muestra C2+ alineada con la accesión más similar en la aplicación BLAST del NCBI

ANEXOS

Category	Test	Sensitivity range* (%)	Specificity range* (%)	Advantages	Limitations
Direct microscopy	Wet mount	44–68	100	Same day results, inexpensive	Low sensitivity, requires trained microscopist, not for use in men
	Conventional Pap	44–79	83–99	Convenient for women undergoing cervical cancer screening	Low sensitivity and specificity, requires confirmatory testing, requires trained microscopist, several days for results, not for use in men
	Liquid Pap	60–96	98–100	Improved sensitivity and specificity versus conventional Pap	Requires trained microscopist, several days for results, not for use in men
Culture	Diamond's modified medium or InPouch	44–75	100	Improved sensitivity versus microscopy, antimicrobial susceptibility testing possible	Requires trained microscopist, incubator and controlled temperature transport, up to a week for results
Non-amplified molecular tests	OSOM rapid antigen test	77–98	99–100	Same day results, minimal training required, no equipment needed, specimen transport delays tolerated	Not for use in asymptomatic women or in men
	Kalon TV agglutination	55–99	92–100	Same day results, minimal training required, no equipment needed, specimen transport delays tolerated	Not for use in asymptomatic women or in men
	Affirm VP III nucleic acid probe hybridisation	64	100	Same day results possible, <i>Gardnerella</i> and yeast detection included, specimen transport delays tolerated	Moderate complexity, some training and equipment required, not for use in asymptomatic women or in men
NAATs	APTIMA TV	88–100	98–100	Highly sensitive and specific, specimens compatible with testing for other STIs, specimen transport delays tolerated, performs well with specimens from men	Expensive, requires laboratory equipment and highly trained personnel, several days for results, persistent positives following treatment possible
	Inhouse PCR	76–100	96–100	Highly sensitive and specific, specimens compatible with testing for other STIs, specimen transport delays tolerated, performs well with specimens from men	Expensive, requires laboratory equipment and highly trained personnel, several days for results, persistent positives following treatment possible



Anexo 2. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de la amplificación de una región del gen de Beta Actina como control de evaluación de la calidad del ADN extraído por el método de CTAB



Anexo 3. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de la amplificación del gen ribosomal 18S utilizando una temperatura de annealing de 52°C