

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



73

**VALORACION COMPARATIVA DE TRES METODOS
DE COLORACION PERMANENTE PARA EL
DIAGNOSTICO DE PROTOZOOS CAVITARIOS**

MARIA DEL CARMEN DE LA CRUZ OTERO

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

(BIOQUIMICO MICROBIOLOGICO)

1 9 8 0

*De la cruz
Otero Maria
del Carmen*



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

	PRESIDENTE PROF.:	<u>DIONISIO PELAEZ FERNANDEZ</u>
	VOCAL "	<u>MA. LUISA GARCIA PADILLA</u>
Jurado asignado originalmente según el tema.	SECRETARIO "	<u>LUIS SALINAS MADRIGAL</u>
	1er. SUPLENTE "	<u>JOSE ROBERTO BARRIOS DEL VALLE</u>
	2o. SUPLENTE "	<u>PAZ MARIA SALAZAR SCHETTINO</u>

Sitio donde se desarrolló el tema: DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA HUMANA,
LABORATORIO DE PARASITOLOGIA, FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.

Sustentante: MARIA DEL CARMEN DE LA CRUZ OTERO

Asesor del tema: DR. DIONISIO PELAEZ FERNANDEZ

A mis padres

A mi hermano

A mi abuelita

Al H. Jurado

Al Maestro
Dionisio Peláez F.

Al Dr. Rubén Alvarez Chacón

A mis tios Manuel y Juanita

A los Sres. Villicaña-Díaz

A la familia Arzate de la Fuente

A G R A D E C I M I E N T O S :

A la Dra. Paz María Salazar S. y personal del Laboratorio de Parasitología del Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina (UNAM); Dr. Jorge Tay Z ; Dr. Manuel Gutiérrez Q.; Dra. Adela Ruiz H.; Dr. Enrique Navarrete C.; y Dr. Joaquín Carrillo F.

INDICE

I.	OBJETIVO	1
II.	INTRODUCCION	2
III.	MATERIAL Y METODOS	10
IV.	RESULTADOS	21
V.	COMENTARIOS Y CONCLUSIONES	24
VI.	BIBLIOGRAFIA	26

1. OBJETIVO:

Investigar la eficiencia del colorante Negro de Clorazol E, para teñir y destacar características morfológicas diagnósticas de protozoarios, en comparación con 2 métodos de tinción clásicos: el de Hematoxilina férrica de Heidenhain y el Tricrómico de Gomori.

II. INTRODUCCION.

Frecuentemente, al tratar de hacer el diagnóstico definitivo de los protozoarios intestinales o de cavidades en un examen directo, especialmente de amibas, recurrimos a métodos de coloración permanente para hacer manifiestas las características morfológicas indispensables para tal fin. Los métodos de coloración que han demostrado ser eficientes y que son universalmente usados para teñir protozoarios intestinales, en general, emplean Hematoxilina. Entre estos métodos clásicos destaca principalmente el de la Hematoxilina férrica de Heidenhain, que es un procedimiento complicado y que requiere invertir mucho tiempo; pero existen varias modificaciones que dan resultados satisfactorios para el diagnóstico en un período mas corto.

En 1959, Barreto y Zago hicieron un estudio comparativo de los siguientes métodos rápidos de coloración: Hemalum de Mayer (1901), Hematoxilina férrica de Weigert (1904), Hematoxilina férrica de Walker (1908), Hemalum de Lillie (1942), Hematoxilina férrica de Noble (1944), Hematoxilina fosfotúngstica de Ratcliffe y Parkins (1944), Hematoxilina férrica de Goldman (1949) y el método de Lawless (1953), los cuales emplean mordente y colorante (Hematoxilina en todos, excepto el último) en una solución única, y encontraron que solamente con el Hemalum de Mayer y el Hemalum de Lillie obtenían resultados satisfactorios.

por largo tiempo, uniformidad en coloración y rapidez con que se realiza la técnica; pero, aunque poseen estas características, no destacan los detalles morfológicos tan bien como en los métodos clásicos de tinción, siendo los resultados mejores con aquellos métodos que emplean dos soluciones para la coloración, que con los que requieren de una sola.

Otro método de coloración ampliamente usado es el Tricrómico de Gomori (1950), quien le aplicó a cortes de tejidos de un caso de amibiasis severa, y vió que la cromatina de Entamoeba histolytica tiene afinidad por el colorante Cromotropo 2R. Wheatley (1951) encontró que, con cambios apropiados en la fijación y la deshidratación, este método puede emplearse para teñir amibas y flagelados intestinales, en los que la cromatina se colorea en variedad de tonos rojos, mientras que el citoplasma se tiñe de verde claro o rosado pálido. Así con este método pudo observar detalles morfológicos para el diagnóstico de quistes de Entamoeba histolytica, Entamoeba coli, Iodamoeba bütschlii y Giardia lamblia.

Posteriormente Kohn (1960), empleando el colorante Negro de Clorazol, describió un método para teñir protozarios intestinales. El Negro de Clorazol fué descubierto accidentalmente en 1937 por H. Graham Cannon, mientras disecada un pequeño crustáceo sobre un trozo de terciopelo negro que utilizaba como fondo; el tinte se disolvió e hizo tomar un color verde oscuro a la quitina. Hirvió el trozo de terciopelo en una solución alcohó-

lica y obtuvo una solución negra que envió a la Imperial Chemical Industries, Ltd., y su Grupo de las Substancias Tintoreales la investigó, produciendo un colorante del grupo tri-azo de la serie Clorazoles, al que de nominaron "Chlorazol Black E". Este colorante se distribuye ahora por diferentes laboratorios con varios nombres: la National Aniline Division de la Allied Chemical Co., como "Erie Black GX00"; I.E. Pont de Nemours y Co., como "Pontamine Black E". En experimentos ulteriores, se encontró que este colorante sirve muy bien para diversas tinciones citológicas. Así, Cannon (1937) observó que tiñe de negro núcleos y cromosomas, rivalizando en estos efectos con la Hematoxilina férrica, al mismo tiempo que el citoplasma adquiere tonos grises. Dicho autor recomienda una solución saturada del colorante en alcohol de 70% para teñir cortes histológicos, en unos 15 a 30 minutos, pero no da muchos detalles acerca del uso del colorante. Posteriormente, se ha utilizado por otros investigadores: Nebel (1940) describió el uso del Negro de Clorazol, como un colorante auxiliar, para hacer la cuenta de cromosomas en células vegetales tratadas con colchicina, en aquellos casos donde el acetocarmín no fué satisfactorio. Darrow (1940) propuso un método en el cual, después de fijar diversos cortes histológicos (tejido epitelial, riñón e intestino de embrión de conejo) y citológicos (de Puccinia) en soluciones de Zenker, Bouin o Allen, los tiñó durante 5 a 10 minutos en una solución de Negro de Clorazol al 1% en alcohol de 70% y obtuvo una clara diferenciación de los elementos tisulares en tonos negro, verde o verde-amarillentos.

En dicho trabajo los autores mencionan que un buen método de coloración debe reunir los siguientes requisitos:

- 1.- Coloración selectiva de las estructuras nucleares y citoplásmicas que son esenciales para el diagnóstico diferencial.
- 2.- Empleo de soluciones estables durante largo tiempo.
- 3.- Que tina con regularidad trofozoitos y quistes.
- 4.- Uso de soluciones fáciles de preparar y que contengan reactivos fáciles de eliminar.
- 5.- Empleo del menor número posible de soluciones.
- 6.- Que evite el proceso de diferenciación y que sea rápido.

Posteriormente, en 1960, Barreto y Zago, realizaron una evaluación de algunos métodos rápidos que requieren dos soluciones diferentes para la tinción, esto es, el empleo de mordente y colorante en soluciones separadas, como los de la Hematoxilina fosfotúngstica de Dobell (1942), Hematoxilina molibdica de Dobell (1942), Hematoxilina férrica de Tompkins y Miller (1947), Hematoxilina férrica de Alli (en Craig, 1948) y Hematoxilina férrica de Markey y cols. (1943), y solamente con el último, combinado con el mordente Lang (1936), obtuvieron excelentes preparaciones para el diagnóstico de protozoarios intestinales. De ambos trabajos ellos concluyeron que tanto el Hemalum de Mayer, como el de Lillie y el de la Hematoxilina de Markey, cumplen con los requisitos de emplear soluciones estables

Levine y Morrill (1941) confirmaron los hallazgos de Darrow, y sugirieron el empleo de una solución al 0.5% en alcohol al 70% para una tinción simple de tejido conjuntivo, con muy buenos resultados. El valor del Negro de Clorazol como colorante biológico, también fue ensalzado por Conn (1943) cuando lo empleó en solución acuosa al 1% para teñir cromosomas de la parte terminal de las raíces de cebolla, logrando preparaciones excelentes para fotomicrografía; los cortes se fijaron previamente en las siguientes soluciones: Cromo-acético, GRAF, Benda, Bouin, Zirkle o Carnoy, y la solución de Bouin fué la que dió los mejores resultados. Los cromosomas y el nucleolo se tiñeron intensamente de negro, en contraste con el color verde brillante del citoplasma y gris oscuro del núcleo; sin embargo, este autor dice que la solución alcohólica del colorante recomendada por Darrow y por Levine y Morrill, no es aplicable para teñir cromosomas.

Cannon (1950) observó que las propiedades tintoriales del Negro de Clorazol son diferentes según el disolvente empleado: con la solución alcohólica, la pared de células vegetales toma un color negro y las estructuras restantes, colores que van desde el amarillo, a través de gris verdoso, hasta el negro. Las medusas y crustáceos diminutos se tiñen de diversos colores cuando el colorante se disuelve en alcohol etílico o benzoico. En Micología es útil para teñir preparaciones de Penicillium cuando se emplea disuelto en alcohol metílico, pues colorea los núcleos con más facilidad que

el citoplasma, por lo que no es necesario el proceso de diferenciación.

Baker (1941) le empleó como colorente supravital, inoculando su solución acuosa al 1% subcutáneamente a ratones, y encontró que el colorante se había difundido localmente debajo de la piel, tiñendo únicamente el área circundante al sitio de inoculación, a diferencia de otros colorantes supravitales que tiñen toda la piel del organismo. En cortes de piel los histiocitos mostraron gran cantidad de colorante fagocitado, en contraste con el resto del tejido en que el citoplasma se tiñó de anaranjado y los núcleos de rojo. Este nuevo colorante, así como otros supravitales, son azo-compuestos sulfonados; pero, mientras el Azul de Niágara, el Tripán azul, el Tripán rojo, el Rubí congo, etc., sólo poseen dos enlaces azo, el Negro de Clorazol tiene tres.

En relación con la propiedad de actuar como colorante supravital, ésta no puede atribuírsele únicamente al peso molecular del colorante, sino también al tamaño relativo de la molécula, como lo sugirieron Gordon y Chambers (1941).

Otra aplicación importante fue demostrada con el trabajo de Klatzo y McMillan (1952) quienes usaron el Negro de Clorazol con una nueva técnica para el diagnóstico rápido de tumores cerebrales, los cuales pueden ser diferenciados claramente del tejido normal mediante características nucleares, citoplásmicas y del tejido vascular conjuntivo. El tejido normal mues-

tra un fondo oscuro, mientras que el área tumoral tiene un fondo claro. Dichos autores refieren que el método puede aplicarse tanto a tejido reciente como a material conservado, destacando detalles morfológicos necesarios para el diagnóstico de casos en los cuales fallan los métodos de congelación rápida.

Hasta aquí nuestra revisión muestra como el Negro de Clorazol ha sido aplicado en Histología botánica y animal, gracias a su propiedad de metacromasia. El Negro de Clorazol también ha sido empleado para teñir protozoarios intestinales: Dobell (1938) aplicó este colorante a quistes de Entamoeba histolytica y observó que el núcleo y cuerpos cromatoides se tiñen de negro, en contraste con el color verdoso de la pared quística y el color rojo del glucógeno.

Fue en 1960 cuando Kohn describió el método de coloración para protozoarios intestinales, empleando una solución alcohólica-acético-fosfotúngstica del colorante. Observó que, en los protozoarios, el endosoma, el núcleo, los cuerpos cromatoidales y la pared celular se tiñen de negro, y que el citoplasma toma un color rosa en quistes de Entamoeba coli, y de gris o azulado en los de Entamoeba histolytica. Las causas de esta diferencia de coloración en el citoplasma son desconocidas. Kohn observó que la intensidad y la diferenciación de la coloración pueden acentarse con ligeras variaciones en la concentración del ácido fosfotúngstico,

así, al disminuirla se obtiene un color más intenso y viceversa. Gleason y Healy, en 1965, encontraron que diluyendo la solución empleada por Kohn, o variando el tiempo de tinción, variaba la intensidad de la coloración de los protozoarios.

III. MATERIAL Y METODOS

Las muestras de materia fecal, colectadas sin conservador en recipientes de vidrio de boca ancha, limpios y tapados herméticamente, fueron llevadas al Laboratorio de Parasitología del Hospital de Desarrollo e Integración Familiar. Allí investigaron las heces diarréicas por examen directo y las heces sólidas mediante el método de Ferreira y seleccionaron aquellas en las que encontraron trofozoitos o quistes. Entonces, dichas muestras fueron enviadas al Laboratorio de Parasitología del Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina (U.N.A.M.) donde de inmediato, se procesaron simultáneamente por las siguientes técnicas de coloración: Hematoxilina férrica de Heidenhain, Tricrómico de Gomori y el método de Kohn.

Las muestras de materia fecal no recibieron tratamiento alguno antes de seguir con ellas cualquiera de las técnicas de coloración. Cuando se trataba de heces líquidas, para lograr su adhesión al cubreobjetos, aplicamos una película delgada de albúmina de Mayer que dejamos secar a la temperatura ambiente del laboratorio (19° - 24°), sobre la cual hicimos los extendidos. Este procedimiento también lo utilizamos cuando tratamos de teñir trofozoitos de Entamoeba histolytica mantenidos en medio de cultivo.

HEMATOXILINA FERRICA.

Reactivos:

Solución de Hematoxilina:

Hematoxilina de Short al 1%

Hematoxilina en polvo 1 g

Agua destilada 95 ml

Disolver lentamente a ebullición y cuando se ha disuelto completamente, añadir:

Fenol líquido 5 ml

Después de enfriarse, la solución está lista para ser usada.

La solución de tinción se prepara diluyendo con agua destilada la cantidad necesaria de Solución Madre (al 1%).

Solución fijadora (Schäudinn):

Solución acuosa saturada de cloruro mercurico 200 ml

Alcohol etílico absoluto 100 ml

Acido acético glacial 15 ml

El ácido acético se agrega en el momento de usar la solución.

Solución de Alumbre férrico:

Cristales de sulfato aluminico férrico 2 g

Agua destilada 100 ml

Esta solución se debe preparar recientemente, antes de usarse.

TECNICA (Según Faust, 1937):

- 1.- Fijar las extensiones en solución de Schaudinn calentada a 60° durante 2 minutos.
- 2.- Sumergir los cubreobjetos en Alcohol de 70%; Alcohol de 70% yodado (Alcohol de 70% al que se le ha agregado suficiente Yodo para producir un color vino de Oporto); Alcohol de 70% y 50%, 2 minutos en cada uno.
- 3.- Lavar en agua de la llave durante 2 minutos.
- 4.- Sumergir las extensiones en solución acuosa de Alumbre férrico calentada a 40° durante 2 minutos.
- 5.- Lavar en agua de la llave por espacio de 3 minutos.
- 6.- Tefir con Hematoxilina al 0.5%, de 10 a 15 minutos.
- 7.- Lavar en agua de la llave durante 2 minutos.
- 8.- La diferenciación se hace en solución acuosa saturada de Acido pícrico (Tuan, 1930), durante 5 minutos.
- 9.- Lavar en agua de la llave durante 10 a 15 minutos.
- 10.- Pasar a Alcohol de 70% 2 minutos, dos cambios.
- 11.- Pasar a Alcohol de 95% 2 minutos, dos cambios.
- 12.- Sumergir en Alcohol absoluto rápidamente.
- 13.- Aclarar en Xilol.
- 14.- Montar en resina sintética.

TRICROMICO DE GOMORI (Según Wheatley, 1951):

Reactivos:

Solución de tinción:

Cromotrope 2R	0.6 g
Verde brillante SF	0.3 g
Acido fosfotúngstico	0.7 g
Acido acético glacial	1 ml
Agua destilada	100 ml

TECNICA:

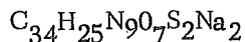
- 1.- Hacer una extensión delgada de materia fecal en cubreobjetos de 22 x 22 mm del número 1, y colocarla en solución de Schaudinn (sin ácido acético), durante 30 minutos a una hora.
- 2.- Lavar en Alcohol de 70% yodado, durante 2 minutos.
- 3.- Pasar a Alcohol de 70% 2 veces, 2 minutos en cada uno.
- 4.- Lavar en Alcohol de 50%, 2 minutos.
- 5.- Enjuagar en agua de la llave.
- 6.- Teñir durante 30 minutos.
- 7.- Sumergir rápidamente en Alcohol de 95%.
- 8.- Pasar a Alcohol absoluto, 1 minuto.
- 9.- Dejar los cubreobjetos en Xilol durante 5 minutos.
- 10.- Montar en Resina sintética.

METODO DE KOHN.

Para la coloración de protozoarios intestinales, Kohn (1960) empleó una solución de tinción única, esto es, reunió fijador, colorante y diferenciador en un sólo reactivo.

Características químicas del Negro de Clorazol (Gurr, 1960):

Peso Molecular: 781.738



% de Solubilidad a 15° en:

Agua	6.0
Alcohol absoluto	0.1
Cellosolve	2.25
Etilenglicol (anhidro)	5.0
Xilol	NO

Nota: El colorante utilizado en este trabajo, fue el Negro de Clorazol E, distribuido bajo esta denominación por Harleco (México), debido a la dificultad de obtención de la fórmula original del Chlorazol Black (G.T. Gurr Londres, Inglaterra) utilizada por Kohn.

Reactivos:

Solución Madre:

- a) Negro de Clorazol E en polvo 5 g
- b) Solución Básica:

Alcohol etílico de 90%	170 ml
Alcohol metílico	160 ml
Acido acético glacial	20 ml
Fenol líquido	20 ml
Acido fosfotúngstico al 1%	12 ml
Agua destilada	hasta 1000 ml

Preparación de la Solución:

Se colocan 5 g de Negro de Clorazol E en un mortero y se muelen durante 3 minutos, se añade una pequeña cantidad de Solución Básica y se sigue triturando durante 5 minutos hasta obtener una pasta suave; se agrega más Solución Básica y se continúa moliendo durante otros 3 a 5 minutos. Después, se decanta el sobrenadante y se van agregando pequeñas cantidades de Solución Básica al sedimento, con la repetición del procedimiento anterior, hasta que todo el Clorazol se haya disuelto. La solución del colorante debe dejarse varias semanas en maduración (encontramos que son suficientes 10 semanas). Al cabo de algunos días comienza a producirse la separación de un líquido transparente, de color morado profundo y una capa negra sedimentada. Para la coloración se debe utilizar el líquido de la capa superior. Si la solución preparada no se separa y se transparenta en un par de semanas, no es apta para la coloración y hay que prepararla nuevamente.

Solución de tinción:

Preparamos esta solución diluyendo un volumen de solución Madre, en dos volúmenes de Solución Básica.

TECNICA (Según Gleason y Healy, 1965):

- 1.- Hacer extensiones delgadas de materia fecal, en cubreobjetos de 22x22 mm y del número 1. Empleamos cubreobjetos en lugar de portaobjetos como lo indica la técnica, porque tiene ventajas tales como el empleo de cantidades pequeñas de colorante y mejor visualización de las formas parasitarias en el extendido por quedar mas cercano el objetivo.
- 2.- Inmediatamente se colocan en vasos Columbia que contienen la Solución de tinción, y se dejan durante 20 a 24 horas a la temperatura ambiente del laboratorio. Pasado este tiempo se procede a deshidratarlos.
- 3.- Lavarlos en alcohol al 70% durante 3 minutos. Introdujimos este paso, porque pasando los cubreobjetos directamente de la solución de tinción al alcohol de 96% como lo indica la técnica, observamos que la gran mayoría de los quistes y trofozoitos sufrían deformaciones que impedían su identificación.
- 4.- Pasar los cubreobjetos a alcohol de 96% y dejarlos durante 10 a 15 segundos.
- 5.- Pasar los cubreobjetos a una mezcla de alcohol de 96%-Xilol (partes iguales), y dejarlos durante 3 a 5 minutos.

- 6.- Dejar en Xilol de 3 a 5 minutos.
- 7.- Montar en resina sintética.

En las técnicas descritas anteriormente (Hematoxilina férrica y Tricrómico de Gomori) no hicimos modificación alguna, pero, para experimentar con el Negro de Clorazol, trazamos el siguiente esquema:

- A) Tiempo de maduración del colorante.
 - B) Efecto del almacenamiento sobre muestras:
 - a) tiempo
 - b) temperatura
 - C) Efecto de la Solución Madre sin diluir.
 - D) Efecto del tiempo de coloración y la temperatura sobre las extensiones.
 - E) Posible aceleración del tiempo de tinción mediante una fijación previa de las extensiones.
- A) Debido a que no utilizamos la fórmula original del colorante, tratamos de determinar el tiempo adecuado de maduración para que la diferenciación morfológica de los protozoarios fuese evidente. Para esto, hicimos dos extensiones de cada una de las muestras y las sumergimos en la Solución de tinción, comenzando con colorante de 3 semanas de maduración, y continuamos tiñendo extensiones de otras muestras de manera semejante cada semana, hasta que el colorante alcanzó 54 semanas de maduración.

- B) Con el objeto de observar si el tiempo de almacenamiento de las muestras y la temperatura a la que permanecieron, son factores que pudieran influir en la coloración de los protozoarios, procedimos de la siguiente manera:
- 1.- De cada una de las muestras separamos dos porciones, una que fue mantenida a la temperatura ambiente del laboratorio y otra que permaneció en refrigeración, ambas durante 3 ó 4 días.
 - 2.- Al cabo del tiempo de almacenamiento, de cada una de las muestras teñimos dos extendidos de acuerdo con la técnica descrita anteriormente.
- C) Por otro lado, ensayamos la técnica, pero utilizando para la coloración Solución Madre sin diluir, con la finalidad de determinar si ésta puede o no ser utilizada como Solución de Tinción.
- D) Para observar si el tiempo de tinción y la temperatura pudieran influir el proceso de coloración, procedimos como sigue:
- 1.- Hacer extendidos de cada una de las muestras, por duplicado y sumergirlos en la Solución de Tinción contenida en los vasos Columbia, los cuales tapados, permanecerán durante 1, 2 y 3 horas a 37° .

- 2.- A los 30 minutos de tinción, sacar unos extendidos para deshidratarlos como indicamos anteriormente. Continuar de esta manera hasta contemplar 3 horas de tinción.
- 3.- Paralelamente y siguiendo el mismo procedimiento, hacer otros extendidos de las mismas muestras y dejarlos en la Solución de tinción durante 1, 2 y 4 horas, pero en esta ocasión, a la temperatura ambiente del laboratorio.

También teñimos muestras de materia fecal siguiendo este procedimiento, pero empleamos como solución de tinción la Solución Madre sin diluir.

E) También tratamos de ver si el proceso de tinción puede ser acelerado fijando extensiones en solución Schaudinn, previamente a la coloración, de la siguiente manera:

- 1.- Colocar los extendidos en solución de Sachaudinn calentada a 60° durante 2 minutos.
- 2.- Lavarlos en los siguientes alcoholes para eliminar el Cloruro de Mercurio: Alcohol de 70%; Alcohol yodado; Alcohol de 70% y Alcohol de 50%, dejándolos en cada uno de ellos durante 2 minutos.
- 3.- Pasar los cubreobjetos a la Solución de tinción, en la que probamos tres tiempos: 1, 2 y 3 horas, dejando los vasos

Columbia tapados, unos, a la temperatura ambiente del laboratorio y otros a 37°. Pasados los primeros 30 minutos de tinción, sacar algunos cubreobjetos para deshidratarlos y continuar de esta manera hasta alcanzar 3 horas de tinción.

IV. RESULTADOS

Mediante el método de Kohn diferenciamos claramente: quistes de Entamoeba coli, que se teñían en tonos rosados, morados, verde oscuro y grises, predominando los dos primeros; quistes de Entamoeba histolytica, que generalmente se tiñeron de gris o azul-verde; quistes de Giardia lamblia, Chilomastix mesnili, Endolimax nana y Iodamoeba bütschlii, que por lo general se tiñeron en tonos azul oscuro o azul-grisáceo. También fue posible diferenciar trofozoítos de Entamoeba coli, Entamoeba histolytica, Giardia lamblia y Iodamoeba bütschlii, lo cuales se tiñeron generalmente en tonos azul-verde o azul-grisáceo, predominando el primero; sin embargo, cuando intentamos teñir muestras de materia fecal conteniendo trofozoítos de Trichomonas hominis, no lo logramos.

Observamos que cuando la solución de tinción (del Negro de Clorazol) ha sido empleada 4 ó 5 veces, se tiñen fácilmente huevos de Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura y de Hymenolepis nana, los dos primeros en tonos rojos y el último en morado, y también ooquistes de Isospora hominis, los cuales mostraron en color rosado los esporozoítos.

Encontramos que pueden ocurrir variaciones muy marcadas en la coloración de los protozoarios cuando para preparar la Solución de tinción se emplea Solución Básica no reciente, o si el extendido es muy grueso. En el primer caso observamos que los quistes en su mayoría se teñían de

rojo, y en el segundo, que las áreas más densas del extendido y por consiguiente los quistes, se colorean en tonos rojos o morados, y las áreas delgadas en negro o azul-grisáceo.

Como se aprecia en las fotografías, los resultados obtenidos mediante la tinción con Negro de Clorazol pueden ser comparables con los obtenidos por las técnicas clásicas de coloración para teñir protozoarios intestinales.

Empleando el colorante Negro de Clorazol E, encontramos que para obtener una diferenciación morfológica clara de los protozoarios, el tiempo de maduración era de 10 semanas y que su estabilidad para teñirlos se mantuvo durante 37 semanas, a partir de cuyo tiempo su reactividad disminuyó notablemente. Observamos que empleando colorante de 38 ó 40 semanas de maduración, los protozoarios se teñían escasamente; pero, cuando el colorante alcanzó un año de maduración, no se teñían aún dejando los extendidos en el colorante durante 48 ó 72 horas a la temperatura ambiente del laboratorio.

En las muestras que permanecieron a la temperatura ambiente del laboratorio durante 3 ó 4 días, observamos que aunque sí se teñían los protozoarios, era imposible diferenciarlos por las deformaciones que sufrían. Sin embargo, en las muestras conservadas en refrigeración durante el mismo tiempo la coloración de los quistes era semejante a la que adquirían los teñidos de muestras recientes, predominando la coloración morada.

Empleando solución Madre sin diluir, como solución de tinción fué difícil hacer la diferenciación morfológica de los protozoarios porque estaban sobreteñidos, y ocurría lo mismo cuando dejábamos los extendidos en el colorante durante 18 horas a la temperatura ambiente del laboratorio.

En los extendidos que permanecieron durante 1, 2 ó 3 horas a 37°, encontramos que los que permanecieron durante 1 hora no se tiñeron; obtuvimos resultados semejantes en los que sacamos a las 2 horas; pero la diferenciación morfológica de los protozoarios la apreciamos muy bien en los extendidos que sacamos a las tres horas de tinción. Sin embargo, en las extensiones que permanecieron en el colorante durante 1, 2 ó 3 horas a la temperatura ambiente del laboratorio, los resultados no fueron satisfactorios, ocurriendo lo mismo cuando en lugar de la solución de tinción, empleamos la Solución Madre sin diluir.

En los extendidos fijados en la solución de Schaudinn, previamente a la coloración y que permanecieron a 37° durante 2.5 horas en el colorante, los detalles morfológicos de los protozoarios fueron observados sin dificultad, cosa que no ocurrió con los extendidos que permanecieron el mismo tiempo en el colorante a la temperatura ambiente del laboratorio.

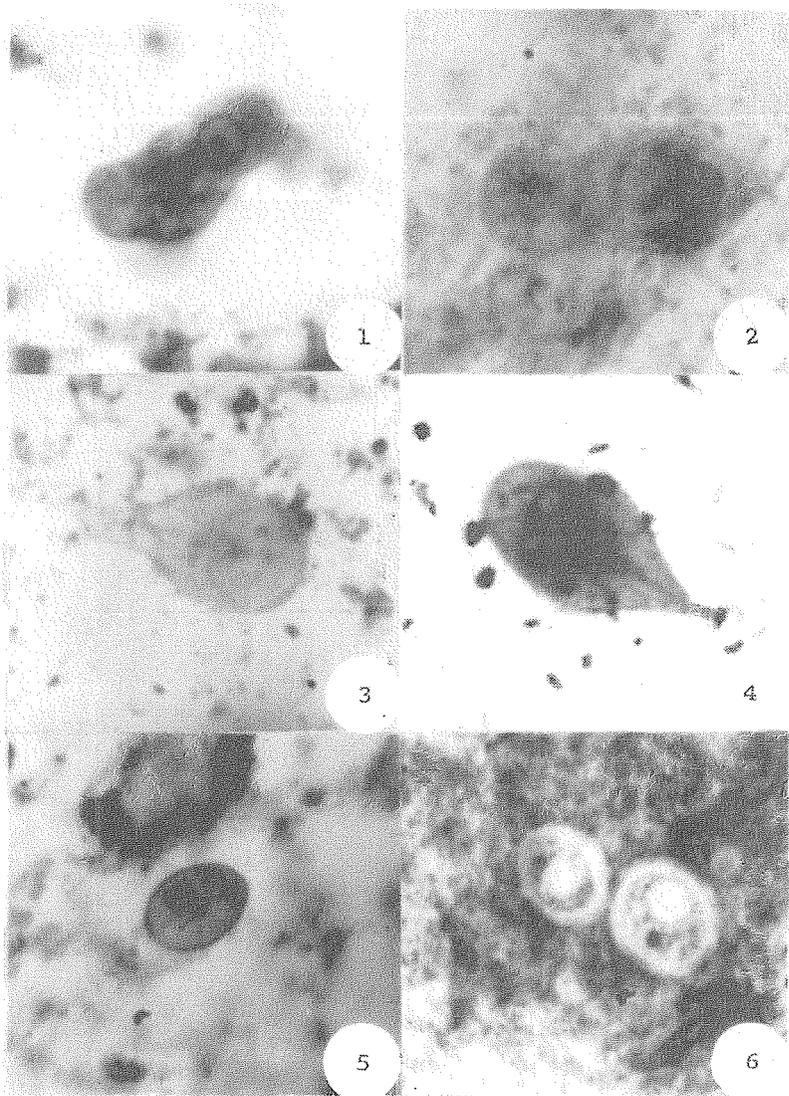


Fig. (1) Entamoeba histolytica, trofozoito teñido con Negro de Clorazol. (2) Entamoeba histolytica, teñido con Hematoxilina férrica. (3) y (4) Giardia lamblia, trofozoito. (5) Giardia lamblia, quisto. (6) I. butschlii, quistes. (3) a (6) teñidos con Negro de Clorazol.

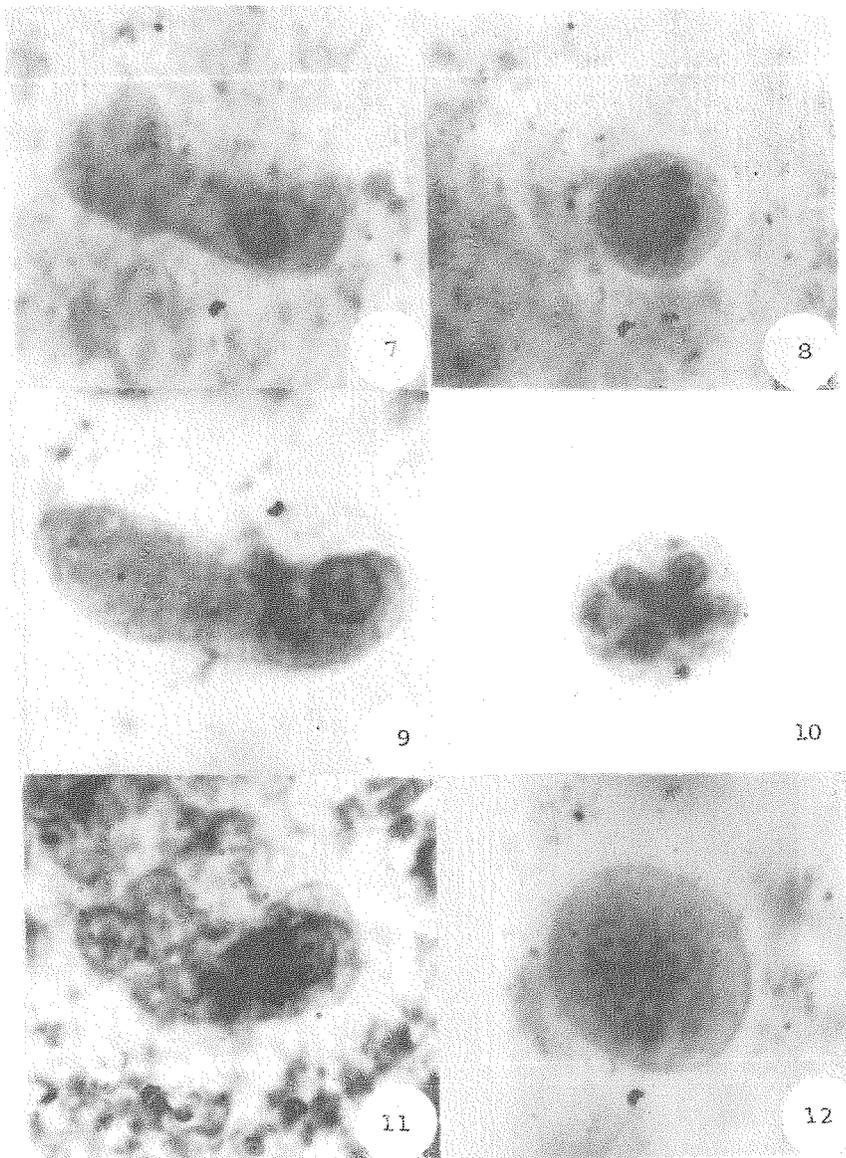


Fig. (7), (9) y (11) Entamoeba histolytica, trofozoito. (8), (10) y (12) E. histolytica, quiste. (7) a (12) teñidos con Negro de Clorazol.

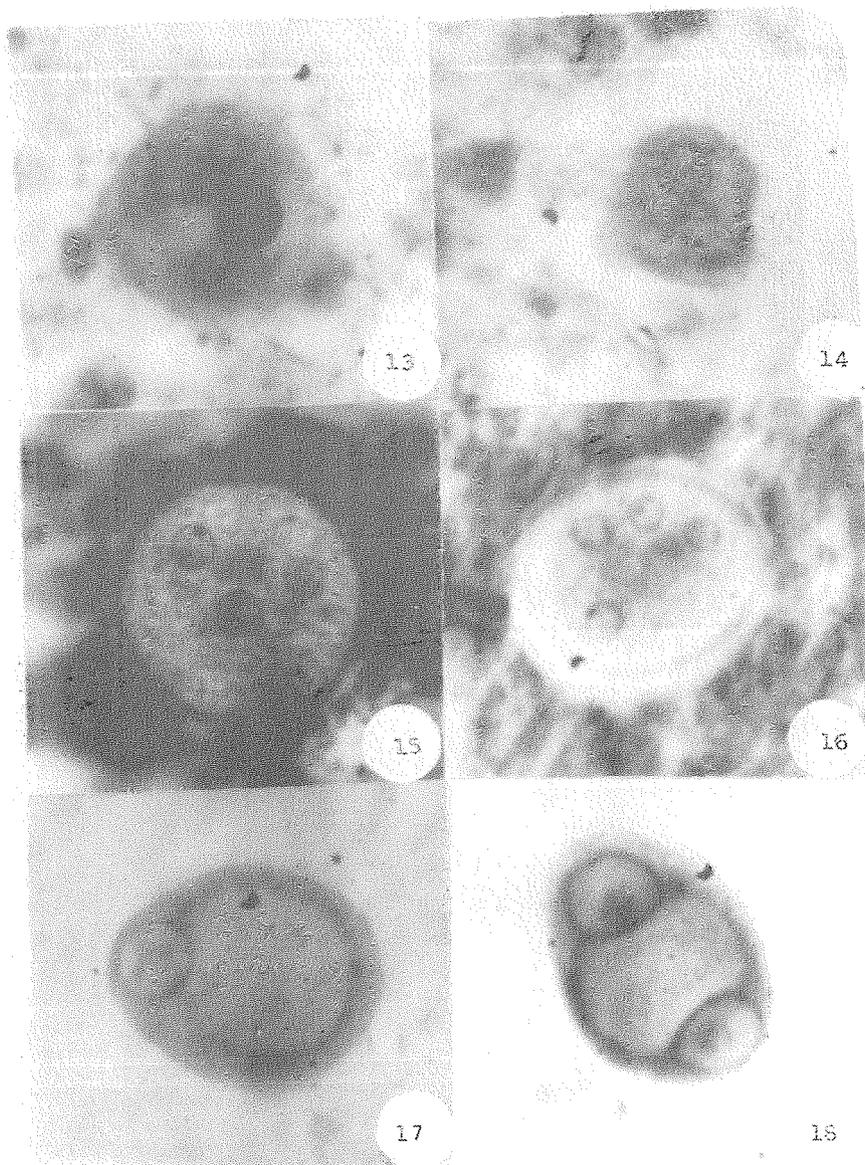


Fig. (13) y (16) Entamoeba coli, trofozoito.
(14), (15), (17) y (18) E. coli, quiste.
(13) a (18) teñidos con Negro de Clorazol.

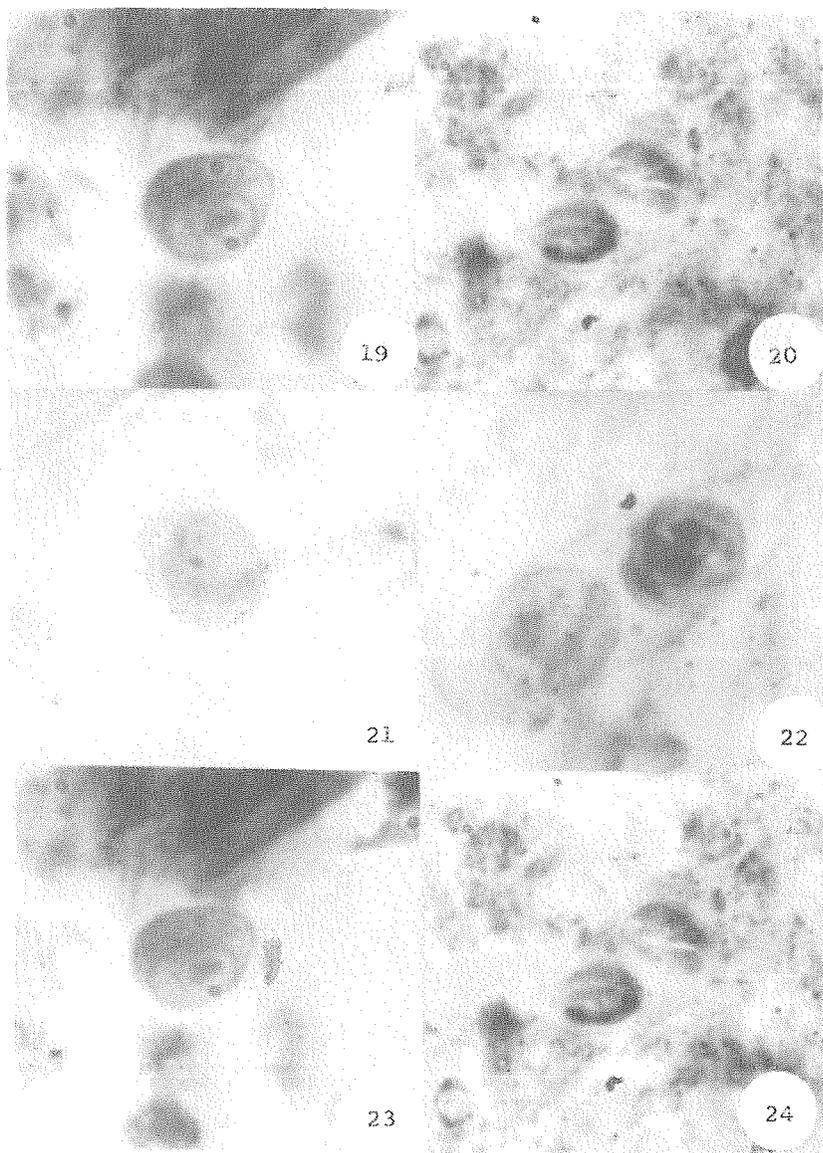


Fig. (19), (21) y (23) Chilomastix mesnili,
quistes. (20), (22) y (24) Isospora hominis,
ooquistes. Tinción: Negro de Clorazol.

V. COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

La principal ventaja que ofrece el método de Kohn, es que a diferencia de los métodos clásicos de tinción empleados, Hematoxilina férrica y Tricrómico de Gomori, no requiere mordente ni diferenciación. Otras ventajas son que se colorean selectivamente tanto las estructuras nucleares como las citoplásmicas; usa soluciones fáciles de preparar, emplea reactivos fáciles de eliminar y emplea pocas soluciones. Por otro lado, las extensiones teñidas hace 3 años, no han sufrido deterioro en relación a la morfología de los quistes o a su coloración.

No obstante, presentar estas ventajas, el Negro de Clorazol E, no tiñe con regularidad quistes de Entamoeba coli, el tiempo de coloración es muy largo y en ocasiones el contraste obtenido es escaso.

Cabe hacer notar que los ooquistes de Isoospora hominis difíciles de teñir con otros colorantes, con el Negro de Clorazol mostraron claramente en tono rosado los esporozoítos.

Debido a las dificultades que se presentan para diferenciar a los protozoarios empleando Solución Madre sin diluir, consideramos que no es recomendable para ser empleada como Solución de tinción.

En relación a las variables de tiempo de almacenamiento y temperatura, la coloración no se ve afectada al cabo de 3 ó 4 días de almace-



miento pero sí es difícil la diferenciación de los quistes aunque teñidos, en tanto las muestras permanezcan a temperatura ambiente, no así a la temperatura de refrigeración.

Con respecto al efecto del tiempo de tinción y la temperatura, sobre la coloración de los protozoarios, podemos decir que acelera el proceso de coloración cuando los extendidos permanecieron en el colorante durante 3 horas a 37°. Pero los resultados mejoraron cuando los extendidos fueron fijados previamente a la coloración y permanecieron en el colorante 2.5 horas a 37°. De estos dos últimos puntos podemos considerar que la temperatura a la que se sometan los extendidos, en el método de Kohn, juega un papel importante en el aceleramiento del proceso de tinción; de manera que los resultados son mejores y en menor tiempo que el que indica el método original de Kohn.

Dada la peculiaridad del colorante Negro de Clorazol de hacer manifiestos detalles morfológicos de los protozoarios, puede recomendarse para establecer diagnóstico morfológico de los protozoarios intestinales y de cavidades.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Baker, J. R., (1941): Chlorazol Black E as a vital dye. Nature, Lond., 147: 744.
2. Barreto, M.P. y Zago, F.J., (1959): Estudos sôbre a coloração de protozoários intestinais. I. Métodos rápidos que empregam mordentes e corantes em una única solução. Rev. Brasil Biol. 19: 421-428.
3. Barreto, M.P. y Zago., F.J., (1960): Estudos sôbre a coloração de protozoários intestinais. II. Métodos rápidos que empregam mordentes e corantes em solucoes separadas. Rev. Brasil Biol. 20(2): 131-138.
4. Cannon, H.G., (1937): A new biological stain for general purposes. Nature, Lond., 139: 549.
5. Cannon, H.G., (1950): The technique of biological staining. Endeavour, 9: 188-195.
6. Craig, C.F., (1948): Laboratory diagnosis of protozoan diseases. Lea and Febiger, Philadelphia (cit. por Barreto y Zago, 1960).
7. Conn, J.E., (1943): Chlorazol Black E as a stain for root-tip chromosomes. Stain. Techn., 18(4): 189-192.
8. Darrow, M.A., (1940): A simple staining method for histology and cytology. Stain. Techn., 15: 67-68.
9. Dobell, C., (1938): Researches on intestinal protozoa of monkeys and man: life history of Entamoeba coli, with special reference to metacystic development. Parasitology, 30(2): 195-238.
10. Dobell, C.C., (1942): Some new methods for studying intestinal amoebae and other protozoa. Parasitology, 34: 101-112. (cit. por Barreto y Zago, 1960).
11. Faust, (1937) en: Faust, E.C. y Russell, P.F., (1957). Craig and Faust's Clinical Parasitology. 6a. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
12. Gleason, N. y Healy, G.R., (1965): Modification and evaluation of Kohn's one-step staining technic for intestinal protozoa in feces or tissue. Amer. J. Clin. Path., 43(5): 494-496.

13. Goldman, M., (1949): A single solution iron-hematoxylin stain for intestinal protozoa. Stain. Techn., 24: 57-60 (cit. por Barreto y Zago, 1959).
14. Gomori, G., (1950): A rapid one-step trichrome stain. Amer. J. Clin. Path., 20: 661-664.
15. Gordon, H.K. y Chabers, R., (1941). J. Cell. Comp. Physiol., 17: 97 (cit. por Baker, 1941).
16. Gurr, E., (1960): Encyclopaedia of Microscopic stains. London, Leonard Hill (Books) Limited. Pág.: 116-117.
17. Klatzo, I. y McMillan, G.C., (1952): A new technic for the rapid diagnosis of brain tumors using Chlorazol Black E. Lab. Invest., 1: 24-29.
18. Kohn, J., (1960): Un método de coloración permanente para protozoos fecales, en un solo paso. (Trad. del hebreo), Dapim. Refuim. Med. Q. Israel., 19 (2/3): 160-161.
19. Lang, A.G., (1936): A stable high contrast mordant for hematoxylin staining. Stain. Techn., 11: 149-151 (cit. por Barreto y Zago, 1960).
20. Lawless, D.K., (1953): A rapid permant mount. Stain technique for the diagnosis of the intestinal protozoa. Amer. J. Trop. Hyg. 2: 1137-1138. (cit. por Barreto y Zago, 1959).
21. Levine, N.D. y Morrill, C.C. (1941): Chlorazol Black E, a simple connective tissue stain. Stain. Techn., 16(3): 121-122.
22. Markey, R.L., Culbertson, C.J. y Giordano, A.S., (1943): A rapid method for staining of intestinal parasites. Amer. J. Clin. Path. Techn. Sec., 7: 2-3 (cit. por Barreto y Zago, 1960).
23. Mayer, P., (1901): Z. Wiss. Mikr., 20: 410 (cit. por Barreto y Zago, 1959).
24. Nebel, B.R., (1940): Chlorazol Black E as an aceto-carminé auxiliary stain. Stain. Techn. 15: 69.
25. Noble, G.A., (1944): A five minute method for staining fecal smears. Science, 100: 37-38 (cit. por Barreto y Zago, 1959).

26. Ratcliffe, H.L. y Parkins, P.V., (1944): On the use of Mallory's phosphotungstic acid hematoxylin for staining intestinal protozoa. J. Lab. Clin. Med., 29: 534-535 (cit. por Barreto y Zago, 1959).
27. Tompkins, V.M. y Miller, J.K., (1947): Staining intestinal protozoa with iron-hematoxylin-phosphotungstic acid. Amer. J. Clin. Pathol., 17: 755-758.
28. Tuan, H.C., (1930): Picric acid as a destaining agent for iron alum hematoxylin. Stain Techn., 5: 135-138.
29. Walker, E.L., (1908): The parasitic amoebae of the intestinal tract of man others animals. J. Med. Res., 17: 379-459 (cit. por Barreto y Zago, 1959).
30. Weigert, C., (1904): Eine kleine verbesserung der Hematoxylin van Gieson Methode. Z. Wiss. Mikr., 21: 1-5 (cit. por Barreto y Zago, 1959).
31. Wheatley, W.B., (1951): A rapid staining procedure for intestinal amoebae and flagellates. Amer. J. Clin. Path., 21: 990-991.