



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

Investigación y Selección de Métodos  
de Fijación y de Tinción Permanente  
para Formas Parasitarias

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA**

*Graciela Villanueva Rodríguez*

**SAN LUIS POTOSI, S. L. P., JULIO 1987**

T

RB49

V5

c.1



1080075721

Q + B

V I

1



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

Investigación y Selección de Métodos  
de Fijación y de Tinción Permanente  
para Formas Parasitarias

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA**

*Graciela Villanueva Rodríguez*

**SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P., JULIO 1987**

T  
RB 49  
VS



Con eterna gratitud a DIOS NUESTRO SEÑOR  
que me ha dado la vida y que a traves de  
ella me ha sabido encaminar

Con profundo amor y agradecimiento  
a mi madre:  
Sra. MARIANA RODRIGUEZ DE V.

CON MUCHO CARIÑO A MIS HERMANOS.

Con cariño

a

FEDERICO

A MI QUERIDA MAESTRA ASESORA:

Q.F.B. MATILDE CERVANTES CASTILLO.

Por el apoyo y facilidades que me brindó  
para la elaboración del presente trabajo.

A LA Q.F.B. BERTHA MA. DEL C. MAZA HDZ.

Con estimación y reconocimiento por  
su gran ayuda.

Agradezco al personal del  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA  
Por su colaboración.

A MIS MAESTROS  
CON AGRADECIMIENTO Y ADMIRACION.

A LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

# C O N T E N I D O .

INTRODUCCION .....	I
GENERALIDADES .....	3
Descripción de colorantes .....	3
Características de la fijación .....	6
Métodos para diferenciación morfológica .....	7
Preparaciones: No teñidas .....	8
Teñidas con lugol .....	9
Tinción permanente .....	10
METODOLOGIA .....	12
Fundamento de los pasos para las técnicas de fijación y de Tinción .....	13
Métodos de Fijación .....	14
Métodos de Tinción .....	18
RESULTADOS Y DISCUSION .....	23
CONCLUSIONES .....	25
BIBLIOGRAFIA .....	26

## I N T R O D U C C I O N .

La observación microscópica de las diferentes formas infectantes tanto de protozoarios como de helmintos, es un desafío para el microscopista, bien sea profesionista, técnico o estudiante, que se enfrenta por primera vez a la búsqueda de estas formas, por lo que poseer en el laboratorio preparaciones fijas es de gran utilidad. - para dominar esta situación.

Un archivo patrón permanente de estas preparaciones fijas y teñidas, facilitan la identificación clara y precisa de quistes, trofozoítos y huevecillos de los parásitos encontrados en un frotis coproparasitoscópico, y permite se utilice cuantas veces sea necesario, para demostración o referencia.

También puede encontrarse en estos frotis larvas de helmintos y para evitar que se deformen o que el colorante enmascare sus características diferenciales, es necesario utilizar colorantes especiales o métodos de aclaramiento para lograr su identificación.

Además, las preparaciones de materias fecales con tinción permanente pueden mostrar parásitos que pasan desapercibidos con otras técnicas en especial para protozoarios; a menudo debe confirmarse su presencia en preparaciones teñidas permanentes, con el fin de llegar a un diagnóstico completo y seguro.

Por todo lo anterior y porque es necesario para la enseñanza de la parasitología en esta facultad, surgió la inquietud de elaborar este trabajo con el siguiente objetivo: Investigar y seleccionar técnicas de fijación y tinción, para obtener preparaciones permanentes, de las diferentes formas de protozoarios y helmintos, encontra

dos en un frotis coproparasitoscópico y a su vez comparar la efectividad de las mismas.

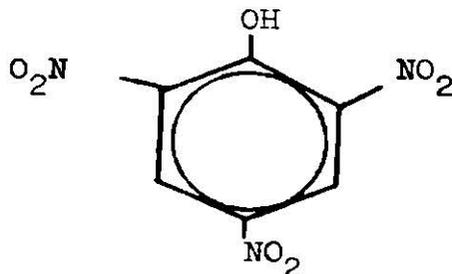
La base para lograr una preparación fija satisfactoriamente observable es una efectiva fijación de la muestra, después la elección de una tinción de acuerdo a las características de la muestra, seguida del aclaramiento y como paso final de la técnica, el montaje adecuado.

# G E N E R A L I D A D E S

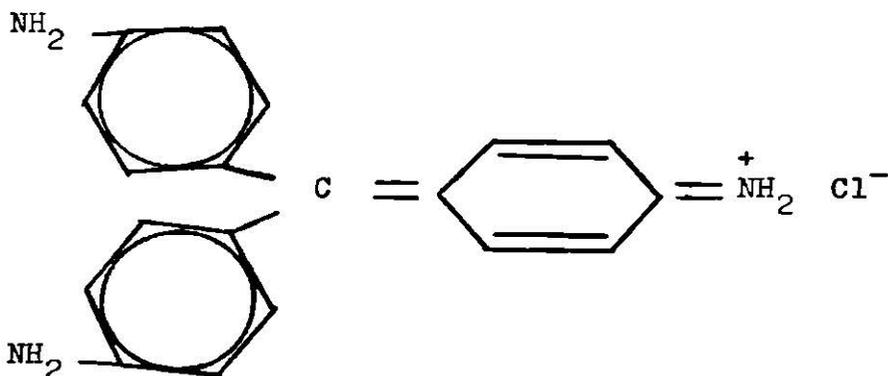
## DESCRIPCION DE COLORANTES .

La morfología de los diferentes estadios de protozoarios y - helmintos, puede estudiarse mediante exámen microscópico, en - preparaciones teñidas o coloreadas y para hacer visibles las es - tructuras, deben usarse técnicas de coloración. Los colorantes que hasta hoy más uso tienen se clasifican en naturales y sinté - ticos uno de los más importantes es la hematoxilina, colorante natural extraído con éter del corazón o duramen del árbol méxi - cano HEMATOXYLON CAMPECHIANUM. El extracto natural que se ob - tiene de la madera no es un colorante activo; primeramente debe ser oxidado para dar HEMATEINA, perdiendo el hematoxylon dos - átomos de hidrógeno y uno de sus núcleos se vuelve quinona, es - te proceso de oxidación se llama " maduración " y se puede lo - gar casi instantáneamente con oxidantes químicos como el óxido de mercurio, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno - etc. (II) (I2)

Los colorantes pueden dividirse en tres grupos: Acidos, Bási - cos y Neutros. Los más utilizados generalmente son sales com - puestas de una base y un ácido, la base consiste en un catión - con carga positiva y el anión con carga negativa; Son coloran - tes ácidos aquellos en que la sustancia colorante esta conteni - da en el radical ácido, siendo el componente básico incoloro, - por ejemplo el ácido pícrico: (I2) (I5)



Los colorantes básicos, a la inversa, tienen su componente - coloreado en la base y el radical ácido es incoloro, por ejemplo: la fuchina conocida como rosa anilina. (I5)



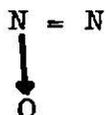
Mientras que los colorantes neutros están formados por la mezcla simultánea de soluciones acuosas de determinados colorantes-ácidos y básicos. El precipitado resultante, en general soluble exclusivamente en alcohol constituye el colorante neutro y que tiene las propiedades colorantes correspondientes a sus componentes ácidos y básicos, ejemplo: el colorante de giemsa. (II)

El motivo en virtud del cual tienen lugar las reacciones de tinción no está totalmente esclarecida, pero parece que se trata de una combinación de reacciones físicas y químicas, entre los componentes de membrana y actividad del colorante. (I2)

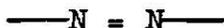
Un concepto que se maneja con seguridad es que la coloración es el proceso de teñir artificialmente los microorganismos (protozoarios y huevos de helmintos) con colorantes o reactivos para facilitar su estudio microscópico, entendiéndose por colorante un compuesto orgánico que consta de anillos bencénicos y grupos cromóforos y auxocromos. (I5)

Cromóforo o color radical es el grupo químico que da un color específico a un compuesto ligado a un grupo auxocromo para-

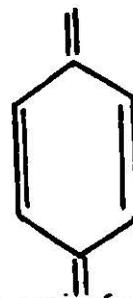
formar un tinte. Algunos ejemplos de los grupos más comunes:



Nitro



Azo



p-quinónico (I5)

Por otra parte el grupo auxocromo, suministra la propiedad de formar sales y es el responsable de transferir el color de un tinte a una sustancia o material sobre el cual actúa, este proceso es conocido como tinción.

Según el tipo de grupos auxocromos, los colorantes se dividen en dos clases:

Colorantes Básicos .- Que tienen el grupo auxocromo  $\text{NH}_2$  o  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$   
Colorantes Ácidos .- Con el grupo auxocromo  $\text{SO}_3\text{H}^-$ ,  $\text{COOH}$  u  $\text{OH}^-$

Cuando se habla de tinción directa o simple se refiere a que el microorganismo o tejido se tiñe por inmersión en el colorante en la tinción indirecta el microorganismo o tejido se tiñe solamente con la ayuda de un mordiente (enlace entre el microorganismo y el colorante, algunos materiales no se tiñen hasta que la combinación de colorante y mordiente se forme un compuesto que es capaz de adherirse firmemente al microorganismo o tejido). Una tinción progresiva es aquella dónde los elementos se tiñen lentamente en un orden determinado, mientras que la tinción regresiva tiñe los elementos en exceso y no se diferencian hasta que los compuestos del microorganismo a estudiar retienen el colorante. (II)

En la tinción negativa tiñe los elementos y el microorganismo permanece sin teñir y destaca de una coloración de fondo, para el se utilizan los colorantes ácidos y en la tinción metacromática el mi

croorganismo o parte de él se tiñe de un color diferente del que posee el colorante. (I2)

Por otro lado se conocen métodos de coloración, algunos de ellos son: Coloración vital es cuando se colorea el microorganismo vivo. Coloración intravital es la coloración de microorganismos vivos mientras todavía forman parte del organismo. La coloración supravital es la tinción de microorganismos vivos cuando se separan del organismo. Se cuenta también con colorantes específicos que solamente actúan sobre determinados constituyentes de las células dejando otros sin colorear. Y se conoce como reforzadores a las sustancias que aumentan considerablemente el poder de tinción y la selectividad de un colorante. (II)

#### C A R A C T E R I S T I C A S D E L A F I J A C I O N .

El paso fundamental en la manipulación para una preparación permanente, es una correcta fijación, ya que una muestra vieja o una fijación inadecuada, puede ser causa tanto de la coloración insuficiente de los microorganismos como de una coloración de aspecto indefinido. (2)

Existe una variabilidad en la fijación, ya que los quistes inmaduros se fijan más fácilmente que los quistes antiguos, y los quistes de Ertamoeba coli requieren una fijación más prolongada que los de otras especies. (3)

Con la fijación adecuada el material de base generalmente toma el color de acuerdo a la técnica y colorante utilizado, y se ha de tomar en cuenta para cada espécimen. (5)

Una buena fijación es aquella en la cual el agente fijador penetra rápidamente en el microorganismo, parando de inmediato los procesos metabólicos, su acción debe ser rápida y causar un mínimo de distorsión o cambios degenerativos. (4)

La mayoría de los fijadores son venenos citoplásmicos y actúan más rápido en caliente; generalmente desnaturalizan o precipitan las proteínas, las que forman una esponja o malla que tiende a englobar los otros componentes de la célula; sin embargo todos los fijadores provocan un cambio de material celular así como alteración física y química de los componentes celulares. Pero conservan las formas que se busca observar.

Un fijador en condiciones ideales debe ser estable y de fácil manejo al igual que económico. (2)

## M E T O D O S P A R A D I F E R E N C I A C I O N M O R F O L O G I C A .

Dado el interés que han demostrado los investigadores por observar las diferentes formas microscópicas de los parásitos, han desarrollado distintos criterios para diferenciar su morfología. Se mencionan aquí algunas de ellas que proporcionan bases para las realizadas en este trabajo.

PREPARACIONES DIRECTAS O NO TEÑIDAS: para E. coli los quistes son casi siempre esféricos, algunas veces ovalados y raramente irregulares; miden 15 a 25 micras, están rodeados de una doblepared, su citoplasma es granular en donde sobresalen los núcleos refringentes, los cuales varían en número de 1 a 8 aunque no es raro llegar a encontrar quistes con 16 y hasta 32 núcleos, ocasionalmente se observan una masa translúcida que corresponde a una vacuola de glucógeno en otros se ven unos cuerpos en forma de espinas o astillas refringentes, repartidas en el citoplasma -

que corresponden a las barras cromatoidales. (1)

Los quistes de E. histolytica son esféricos o ligeramente ova-  
les; refringentes y miden entre 12 y 20  $\mu$ m de diámetro, su cito-  
plasma es finamente granular, los núcleos no se aprecian pero es  
posible llegar a ver los cuerpos cromatoidales semejantes a bas-  
toncillos con extremos redondeados y muy refringentes, y en quis-  
tes de Giardia lamblia que son ovales y miden de 8 a 13  $\mu$ m de -  
largo por 6 a 8 de ancho, son incoloras y su doble pared se puede  
llegar a observar perfectamente, al mismo tiempo 2 o hasta 4 nú-  
cleos refringentes. (2)

Para Trichomona vaginalis los trofozoitos provenientes de exu-  
dados vaginalis y uretrales, presentan varias formas, en algunos  
se encuentra su clásica forma ovoide con movimientos muy rápidos  
debido a sus flagelos, en algunos el axóstilo sobresale el cuer-  
po hacia la zona posterior, aunque en la mayoría de ellos que-  
da dentro del citoplasma, la membrana ondulante es más corta que  
el cuerpo, y no se distingue fácilmente. (1) (2)

En huevecillos de Ascaris lumbricoides los fértiles son an-  
chos y ovoides, con una cápsula gruesa y transparente, consti-  
tuida por una membrana vitelina interna, la cual no se encuentra  
en los huevos infértiles, se presenta una capa media transparente  
y gruesa derivada de glucógeno y una capa mamelonada externa albu-  
minoide y generalmente se observa bien definida.

Los huevos de Himinolepis nana son semiesféricos u ovalados-  
hialinos con estructuras muy particulares tienen su membrana ex-  
terna delgada y lisa y una membrana interna que presenta en cada-  
polo dos engrosamientos polares, de cada uno parten de 4 a 5 fi-  
lamientos finos, estas membranas encierran un embrión hexacanto -  
con sus 6 estiletes característicos., miden de 50  $\mu$ m de largo por

45µm de ancho. (I) (7) (I6)

PREPARACIONES TEÑIDAS CON LUGOL: Los quistes de E. coli se pueden apreciar con sus características señaladas anteriormente a diferencia que sus núcleos se ven con su endosoma excéntrico. Si existen vacuolas de glucógeno toman un color rojizo, los cuerpos cromatoidales no se alcanzan a observar, el citoplasma según la edad de los quistes captará la coloración. Para los quistes de E. histolytica el citoplasma no se tiñe intensamente a diferencia de E. coli, cuando existe glucógeno, sobre todo en quistes inmaduros, se presenta en forma de una o más vacuolas que se tiñen más intensamente que el resto del quiste, las barras cromatoidales no se llegan a observar. (I) (2)

Los quistes de Giardia lamblia teñidos con lugol se distinguen su citoplasma, sus núcleos se tiñen bien al igual que los flagelos y los axonemas, y puede observarse de 2 a 4 núcleos según su grado de madurez. (I) (I5)

El trofozoito de T. vaginalis con lugol se puede observar con las características anteriores sólo que más bien definido, su axostilo puede o no sobresalir el cuerpo de este aunque pocas veces se observa, lo que si se ve es su movimiento en muestras recientes.

Los huevecillos de H. nana con lugol toman un color amarillo dorado y se observan bien sus características ya mencionadas incluyendo sus membranas interna y externa al igual que su embrión hexacanto.

PREPARACIONES CON TINCIÓN PERMANENTE: Los quistes de E. coli, teñidos con hematoxilina se ven de un color gris o gris azulado; y sus estructuras aparecen más oscuras; en los uninucleados el núcleo es más grande que en los otros y va disminuyendo conforme-

llegan a su madurez, la cromatina nuclear periférica tiene una distribución homogénea y el endosoma es un gránulo fino y ligeramente excéntrico, los quistes maduros son tetranucleados y sus características morfológicas son semejantes a las ya anotadas, las barras cromatoidales son más fáciles de encontrar en los quistes inmaduros. (15)

Los de E. histolytica la observación de los quistes uninucleados, la estructura del núcleo es semejante a las de los trofozoitos, los núcleos de un binucleado son más pequeños y así sucesivamente hasta los quistes maduros que tienen ocho; es posible llegar a encontrar quistes con más de ocho núcleos. Los cuerpos cromatoidales, en tinciones con hematoxilina se ven casi negros y se mejan astillas, si los quistes llegan a tener vacuolas de glucógeno este se disuelve y aquellos aparecen como grandes espacios vacíos. (7)

Para quistes de Giardia lamblia teñidos con hematoxilina se les observa su pared aunque no se tiñe y el citoplasma toma un color gris azulado uniforme, los núcleos tienen un endosoma voluminoso generalmente excéntrico y se presentan ordenados a uno y otro lado de los axonemas que dividen al quiste en dos mitades; los flagelos se observan también curvados dentro del citoplasma.

En tinciones procesadas con habilidad y experiencia es posible llegar a ver todas las estructuras mencionadas anteriormente con bastante claridad juntamente con los cuerpos parabasales. (7) - (16).

La Trichomona vaginalis teñida con hematoxilina adquiere un color gris o azul grisáceo, se observan formas muy variadas, son más grandes que las otras especies de trichomonas, cuatro flagelos anteriores se extienden a partir de su blefaroplasto, los

cuales están ordenados dentro de la membrana, esta membrana es cor  
ta, aproximadamente recorren dos tercios del cuerpo del parásito.

El núcleo se encuentra cerca del extremo anterior, contiene un-  
número de gránulos generalmente ordenados en forma de flor, dentro  
de la membrana nuclear. El citoplasma se encuentra lleno de vacuo  
las con restos alimenticios, el axostilo puede o no sobresalir el  
cuerpo del mismo. (I) (2)

Los huevos de A. lumbricoides, se observan fácilmente con la -  
aplicable tinción de lugol, sin embargo las características ya men  
cionadas, sobre todo sus tres capas son más distinguibles en tin-  
ciones permanentes como la tinción tricromática.

## M E T O D O L O G I A .

Se menciona en primer lugar fundamento y secuencia de los pasos para la elaboración de las técnicas de fijación y métodos de tinción dado que, en lo general las constantes permanecen y resultaría repetitivo escribirlas en cada uno de los métodos y técnicas.

- 1.- FIJACION: Es el proceso mediante el cual los elementos constitutivos de la célula y por lo tanto de los microorganismos, son fijados en cuanto a su estado físico y parcialmente a su estado químico, de manera que pueden resistir el tratamiento sucesivo con uno o varios reactivos sin pérdida, distorsión importante o descomposición.
- 2.- DESHIDRATAACION: El agua debe de eliminarse por completo de las preparaciones. La deshidratación se hace mediante pasos sucesivos en soluciones alcohólicas de concentraciones crecientes hasta llegar a alcohol absoluto
- 3.- TINCION: Los mejores resultados para una buena tinción se obtienen cuando ésta, se hace lo más rápidamente después de la fijación. Los colorantes en general, varían en relación a su presión osmótica, pues unos están disueltos en agua y otros en soluciones alcohólicas de distintas concentraciones por lo que es necesario, hacer pasos sucesivos antes del colorante, en soluciones alcohólicas de mayor a menor concentración o viceversa, según el colorante en solución acuosa o alcohólica respectivamente. Para tinciones contrastantes de estructuras es necesario utilizar más de un colorante, separadamente o mezclados.
- 4.- ACLARAMIENTO: Este paso es uno de los más críticos y es

aquí dónde algunas estructuras se pueden colapsar si no se tiene cuidado en el paso previo del alcohol absoluto a la solución o sustancia aclarante; generalmente hay dos pasos previos en alcohol absoluto en seguida se introducen las preparaciones en xilol que es un buen aclarante; para helmintos, se recomienda después del xilol, introducirlos en aceite de cedro, creosota o aceite de clavo que evita que las piezas se vuelvan quebradizas que es lo que pasa comúnmente con el xilol.

5.- MONTAJE: Los especímenes ya aclarados, se montan con bálsamo de Canadá o resina sintética. Para piezas grandes como proglótidos se requiere un medio de montaje espeso, mientras que para frotis debe de estar bastante diluido para posteriormente hacer una buena observación con objetivos de inmersión. Existen otros muchos medios de montaje que se utilizan para piezas que no requieren tinción previa a las cuales van adicionados un aclarante y un colorante contrastante o solo un aclarante.

6.- LIMPIEZA: Desde luego que es verdaderamente difícil preparar laminillas fijadas sin exceso de medio de montaje, por lo que generalmente después de este, es necesario esperar un tiempo variable entre diez y quince días y en ocasiones más tiempo, si se trata de un montaje de piezas grandes para acelerar el secado, se recomienda introducir las preparaciones en la estufa u horno a 60°C, después del secado, con una navaja u hoja de bisturí, se raspa el exceso de resina y se limpia con una gasa con alcohol o xilol de preferencia.

7.- ETIQUETADO: Después de la limpieza es necesario el etiquetado con los datos del parásito del que se trata, estadíos del mismo y fecha.

## T E C N I C A S D E F I J A C I O N .

Aunque existe una amplia variedad de fijadores para parásitos, solo se mencionarán, algunos de los que se realizaron en este estudio.

a).- SOLUCION FIJADORA DE SCHAUDINN:  
( método de Heidenhainn )

REACTIVOS:

Solución acuosa saturada de cloruro mercuríco	2 v+
Alcohol etílico al 95%	I v
Acido acético glacial (por cada 100 ml de sol'n)	5 ml

TECNICA:

- I- Preparar sobre una laminilla un frotis de materia fecal.
- 2- Introducir los frotis sin dejar secar en el fijador de Schaudinn, al cual se le ha agregado un 5% de ácido acético glacial, durante 30 minutos a 60°C.  
Esta solución se prepara inmediatamente antes de utilizarse.

b).- FIJADOR DE SCHAUDINN:  
( método tricrómico, sin ácido)

REACTIVOS:

Alcohol etílico al 95%	I v
Solución acuosa saturada de cloruro mercuríco	2 v

TECNICA:

- I- Preparar sobre una laminilla un frotis de materia fecal.
- 2- Introducir los frotis sin dejar secar en el fijador de

Schaudinn, durante 30 minutos a 60°C

+ Volúmenes.

c).- SOLUCION FIJADORA CON FORMOL, LUGOL Y GLICERINA:

REACTIVOS:

Formol al 10%  
Solución de lugol.  
Glicerina q.p.

TECNICA:

- 1- Colocar en una laminilla una gota de la muestra, previamente tratada por el método de concentración.
- 2- Dejar hasta que la muestra quede semiseca.
- 3- Poner una gota de formol, una de lugol y una de glicerina-esparcirlas por todo el frotis.
- 4- Colocar un cubreobjetos sobre la extensión.
- 5- Sellar con bálsamo de Canadá.

d).- FIJACION CON ALCOHOL METILICO:

( método de Heidenhainn, procedimiento rápido )

REACTIVOS:

Alcohol metilico de 80 a 100%

TECNICA:

- 1- Preparar sobre una laminilla un frotis de materia fecal.
- 2- Introducir los frotis, sin dejar secar en alcohol metilico de 80 a 100%, el tiempo necesario.

e).- SOLUCION FIJADORA DE TURDYEV:

( especial para E. histolytica y otros protozoarios)

REACTIVOS:

Solución acuosa de nitrito de sodio al 0.2%	85 v
Solución fuerte de lugol	3 v
Formol sin diluir (formaldehído al 40%)	10 v
Glicerina q.p.	2 v
Acido acético glacial (5 gotas por 100 ml de sol'n)	5 g

TECNICA:

- 1- Colocar en una laminilla una gota de la muestra, previamente tratada por el método de concentración o flotación.
- 2- Agregar 3 gotas de la solución fijadora de Turdyev.
- 3- Con la esquina de un cubreobjetos, esparcirlo por todo el frotis.
- 4- Colocar un cubreobjetos sobre la extensión.
- 5- Sellar o montar con bálsamo de Canadá o bien proseguir con la técnica de coloración después del paso No. 3

f).- FIJACION CON GLICERINA AL 50%

( para protozoos y helmintos )

REACTIVOS:

Glicerina q.p.  
Agua destilada.

TECNICA:

- 1- Colocar en una laminilla una gota de la muestra, previa

mente tratada por el método de concentración o flotación.

- 2- Dejar hasta que la muestra quede semiseca.
- 3- Poner dos gotas de glicerina al 50%, y con la esquina de un cubreobjetos esparcirla por todo el frotis.
- 4- Colocar un cubreobjetos sobre la extensión.
- 5- Sellar con bálsamo de Canadá.

g).- FIJACION CON ALBUMINA DE HUEVO:

REACTIVOS:

Albúmina de huevo.

Agua destilada.

TECNICA:

- 1- Frotar la laminilla con una torunda previamente húmeda con albúmina de huevo.
- 2- Sobre esta hacer un frotis de materia fecal.
- 3- Dejar secar el tiempo necesario.
- 4- Proseguir con la técnica de coloración.

## M E T O D O S D E T I N C I O N .

### HEMATOXILINA FERRICA DE HEIDENHAINN:

Específica para quistes y trofozoitos en preparaciones permanentes, con el inconveniente de procesación lenta.

### PROCEDIMIENTO:

- Hacer una fijación Turdyev de la muestra, indicada en la página 16.
- Introducir en alcohol yodado, durante 5 minutos.
- Lavar al chorro del agua, cuidando que no se barra el frotis.
- Introducir en alumbre férrico al 2% a 40°C. durante 3 minutos.
- Lavar con agua.
- Colocar el frotis en la solución colorante de hematoxilina al 0.5% por espacio de 15 minutos.
- Lavar con agua durante 3 minutos.
- Introducir en solución saturada de ácido picrico, el tiempo necesario.
- Lavar con agua durante 15 minutos.
- Realizar un baño de alcohol al 70%
- Pasar por dos baños de alcohol al 95% por espacio de un minuto cada uno.
- Introducir en alcohol absoluto por espacio de 2 minutos.
- Introducir en xilol por espacio de 3 minutos.

- Montar o sellar con bálsamo de Canadá.
- Etiquetar la preparación.
- Observar al microscopio.

TINCION DE HEMATOXILINA Y EOSINA:

Esta técnica se utiliza para protozoarios intestinales y de cavidades, con la ventaja de una coloración bien definida y perdurable.

PROCEDIMIENTO:

- Fijación turdyev de materia fecal u otro producto biológico
- Introducir en alcohol yodado durante 1 o 2 minutos.
- Lavar en agua destilada.
- Introducir en baño de solución acuosa de hiposulfito de sodio. durante 3 minutos.
- Lavar en agua destilada.
- Colocar el frotis en solución colorante de hematoxilina al 0.5% el tiempo necesario, puede variar entre 10 y 15 minutos.
- Lavar con agua destilada adicionada de unas gotas de carbonato de litio durante 5 a 10 minutos.
- Introducir en solución acuosa de eosina durante 1 minuto.
- Lavar en agua destilada.
- Deshidratar en alcoholes de 50%, 70% a absoluto por espacio de un minuto en cada uno.
- Dos pasos de xilol de un minuto cada uno.

- Montar con resina o bálsamo de Canadá.
- Etiquetar la preparación.
- Observar al microscopio.

#### COLORACION DE GIEMSA:

Este es el clásico método de tinción para parásitos tisulares; la técnica también es útil para flagelados intestinales y de cavidades.

#### METODO PARA FLAGELADOS Y DE CAVIDADES:

##### PROCEDIMIENTO:

- Se coloca una gota de suero en el extremo de una laminilla.
- Al lado se coloca un mg de heces o una gota de secreción vaginal o algún otro producto.
- Se mezcla con el suero y se hace una extensión.
- Se cubre con algunas gotas de alcohol metílico durante dos a tres minutos, dejando que se seque.
- Se cubre con la solución de trabajo y se deja actuar durante 20 a 30 minutos, puede variar hasta 2 horas.

La solución de trabajo giemsa: previamente preparada con solución madre y solución buffer de giemsa.

- Se lava suavemente con agua de la llave.
- Dejar secar el tiempo necesario.

- Montar con bálsamo de Canadá.
- Etiquetar la preparación.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

TINCIÓN TRICROMÁTICA DE GOMORI:

Es la técnica permanente preferida para el diagnóstico - usual, de procesamiento rápido y además recomendable en preparaciones sistemáticas.

PROCEDIMIENTO:

- Fijación turdyev de la muestra, previamente tratada - por un método de concentración o flotación.
- Lavar con alcohol al 70%, en tiempo necesario.
- Introducir en alcohol yodado durante 1 a 10 minutos.
- Dos lavados de alcohol al 70% de 2 minutos cada uno.
- Tinción tricromática mediante 10 a 20 minutos.
- Alcohol acidificado 90% (ácido acético al 1%) dos inmersiones.
- Dos lavados de alcohol al 95% de 3 a 5 minutos cada uno.
- Carbón xileno mediante 2 minutos.
- Dejar en xileno 2 minutos.
- Montar inmediatamente con bálsamo de Canadá.

- Etiquetar la preparación.
- Observar al microscopio.

## R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N .

De los distintos metodos de fijación estudiados en este trabajo se observó que al aplicar la técnica de Schaudinn las muestras se cristalizaban, tal vez debido a la temperatura de 60°C y a la acción del ácido acético, por lo que se optó trabajar las muestras a la temperatura ambiente y sin ácido, obteniendose así mejores resultados.

La fijación con alcohol metílico al 80% destruyó los quistes - aquí se piensa pudo influir la concentración del alcohol, ya que es conocido que este alcohol tiene la propiedad de ser tóxico y - la acción de estos agentes es bactericida o bacteriostática por - lo tanto se puede creer que ocurre un rompimiento de la membrana - del microorganismo permitiendo a su vez la alteracion de propie - dades físicas y químicas y como consecuencia la deformación de es - tas formas, mientras que la fijación de glicerina al 50% dio buenos resultados al igual que la fijación de formol, iodo y glicerina se obtuvo una fijación adecuada y por lo tanto una observa - ción más precisa.

Para este trabajo se seleccionó la técnica de fijación TURDV<sup>TV</sup> porque se lograron resultados óptimos para la observación de quistes y huevecillos así mismo para larvas, tanto en fijación húmeda como en seco; la primera es para parásitos que no requieren tinción por ejemplo en el caso de huevecillos de T. trichuria y la segunda es adecuada para microorganismos que necesariamente deben teñirse para fines de observación, y obtener preparaciones permanentes como en el caso de observación de amibas.

En cuanto a los métodos de tinción, aunque existe gran cantidad de técnicas según investigación bibliográfica se decidió para tra-

bajar con las que más especificaciones marcan para protozoarios y helmintos, observándose que una de las técnicas primordiales es la hematoxilina, para el propósito de este trabajo se eligió la modificación de Heidenhainn y los resultados obtenidos fueron aceptables pues los parásitos tomaron una tonalidad azulosa o grisáceos con núcleos oscuros casi negros, los cuerpos cromatoidales de los quistes amibianos y las inclusiones como bacterias o glóbulos rojos se tiñen de negro y el fondo de la preparación suele ser azul gris, lo que ayuda a diferenciar los parásitos.

Por otro lado con la tinción de Hematoxilina Eosina se obtuvieron buenos resultados en cuanto a coloración de las muestras ya que la eosina contratiñe y la preparación toma un color rosa intenso; los núcleos de los quistes se ven claramente mientras que los huevecillos toman una tonalidad bien diferenciable de acuerdo a sus características morfológicas.

La coloración de Giemsa específica para cavidades, se utilizó para teñir *Trichomona vaginalis* dando resultados poco aceptables, sin embargo para otras muestras como quistes de *E. coli* dió mejores resultados, pues se distinguieron con bastante claridad.

La coloración TRICROMÁTICA se seleccionó por ser un método rápido y ofrece buenos resultados en estudios cotidianos a su vez es sencillo, pues no es necesario sobreteñir y luego aclarar, como en la tinción de hematoxilina eosina, aún así resaltan los detalles morfológicos de los parásitos. Así, se observa muy claro que los huevecillos bien teñidos toman un color azul verdoso con tintes púrpura, la cromatina nuclear, cuerpos cromatoidales y glóbulos rojos, bacterias pueden aparecer de un color rojo o púrpura lo cual define muy bien los quistes, otras partículas como levaduras suelen teñirse de verde. Los huevos de *A. lumbricoides* tanto

fértiles como infértiles toman una coloración verde y las larvas de *Enterovius vermicularis* toman una coloración purpura distinguiéndose claramente su bulbo esofágico. Es frecuente que los huevecillos se aplasten en el medio de montaje, por esto se trabajó con fijación húmeda de esta misma manera la tinción así preparada es bastante aceptable, para identificación de quistes, huevecillos y larvas.

En cuanto al montaje de las preparaciones se probaron varias técnicas como el sellar con esmalte de uñas, dando resultados no muy confiables pues permite la entrada de aire y por consiguiente la desecación progresiva de la muestra. Se trabajó también el sellado con resilicón y debido a que este tarda en secar varias horas permitiendo también la entrada de aire; de la misma manera se selló con parafina pura la cual al secarse resbala con el vidrio e impide el sellado.

Finalmente se hizo el medio de montaje como lo indican varios autores con bálsamo de Canadá, dando buenos resultados tanto en preparaciones en fresco como en húmedo, aquí se pudo observar que el tiempo de solidificación de este es demasiado y hace la muestra pegajosa cuando el sellado se realiza en la periferia de la muestra, por lo que se probó hacer este mismo montaje con la diferencia que el bálsamo quede entre el cubreobjetos y la muestra dando mejor resultado y aspecto al mismo tiempo.

## C O N C L U S I O N E S .

En la elaboración de esta investigación se llega a las siguientes:

Se decidió por la fijación turdyev, pues es el método que causa la menor distorsión en la morfología y características de los parásitos.

Aceptación de las tinciones Tricromática modificada por Gomori y la de hematoxilina eosina de Cowdry, por obtener una buena tonalidad de los microorganismos, siendo mejor la segunda debido a - que mantiene sus características tintoreas por tiempo indefinido.

En cuanto al montaje se da por eficaz el del bálsamo de Canadá puesto que es el que más perdura o bien hace que se conserven las muestras con sus características iniciales.

Se cumple con el objetivo de investigar, comprobar y montar - técnicas de fijación y de coloración de las distintas formas infectantes de parásitos, para elaborar un archivo patrón de preparaciones permanentes que sean de utilidad para la enseñanza de la parasitología.

B I B L I O G R A F I A .

- ( 1 ) Salazar Shetino Paz María, de Haro Arteaga Irene. Manual de técnicas para el diagnóstico morfológico de - la parasitosis. Ia edición 1980.
- ( 2 ) Shore García Ash. Diagnóstico Parasitológico. Manual de Laboratorio Clínico, Ed. Médica Panamericana.
- ( 3 ) M. Melvin Dorothy, M. Broque Marion. Métodos de Labo- ratorio, Diagnóstico de Parasitosis Intestinales, Nueva editoreal interamericana, s.a. de c.v. 1971.
- ( 4 ) Carrol Faust Ernest, Farr Rusell Paul. Rodney Clifton Jung. Parasitología Clínica. 8a. edición, Salvat edi- tores, s.a. de c.v. reimpresión 1981.
- ( 5 ) Kolmer A. Jhon, Buerner Fred. Métodos de Laboratorio Clínico, Parasitología Clínica, Bacteriología, Micologia, Serología, Bioquímica e Histología. Ia edición - española.
- ( 6 ) Kruff A. Marcus, Herney M. Lawrence jr. Jawetz Er - nest Roc J. Robert, Camargo A. Carlos. Manual de Diag - nóstico Clínico y de Laboratorio. Manual Moderno. septima edición 1985.
- ( 7 ) Brown Harold. Parasitología Clínica. 4a. edición In - ternacional. 1977.
- ( 8 ) Martínez Baez Manuel. Manual de Parasitología Médica. 2a. edición. La prensa médica 1967.

- ( 9 ) L. Belding David. Text Book of Clinical Parasitology  
Appleton - Century, Crofts Inc. second Edition. New  
York.
- ( IO ) Todd - Sanford, t. David Jhon, J.B. Henry. Diagnos -  
tico Clínico para el Laboratorio, Mallorca 43. Barce  
lona. Salvat editores. 1972.
- ( II ) F. J. Boker, M. R. Breach. Manual de técnicas Bacte-  
riologicas. Traducido de la 2a. edición inglesa por  
editores Acribia Zaragoza (España) 1970.
- ( I2 ) Bryan Arthur, Bryan A. Charles, Bryan G. Charles. -  
Bacteriologia. Traducido de la sexta edición. Cia -  
Editoreal Continental, s.a. de c.v. 9a. impresión.-  
1984.
- ( I3 ) Lynch Dr. Mattheims. Métodos de Laboratorio. 2a. edi-  
ción., 4a. reimpression, México nueva editoreal inte-  
ramericana, s.a. de c.v. 1977.
- ( I4 ) Haeley G. Gessner. Diccionario de Quimica. Edición  
Omega, s.a. Barcelona 1975.
- ( I5 ) Devore G. Quimica Orgánica, traducido por Muñoz Mena  
E. 9a. reimpression. México, publicaciones culturales  
1979.
- ( I6 ) Martínez Torres Virginia. Técnicas de Laboratorio en  
la investigación de parásitos humanos. Facultad de-  
Ciencias Quimicas, S.L.P.

- ( I7 ) Toray - Masson. L. Brut, V. Brut. Parasitología práctica. primera edición 1969. Barcelona España.
- ( I8 ) Sonnewirth Jarett. Métodos y Diagnóstico de Laboratorio Clínico. Ed. Grandworl.
- ( I9 ) Pérez Caraveo Silvia Patricia. Memorias en el curso de posgrado de Parasitología, revisado en 1979. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- ( 20 ) Jawetz Ernest, L. Melnick Joseph, Adalverg Edward. - Microbiología Médica 8a. edición. Manual Moderno, - s.a. 1979.
- ( 21 ) Jeffrey Hc, Leach R. M. Atlas of Medical. Helminthology & Protozoology, 2a ed. Livingstone, 1975.
- ( 22 ) Garcia L.S., Ash L.R. Diagnostic Parasitology. Clinical Laboratory Manual, 2a. ed. Mosby 1979.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE  
SAN LUIS POTOSI  
CIENCIAS QUIMICAS

BIBLIOTECA \_\_\_\_\_

COLOCACION \_\_\_\_\_

Q.F.B. V51i 1987

AUTOR VILLANUEVA RODRIGUEZ, GRACIELA

TITULO INV. Y SELEC. DE METODOS DE FIJ. Y DE  
TINGION PERM. P. FORM. PARASITARIAS.

DEPARTAMENTO \_\_\_\_\_

BIBLIOTECA

FECHA DE  
VENCIMIENTO

NOMBRE DEL SOLICITANTE

FECHA DE VENCIMIENTO	NOMBRE DEL SOLICITANTE

Q.F.B.  
V51i  
1987

