



**EHAS**

ENLACE HISPANO AMERICANO DE SALUD

# PROCESAMIENTO DE MUESTRAS VAGINALES

*Proyecto AECID 2012*

*“Nuevos procedimientos para el diagnóstico de enfermedades olvidadas  
utilizando tele-microscopía de bajo coste”.*





## **TABLA DE CONTENIDOS**

### **TOMA DE LA MUESTRA (para Examen en Fresco y Tinción de Gram)**

#### **EXAMEN EN FRESCO**

Material necesario.  
Procesamiento de la muestra.

#### **TINCIÓN DE GRAM**

Material necesario.  
Procesamiento de la muestra.

#### **TINCIÓN DE PAPANICOLAU**

Toma de la muestra.  
Material necesario.  
Procesamiento de la muestra.  
Observación en el microscopio.

#### **FUENTES FIGURAS**



MÉTODO	MICROORGANISMO	TIPO DE MUESTRA	¿CUÁNDO REALIZAR ESTE EXAMEN?
EXAMEN EN FRESCO	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Exudado vaginal (muestra de moco o flujo vaginal)	Síntomas de vaginitis (picor, cambios en el flujo vaginal (color, olor, etc))
	<i>Candida (levaduras)</i>		
TINCIÓN DE GRAM	<i>Candida (levaduras)</i>		
	<i>Vaginosis bacteriana</i>		

MÉTODO	¿QUÉ DETECTAMOS?	TIPO DE MUESTRA
TINCIÓN DE PAPANICOLAU	Prueba de cribado (screening) de cáncer de cuello de útero	Muestra cérvico- vaginal (cuello del útero y vagina)

## TOMA DE LA MUESTRA (para Examen en Fresco y Tinción de Gram)

- Siempre que sea posible, se utilizará un espéculo para la adecuada visualización y recogida de la muestra. El espéculo se debe introducir en la vagina sin lubricante (puede emplearse agua templada en su lugar).
- Con una torunda de algodón estéril, tomar el exudado vaginal **frotando en la zona donde sea más abundante o bien del fondo de saco vaginal posterior**.
- Registrar la muestra con su número de identificación y los datos de la paciente en el libro o cuadernos de registro.

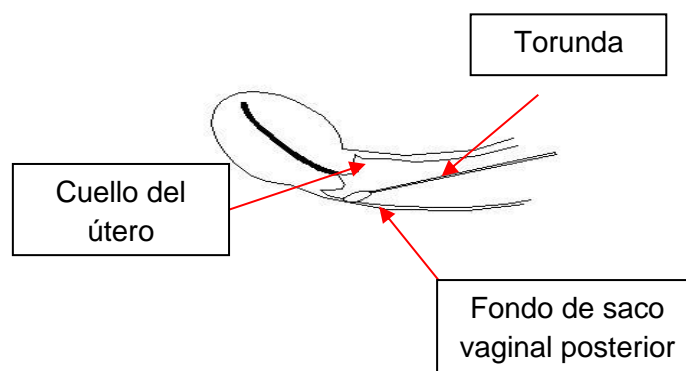


Figura 1: Toma de muestra vaginal



## EXAMEN EN FRESCO

El examen en fresco de muestras vaginales es una técnica de diagnóstico rápida y de sencilla realización que permite identificar tanto *Trichomonas Vaginalis* como levaduras del género *Candida* (se debe considerar que una misma paciente puede presentar ambas infecciones simultáneamente):

1. *Trichomonas vaginalis* es un parásito protozoo flagelado y móvil que parasita el tracto genito-urinario femenino y masculino. La parasitación o infección por este microorganismo se considera una enfermedad de transmisión sexual. La mayoría de las infecciones en el varón son asintomáticas, mientras que en las mujeres suele manifestarse como **vaginitis**.



Figura 2: *Trichomonas vaginalis*

2. Las levaduras del género *Candida* son la principal causa de **vaginitis** en mujeres en edad fértil a nivel mundial. Para su diagnóstico microscópico se pueden emplear tanto el examen en fresco como la tinción de Gram del exudado vaginal que se explica en el siguiente punto.

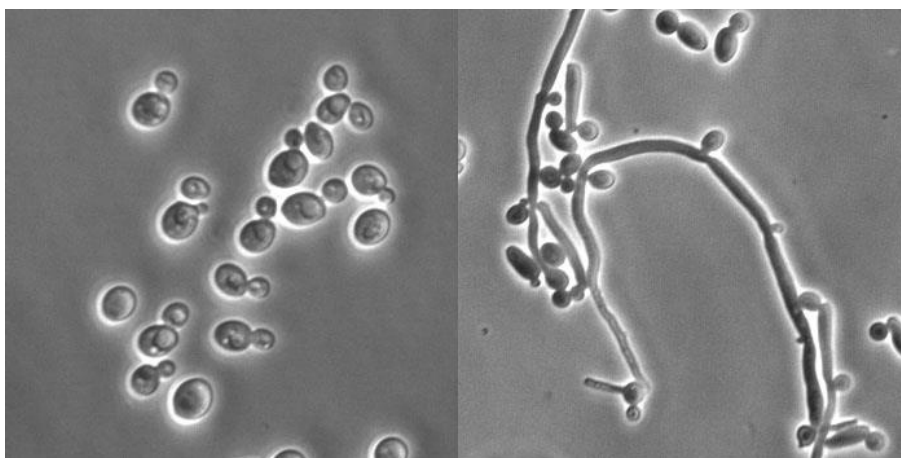


Figura 3: Levaduras *Candida*



## 1. MATERIAL NECESARIO

- Torunda de algodón estéril.
- Suero salino estéril.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos 20mmx20mm.
- Microscopio.

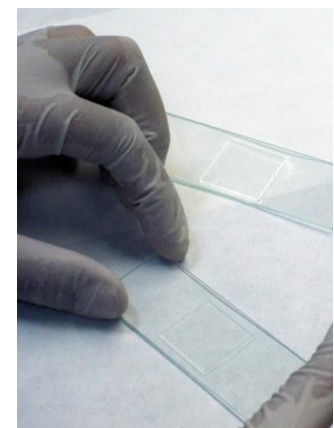
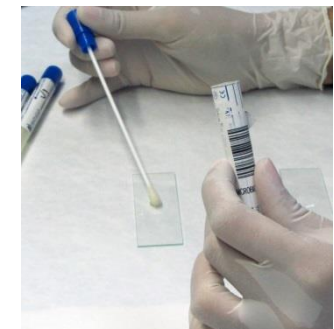
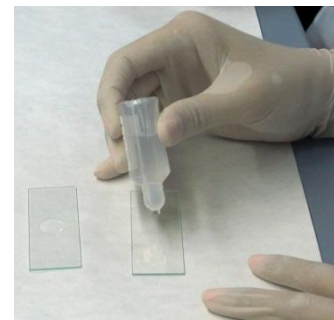
## 2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Debe llevarse a cabo inmediatamente después de la obtención de la muestra, sobre todo si se sospecha infección por *Trichomonas vaginalis*:

- Rotular o etiquetar un portaobjetos con el nombre de la paciente o el nº de identificación de la muestra.
- Depositar una gota de solución salina atemperada y estéril sobre un portaobjetos (37°C o temperatura ambiente si lo anterior no es posible). En el caso de sospecha de infección por *Candida* no es necesario que la solución salina esté atemperada.
- Una vez tomada la muestra, extenderla rápidamente sobre el portaobjetos, mezclándola con la solución salina.
- Colocar sobre la preparación un cubreobjetos.
- **Visualizar al microscopio** con los objetivos 10x y 40x.
- Si la paciente presenta *Trichomonas* se podrán observar estos microorganismos con su movilidad característica tal y como aparece en los siguientes videos:
  1. <http://www.youtube.com/watch?v=9B1PFJXuJUs>
  2. <http://www.youtube.com/watch?v=DKJnDz6yBSs>
  3. <http://www.youtube.com/watch?v=SxeqpuvzQWA>
- Si la paciente presenta *Candida*, se podrán observar las levaduras como en la imagen:



Levaduras en gemación





## TINCIÓN DE GRAM

Es la tinción más utilizada en Microbiología. Se emplea para la observación microscópica de muestras clínicas y de cultivos bacterianos. Permite visualizar la mayoría de las bacterias y algunos hongos (principalmente levaduras), por lo que con ella se puede hacer el diagnóstico de infección por *Candida*, y detecta además si la paciente padece vaginosis bacteriana.

Permite diferenciar las bacterias en dos grandes grupos:

- Gram positivas: se tiñen de **AZUL**.
- Gram negativas: se tiñen de **ROJO**.

También permite identificarlas por su forma:

- Cocos: bacterias redondas.
- Bacilos: bacterias alargadas.



COCOS GRAM POSITIVOS



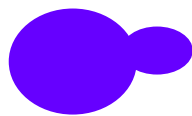
BACILOS GRAM POSITIVOS



COCOS GRAM NEGATIVOS



BACILOS GRAM NEGATIVOS



LEVADURAS

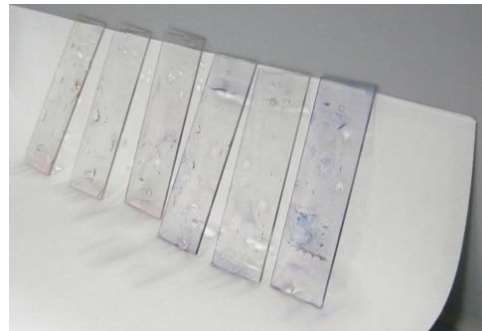
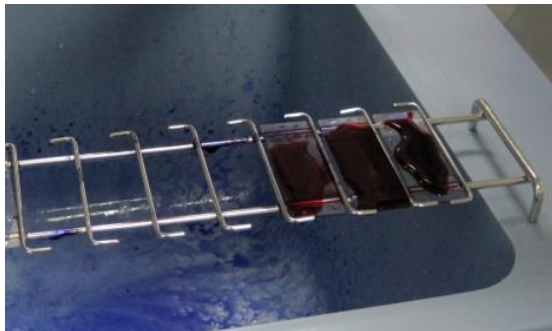
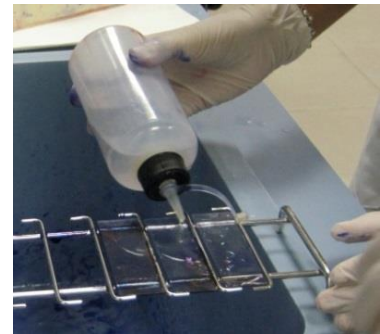
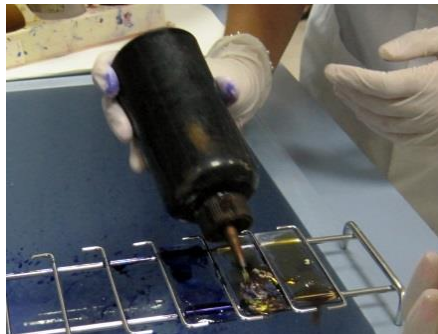
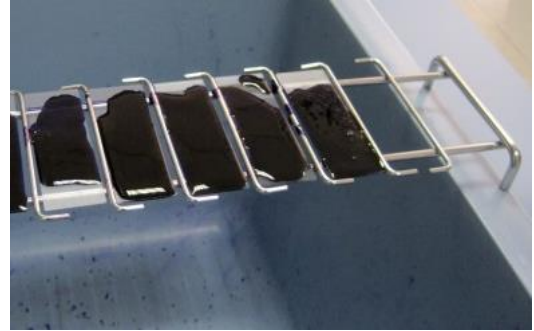
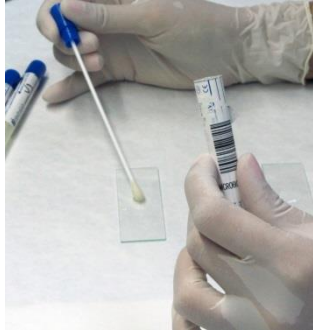


## 1. MATERIAL NECESARIO

- Torunda de algodón estéril.
- Portaobjetos.
- Mechero de alcohol o gas.
- Agua.
- Reactivos: Cristal Violeta, Lugol, Alcohol-Acetona, Safranina o Fucsina.
- Microscopio.
- Aceite de inmersión para el microscopio.

## 2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

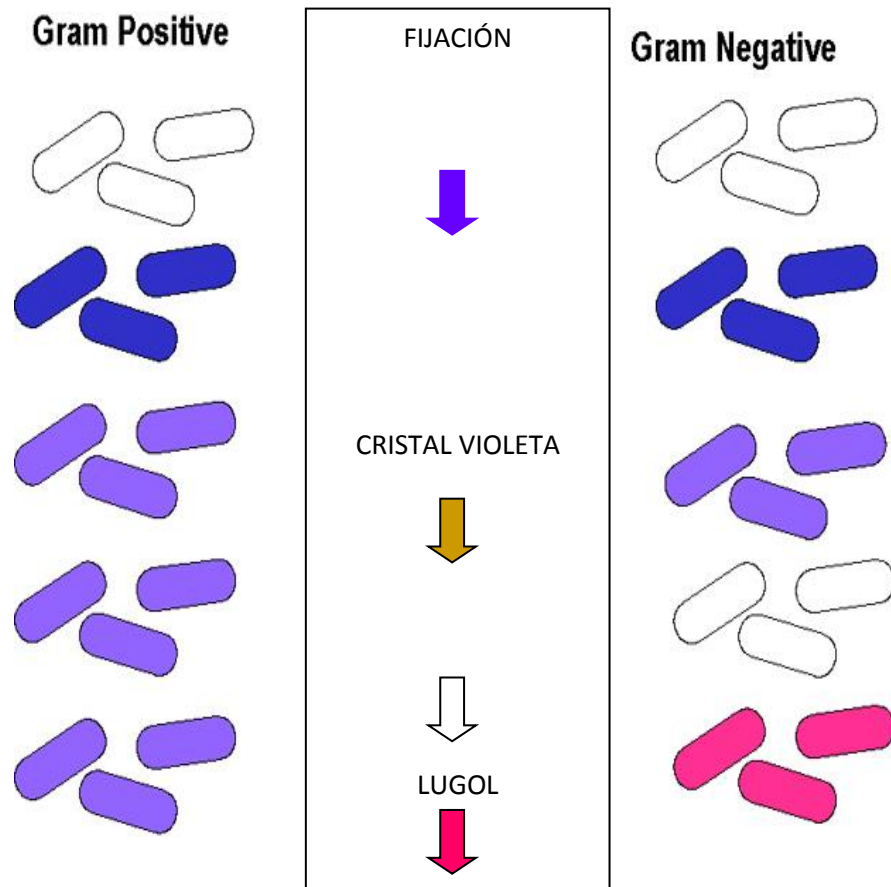
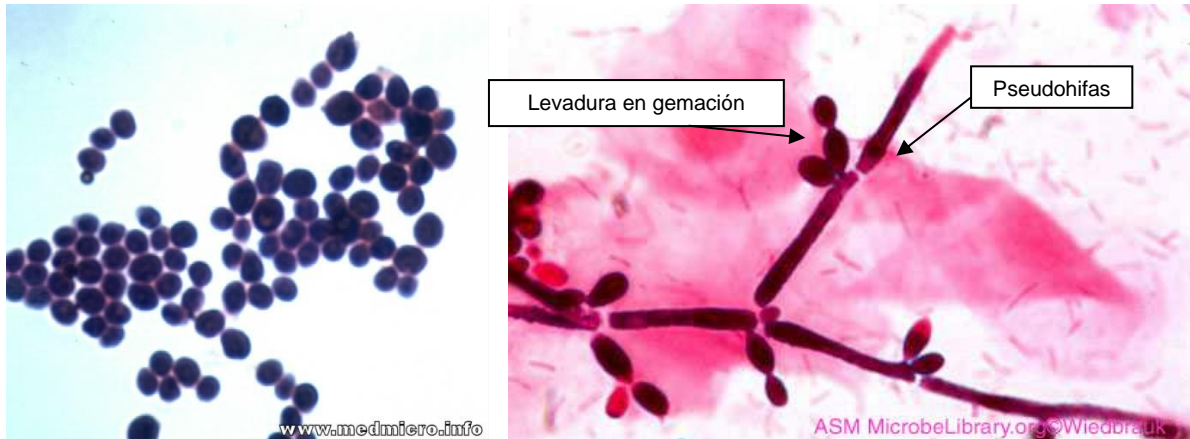
1. Una vez tomada la muestra, preparar una extensión de la misma sobre un portaobjetos.
2. Dejar secar a temperatura ambiente (hasta que la muestra esté completamente seca).
3. Fijar la muestra con calor pasando el portaobjetos por encima de la llama de un mechero durante unos segundos y dejar enfriar. A partir de este momento la muestra ya está lista para ser teñida.
4. Cubrir completamente la preparación con el reactivo llamado **CRISTAL VIOLETA** y dejarlo actuar durante un minuto.
5. Lavar con **AGUA**.
6. Cubrir la preparación completamente con el reactivo **LUGOL** y dejarlo actuar durante 1 minuto.
7. Lavar con **AGUA**.
8. Decolorar la preparación con **ALCOHOL-ACETONA** durante unos segundos (**15-20 seg**). **Recuerde que este el paso más importante de la tinción**, no sobrepase ese tiempo. Las bacterias gram positivas quedan teñidas de azul, las gram negativas se decoloran.
9. Lavar con **AGUA**.
10. Cubrir la preparación con **SAFRANINA o FUCSINA** diluida durante 1 minuto.
11. Lavar con **AGUA**. Las bacteria gram negativas quedan teñidas de rojo y las gram positivas permanecen azules.
12. Dejar secar la preparación en posición vertical (puede utilizarse papel de filtro o simplemente esperar hasta que esté completamente seca).







13. **Visualizar en microscopio** con objetivo 100x y aceite de inmersión. Las levaduras (*Candida*) tienen una forma ovoide, en muchas ocasiones se las puede observar en gemación y pueden presentar prolongaciones denominadas pseudohifas; se tiñen de azul/morado tras la tinción de Gram, por lo que se comportan como microorganismos gram-positivos:





## TINCIÓN DE PAPANICOLAU

El procesamiento de muestras cervicovaginales mediante el test de Papanicolau es una prueba sencilla que se utiliza de manera rutinaria para el cribado del cáncer de cuello de útero, enfermedad directamente relacionada con la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH).

Una vez obtenida la muestra como se indica a continuación, ésta debe extenderse **RÁPIDAMENTE** sobre un portaobjetos previamente identificado con el nombre de la paciente o su nº de registro.

### 1. TOMA DE LA MUESTRA PARA PAPANICOLAU

- En este caso se trata de muestras cervicovaginales, es decir, proceden tanto de la mucosa vaginal como de la porción externa del cuello del útero (ectocervix).
- Siempre que sea posible, se utilizará un espéculo para la adecuada visualización y recogida de la muestra. El espéculo se debe introducir en la vagina sin lubricante (puede emplearse agua templada en su lugar).
- Con una torunda de algodón estéril, **frotar la pared vaginal y la porción externa del cuello del útero**.
- Registrar la muestra con su número de identificación y los datos de la paciente en el libro o cuadernos de registro.

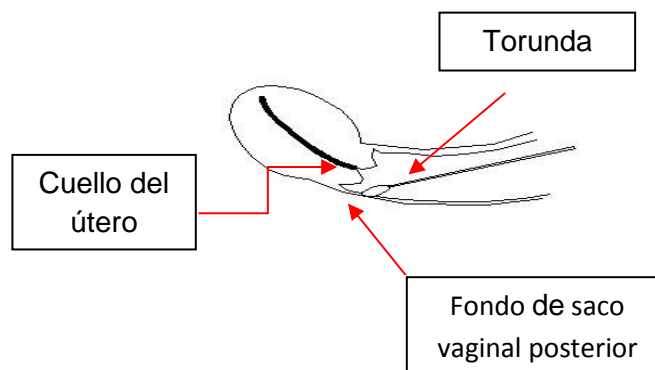


Figura 4: Toma de muestra cervicovaginal

### 2. MATERIAL NECESARIO

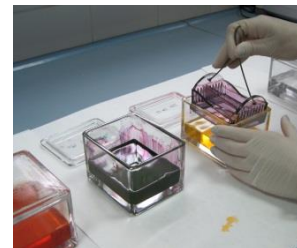
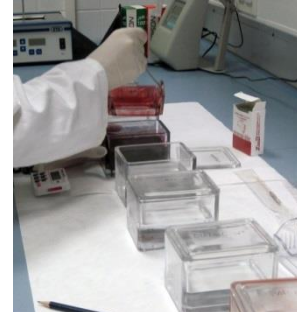
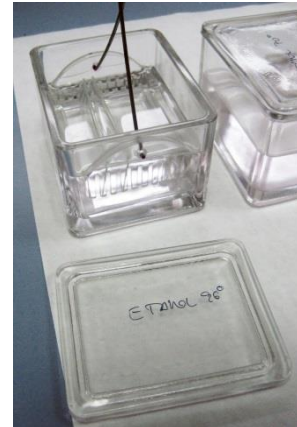
- Torunda de algodón estéril.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos 24mmx60mm.
- Cubetas.



- Agua.
- Reactivos: Etanol 96°, Etanol 70°, Etanol Absoluto, Hematoxilina de Harris, Papanicolau's Solution OG 6 DC, Papanicolau's Solution EA 50 DC y Xilol.
- Microscopio.
- Medio de Montaje DPX.
- Pipetas.

### 3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

1. Una vez obtenida la muestra y extendida sobre un portaobjetos, introducirla de manera **inmediata** en un recipiente o cubeta que contenga etanol 96°. Mantener la preparación en etanol durante 15 minutos (**resulta imprescindible introducir el portaobjetos con la muestra en la cubeta del etanol INMEDIATAMENTE TRAS SU OBTENCIÓN** para fijar la muestra y evitar su alteración, ya que de otro modo la tinción podría interpretarse erróneamente).
2. Introducir el portaobjetos en un recipiente que contenga **ETANOL 70°** durante 2 minutos.
3. Introducir el portaobjetos en un recipiente con **AGUA** durante 2 minutos.
4. Introducir el portaobjetos en un recipiente con **HEMATOXILINA DE HARRIS** durante 3 minutos.
5. Introducir el portaobjetos en un recipiente con **AGUA** durante 1 minuto.
6. Introducir el portaobjetos en un recipiente con **ETANOL 70°** durante 1 minuto.
7. Introducir el portaobjetos en un recipiente con **ETANOL 96°** durante 1 minuto.
8. Introducir el portaobjetos en un recipiente con **PAPANICOLAU'S SOLUTION OG 6 DC** durante 3 minutos.
9. Introducir el portaobjetos en un recipiente con **ETANOL 96°** durante 1 minuto.
10. Introducir el portaobjetos en un recipiente con **PAPANICOLAU'S SOLUTION EA 50 DC** durante 3 minutos.
11. Introducir el portaobjetos en un recipiente con **ETANOL 96°** durante 1 minuto.
12. Introducir el portaobjetos en un recipiente con **ETANOL ABSOLUTO** durante 1 minuto.
13. Introducir el portaobjetos en un recipiente con **XILOL** durante 1 minuto.
14. Retirar y preparar para el microscopio como se indica a continuación.



#### 4. OBSERVACIÓN EN EL MICROSCOPIO

- Coger con una pipeta un poco de Medio de Montaje DPX (actúa como pegamento) y extenderlo sobre la muestra.
- Colocarle el cubreobjetos encima y presionar para pegarlo y eliminar las posibles burbujas de aire que se hayan formado.
- Dejarlo secar hasta que se quede pegado.





## FUENTES FIGURAS

- **Figura 1:** Toma de muestra vaginal. Modificada de “Procedimientos en Microbiología: Recogida, transporte y conservación de las muestras” Disponible en [www. seimc.org](http://www.seimc.org)
- **Figura 2:** En <http://www.gefor.4t.com/parasitologia/trichomonasvaginalis.html>
- **Figura 3:** En <http://motls.blogspot.com.es/2012/10/candida-uncertainties-strategies.html>
- **Figura 4:** Toma de muestra cervicovaginal. Modificada de “Procedimientos en Microbiología: Recogida, transporte y conservación de las muestras” Disponible en [www. seimc.org](http://www.seimc.org).