



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO PROFESIONAL  
TRABAJO DE INVESTIGACION**

**UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE PROTOZOARIOS MEDIANTE EL USO  
DE COLORACIONES PERMANENTES EN COMPARACIÓN CON EL  
MÉTODO DIRECTO LUGOL**

**Autor(s):** Br. Díaz Laura

Br. Millán Italia

**Tutor:** Prof. Deyanira Guevara

**Co-Tutor:** Lcda Oriana Mundaray

**Asesor Metodológico:** Dra. Emilia E. Barrios

**Valencia, Marzo de 2015**

## CERTIFICACION DEL TUTOR

Yo, Prof. **Deyanira Guevara** y Yo, Lcda. **Oriana Mundaray**, portadoras de la cédula de identidad No. **V-12.101.906**, **V.19.756.404** respectivamente, por medio de la presente certificamos que hemos tenido conocimiento del trabajo de investigación que lleva por título: **UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE PROTOZOARIOS MEDIANTE EL USO DE COLORACIONES PERMANENTES, EN COMPARACIÓN CON EL MÉTODO DIRECTO LUGOL**. Desde su inicio hasta su culminación. El mismo fue realizado por los bachilleres: **Laura Díaz**, **Italia Millán** portadores de la cédula de identidad No. **V-19.001.130** y **V-19.891.581**, respectivamente. Considero que el presente estudio reúne los requisitos suficientes para ser sometido a evaluación.

**Deyanira Guevara**

**C.I: V-12101906**

**Oriana Mundaray**

**C.I: V-19756404**



## ACTA DE EVALUACIÓN

Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por la Coordinación de la Asignatura Trabajo de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud–Sede Carabobo, para evaluar el trabajo titulado: **“UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS COLORACIONES PERMANENTES EN COMPARACIÓN CON EL MÉTODO DIRECTO LUGOL, PARA PROTOZOARIOS”** realizado por las estudiantes: **Italia Millán** y **Laura Díaz**, titulares de la Cédula de Identidad No. V-19.891.581y V-19.001.130, respectivamente; y tutorado por la **Prof. Deyanira Guevara** y la **Licda. Oriana Mundaray**, titulares de la Cédula de Identidad No. V-12.101.906 y V-19.756.404, respectivamente. Hacemos de su conocimiento que hemos actuado como jurado evaluador del informe escrito, presentación y defensa del citado Trabajo. Consideramos que reúne los requisitos de mérito para su **APROBACIÓN**.

En fe de lo cual se levanta esta Acta, en Valencia a los veintisiete días del mes de ~~Marzo~~ del año dos mil quince.



Prof. Emilia Barrios  
C.I: 9.636.868

Jurado Principal

Prof. Arli Guerrero  
C.I: 16.896.959

Jurado Principal

Prof. Diana Graterol  
C.I: 14.999.305

Jurado Principal

## DEDICATORIA

*El trabajo de investigación que a continuación se desarrolla está dedicado primeramente a Dios que siempre nos colma de sabiduría y paciencia, nos guía e ilumina en cada paso del camino que nos hemos planteado recorrer hacia nuestras metas y bendice nuestros logros.*

*A nuestros padres por darnos las herramientas, la educación, el apoyo y el aliento para mantenernos motivados en seguir adelante durante todo momento.*

*A nuestras tutoras la profesora Deyanira Guevara y la Lcda. Oriana Mundaray por aceptarnos como tesisistas y asignarnos la presente investigación en la cual estuvieron presente durante su desarrollo para orientarnos y contribuir con nuestra formación como profesionales, ya que sin ellas nada de esto hubiera sido posible y finalmente al Instituto de Biología Molecular de Parásitos (BioMoIP) por permitirnos llevar a cabo nuestro estudio, incluyendo a todo el personal que labora en este centro quienes colaboraron en lo posible.*

## **AGRADECIMIENTO**

*Nos sentimos complacidas de otorgarles este agradecimiento a todas aquellas personas que directa o indirectamente, participaron en este trabajo de investigación leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndonos paciencia, dándonos ánimo, acompañándonos en los momentos de crisis y de felicidad.*

*Hacemos un especial agradecimiento a todas las profesoras y excelentes Investigadoras del Centro de Biología Molecular de Parásitos (BioMolP) en especial a la Licda. Viana Pinto por su gran ayuda y dedicación hacia nuestro trabajo.*

*A nuestra Asesora metodológica la profesora Emilia Barrios por tenernos paciencia siempre y por saber entender todas las dificultades por las que pasamos.*

*A muchos de nuestros amigos y familiares que indirectamente nos ayudaron apoyándonos en todo momento.*

# INDICE

<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>vii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>5</b>
<b>Objetivos Específicos</b>	<b>5</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>6</b>
<b>Hematoxilina-Eosina</b>	<b>6</b>
<b>Tinción de Hematoxilina Férrica</b>	<b>7</b>
<b>MayGrünwald-Giemsa</b>	<b>7</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>9</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>24</b>

## INDICE DE TABLAS

Número de la tabla	Descripción	Página
1	Criterios para la observación de características morfológicas de formas evolutivas de protozoarios aplicados en la comparación de la utilidad diagnóstica en coloraciones permanentes con respecto al método de Lugol.	8
2	Comparación de las coloraciones permanentes con respecto al método Lugol, en base a los criterios pre-establecidos y al total de protozoarios encontrados en las muestras, expresados en frecuencias absolutas y relativas .	11
3	Comparación de las coloraciones permanentes con respecto al método Lugol, en base a los criterios pre-establecidos aplicados para quistes de <i>Giardia lamblia</i> , expresados en frecuencias absolutas y relativas.	15
4	Comparación de las coloraciones permanentes con respecto al método Lugol, en base a los criterios pre-establecidos aplicados para quistes de <i>Entamoeba coli</i> .	16

5	Comparación de las coloraciones permanentes con respecto al método Lugol, en base a los criterios pre-establecidos aplicados para quistes de <i>Iodamoeba bütschlii</i> , expresados en frecuencias absolutas y relativas.	17
6	Comparación de las coloraciones permanentes con respecto al método Lugol, en base a los criterios pre-establecidos aplicados para quistes de Complejo <i>Entamoeba histolytica/ E. dispar</i> , expresados en frecuencias absolutas y relativas.	18
7	Comparación de las coloraciones permanentes con respecto al método Lugol, en base a los criterios pre-establecidos aplicados para quistes de <i>Endolimax nana</i> , expresados en frecuencias absolutas y relativas.	19
8	Comparación de las coloraciones permanentes con respecto al método Lugol, en base a los criterios pre-establecidos aplicados para formas evolutivas de <i>Blastocystis sp</i> , expresados en frecuencias absolutas y relativas.	20

## INDICE DE FIGURAS

Número de la tabla	Descripción	Página
1	Comparación de coloraciones permanentes con el método de Lugol para las formas parasitarias <i>Entamoeba coli</i> , complejo <i>Entamoeba histolytica/E. dispar</i> e <i>Iodamoeba bütschlii</i> en base al criterio 5 previamente establecido.	12
2	Comparación de coloraciones permanentes con el método de Lugol para las formas parasitarias <i>Giardia lamblia</i> , <i>Blastocystis</i> sp. Y <i>Endolimax nana</i> en base al criterio 5 previamente establecido.	13

## **Utilidad Diagnóstica De Protozoarios Mediante El Uso De Coloraciones Permanentes, En Comparación Con El Método Directo Lugol.**

**Autores:** Díaz Laura, Millán Italia.

**Tutora:** Prof. Deyanira Guevara

**Co-Tutor:** Lcda. Oriana Mundaray

**Asesora:** Dra. Emilia Barrios

**Realizado en:** Laboratorio de Helmintología del Instituto BioMolP

La parasitosis intestinal es una enfermedad transmisible, frecuente, con alta tasa de morbilidad, prevalencia y baja tasa de mortalidad. El diagnóstico coproparasitológico se fundamenta en el análisis de la materia fecal para identificar formas parasitarias mediante el uso de diferentes métodos y técnicas. La coloración con Lugol es el método estándar, pero existen casos donde se necesita aplicar otra técnica para lograr un diagnóstico certero y/o una diferenciación de parásitos con características morfológicas muy similares que lleven a un diagnóstico errado. La aplicación de coloraciones permanentes ayuda a la identificación de parásitos intestinales al teñir sus estructuras internas, variando el color y su tono, facilitando la apreciación de sus características, lo que permite diferenciar unos protozoarios de otros. Se planteó como objetivo general evaluar la utilidad diagnóstica de las coloraciones permanentes H-E, HF y MG-G, en comparación con el método directo Lugol. Empleándose 10 muestras de heces de pacientes procedentes de distintas localidades del estado Carabobo, referidas al laboratorio de helmintología del Instituto BiomolP, se estandarizaron las coloraciones permanentes y se compararon con el método directo Lugol. Estas coloraciones destacan ciertas características estructurales o morfológicas de parásitos por lo que pueden complementar al Lugol. Concluyendo, la coloración permanente que presenta mayor utilidad para la identificación de formas evolutivas de protozoarios es la HF. MG-G podría considerarse un método diagnóstico de apoyo al método directo con Lugol. H-E permite la coloración y observación de formas evolutivas de protozoarios bajo los criterios establecidos pudiendo ser una herramienta útil para confirmar el diagnóstico.

**Palabras Clave:** Protozoarios, Coloraciones Permanentes, Lugol.

## INTRODUCCION

La parasitosis intestinal es una de las enfermedades transmisibles más frecuentes, cursando con síntomas no específicos en algunos casos, que podrían llegar a causar complicaciones. Se presentan con alta tasa de morbilidad, prevalencia y con baja tasa de mortalidad (1, 2).

El principal mecanismo de transmisión de éstos parásitos intestinales es por vía oral, a través de la ingesta de agua y alimentos contaminados con formas parasitarias infectantes o también por contacto directo con los mismos entre personas (1, 2).

En éstas parasitosis intestinales, se presentan con mayor incidencia helmintos como *Ascaris lumbricoides*, *Hymenolepis sp*, *Trichuris trichiura* y *Enterobius vermicularis*, y entre los protozoarios más comunes se encuentran *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Blastocystis sp* y *Cryptosporidium sp*.

El diagnóstico coproparasitológico se fundamenta en el análisis de la materia fecal cuya función es identificar formas parasitarias mediante el uso de diferentes métodos y técnicas. Es una herramienta importante que ayuda al médico a mejorar la salud y calidad de vida de los individuos, principalmente de los niños que son los más gravemente afectados (3, 4).

Los principales métodos coproparasitológicos son el montaje al fresco con Solución Salina y Lugol, Kato, Baerman y coloraciones especiales como el Kinyoun. El método más empleado en el laboratorio de rutina es el directo con solución salina y Lugol, por ser sencillo, rápido, económico, y permite observar casi todas las formas evolutivas de los parásitos intestinales.

El diagnostico con solución salina podría presentar dificultad en la identificación de quistes y trofozoítos de protozoarios, ya que a pesar de que

la muestra se haya tomado y procesado mediante las condiciones adecuadas y el analista tenga la experiencia suficiente y la agudeza visual necesaria, no se aprecian notablemente las estructuras internas de los parásitos, por lo tanto, debe complementarse con el Lugol al 10% cuya preparación se realiza con ioduro potásico, iodo y agua de tal manera que produce la yodación de proteínas e hidratos de carbono permitiendo la mejor visualización y diferenciación de parásitos, específicamente evidenciando las características principales de los quistes, es decir un núcleo color marrón rojizo, citoplasma amarillento y cromatina de color marrón a negro (5).

La aplicación de coloraciones permanentes ayuda a la identificación de parásitos intestinales al teñir sus estructuras internas, variando el color y su tono según su afinidad azurófila o acidófila, facilitando la apreciación de sus características particulares, lo que permite diferenciar unos protozoarios de otros (4).

Existen estudios en los que se utilizaron las coloraciones permanentes como método diagnóstico de protozoarios y en los que se sustenta esta investigación:

Gómez-Rivera y col en el 2005 (6). Compararon la efectividad en la detección de *E. histolytica*/ *E. dispar* entre la técnica de tinción con hematoxilina-eosina (H-E) vs la técnica de amiba en fresco (AF). De 137 muestras obtenidas en 35 de estas se encontraron trofozoítos de amibas con el uso de la coloración H-E, mientras que con la técnica AF solo en 5 casos; las diferencias en la frecuencia con la que fue posible observar los trofozoítos, fue significativamente mayor con la tinción H-E en conclusión la técnica de tinción con H-E fue más efectiva en la observación de trofozoítos.

Chacín-Bonilla en el 2011 (7), Consideró la importancia del uso de coloraciones permanentes en especial hematoxilina férrica (HF) en el diagnóstico microscópico de la amibiasis. Si bien es cierto que, en ocasiones, no es difícil hacer el diagnóstico de *E. histolytica*/*E. dispar* en el examen del frotis al fresco, algunas veces se logra observar un gran número de quistes tetranucleados que pueden llegar a confundirse con otras especies de amibas, y sobre todo en pacientes con disentería la mayoría de los especímenes no corresponden a estas dos categorías y ameritan una cuidadosa diferenciación. En conclusión, se consideró la tinción de frotis fecales con HF como el método esencial y confiable para el diagnóstico microscópico de los protozoarios intestinales.

Sánchez y col. en el 2012 (8), Evaluaron en ratones inmunosuprimidos con dexametasona, los signos, síntomas y hallazgos de laboratorio a partir de aislados humanos infectados con *Blastocystis sp.* A las muestras fecales se les realizó estudio coproparasitológico mediante método directo (solución salina y Lugol), Kato, Baerman y Kinyoun. Los resultados obtenidos en la identificación de *Blastocystis sp* fue una menor proporción de formas granulares en relación con las vacuolares y con el propósito de corroborar estos resultados, procedieron a teñir algunos frotis con MayGrünwald-Giemsa (MG-G), donde pudieron observar perfectamente los gránulos basófilos y el citoplasma acidófilo del protozoario debido a la afinidad del mismo por dicha coloración, incluso también pudieron observar algunas formas en división.

Aun cuando la coloración con Lugol es el método estándar, existen casos en los que se necesita aplicar otra técnica para lograr un diagnóstico certero y/o una diferenciación de parásitos con características morfológicas

muy similares que pueden crear duda, inseguridad y hasta un diagnóstico errado (2, 6).

Entre las desventajas que presenta el método Lugol se encuentra, que no permite identificar todas las formas evolutivas en las que se puedan presentar los parásitos, tomando en cuenta que destruye los trofozoítos. También cabe destacar que no es un método permanente y que puede observarse la morfología de los parásitos teñidos en un solo tono de color, lo que puede obstaculizar un poco la identificación (4).

Las coloraciones permanentes, permiten un estudio morfológico cuidadoso de los elementos parasitarios teñidos; pueden verse microorganismos pequeños o infrecuentes que no se observan en las preparaciones en fresco. Estas técnicas se podrían implementar como un método de diagnóstico confirmatorio adjunto al método directo Lugol, conservarse por un periodo de tiempo indeterminado y ser usados de referencia, material de estudio, consulta o registro además de que en caso de duda en la identificación del parásito, se puede enviar el preparado a otros centros de diagnóstico (9).

Considerando lo expuesto anteriormente, nos planteamos como objetivo general evaluar la utilidad diagnóstica de las coloraciones permanentes H-E, HF y MG-G en comparación con el método directo Lugol.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar la utilidad diagnóstica de las coloraciones permanentes H-E, HF y MG-G, en comparación con el método directo Lugol.

### **Objetivos Específicos**

1. Estandarizar las coloraciones permanentes, H-E, HF y MG-G en muestras previamente diagnosticadas.
2. Identificar las formas evolutivas aplicando las coloraciones permanentes, H-E, HF y MG-G.
3. Comparar la utilidad diagnóstica de las coloraciones permanentes, H-E, HF y MG-G, en relación al método directo Lugol.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

En el estudio se emplearon 10 muestras de heces de pacientes procedentes de distintas localidades del estado Carabobo, referidas al Laboratorio de Helmintología del Instituto BioMolIP, las cuales luego de ser analizadas fueron fijadas en formalina al 10% en solución salina fosfatada (PBS, 0,15M pH= 7,2).

De cada una de estas muestras, se tomó una porción y se homogenizó con solución salina isotónica (SSI; NaCl al 0,85% p/v) en tubos cónicos graduados, luego se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 2 mL de SSI para concentrar los microorganismos y eliminar el exceso de formalina e interferencias de fondo de la coloración producto de la materia fecal.

Para el análisis al fresco se tomaron 50 µl de la muestra con 10 µl de lugol en una lámina portaobjetos, para la observación de las características morfológicas y el conteo de las formas parasitarias.

Se realizaron 6 frotis por muestra con 50 µl de la suspensión y se fijaron en diferentes concentraciones de alcohol como se explica a continuación

### **Hematoxilina-Eosina**

En la tinción con H-E, se fijaron los frotis en etanol 70%, por 3 min cada uno, dejándolos secar toda la noche a temperatura ambiente o por una hora a 56°C. Luego se colorearon con solución de hematoxilina de Mayer (SIGMA-ALDRICH) por 60 min, se lavaron con agua y se aclararon las láminas portaobjeto con alcohol ácido por 30s, se lavan con agua destilada

10 - 20s, se les agregó unas gotas de solución de eosina al 1% diluida en etanol por 4min, seguido de un lavado con agua destilada, seguido de esto se realizaron 2 cambios de xilol de 3-5min cada uno y en último lugar se procede a fijar con Martex (9).

### **Tinción de Hematoxilina Férrica**

Para la tinción de HF se fijaron los frotis en etanol al 70% durante 3 min, se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente o 1 h a 56°C en estufa. Se colocaron las láminas portaobjeto en una mezcla de etanol al 70% con suficiente solución yodada de D' Antoni hasta la formación de una coloración parecida al té fuerte por 5 min. Seguido de la aplicación se colocaron en etanol al 70% por 5 min (se deja secar toda la noche a temperatura ambiente o 1h a 56°C en estufa). Sumergir en agua durante 10min para lavar, luego colocar frotis en solución de HF de 4-5 min, se lavaron nuevamente durante 10min en agua, se pasaron por una cadena creciente de etanol 70%, 95% y 100% durante 5 min cada una (cada uno de ellos se dejó secar toda la noche a temperatura ambiente o 1h a 56°C en estufa), seguido de esto se realizaron 2 cambios de xilol de 3-5min cada uno y finalmente se procede a fijar con Martex (10).

### **MayGrünwald-Giemsa**

Para la coloración con MG-G, a los frotis fijados en etanol al 70%, se le añadieron unas gotas de May Grünwald al 0,25% metanol 50%, se dejó actuar durante 20 minutos, se lavaron con PBS pH 7,2 0.15M y se les agregó unas gotas de Giemsa diluida 1:5 en tampón fosfato, durante 40 minutos, se lavaron nuevamente con PBS y se dejaron secar a temperatura ambiente,

seguido de esto se realizaron 2 cambios de xilol de 3-5min cada uno y por ultimo se procede a fijar con Martex (11).

Todos los frotis fueron observados con un microscopio óptico binocular con objetivo de inmersión 100X Nikon Eclipse E600.

Se realizó el contaje en 10 campos por frotis, se tomaron en cuenta las estructuras parasitarias según 5 criterios pre-establecidos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Criterios para la observación de características morfológicas de formas evolutivas de protozoarios aplicados en la comparación de la utilidad diagnóstica en coloraciones permanentes con respecto al método de Lugol.

<b>CRITERIO</b>	<b>DESCRIPCION</b>
1	Coloración de la forma evolutiva sin definición
2	Forma evolutiva conserva forma y/o membrana y se colorea
3	Forma evolutiva conserva forma y membrana, se colorea y se observa una (1) estructura interna.
4	Forma evolutiva conserva forma y membrana, se colorea y se observan dos (2) estructuras internas.
5	Forma evolutiva conserva forma, membrana, se colorea con contraste optimo se observan tres (3) o más estructuras internas.

### **Análisis de los resultados**

Para el análisis de los resultados se empleó frecuencias absolutas y relativas (%) realizando así una descripción estadística descriptiva que permitió la elaboración de tablas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Ya se ha hecho mención, de que el método de Lugol presenta ciertas desventajas en cuanto a su utilidad diagnóstica de las formas parasitarias de protozoarios ya que el mismo destruye los trofozoitos, solo se observan las estructuras internas en un solo color y no se trata de una coloración permanente. En cambio, las coloraciones permanentes podrían establecerse como un método que permita confirmar el diagnóstico adjunto al método de Lugol (5, 6, 8).

Es por ello, que se realizó la estandarización para poder cumplir con el objetivo de evaluar la utilidad diagnóstica de las coloraciones permanentes H-E, HF y MG-G, en comparación con el método directo Lugol.

Se realizaron modificaciones tanto en la fijación de lo frotis, tiempos de coloración y sustitución de reactivos y diluentes. Es así, como una vez realizados los frotis se procedió a sumergir a cada uno de ellos en etanol 70% y dejarlos secar toda la noche a temperatura ambiente o una hora a 56°C en estufa, aplicando este procedimiento cada vez que se sometía el frotis a alguna concentración de etanol.

En la técnica de Spencer Monroe para HF, se modificó la Solución II sustituyendo Sulfato Férrico Amoniacal por piedra alumbre (Alumbre Potásico  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ).

En la coloración de MG-G y H-E se realizaron modificaciones en base a los tiempos de exposición sobre los colorantes, asimismo se sustituyó el diluyente por un tampón fosfato solo para la coloración MG-G específicamente en el colorante de Giemsa

Para todas las coloraciones se realizaron 2 cambios con xilol al final de cada una.

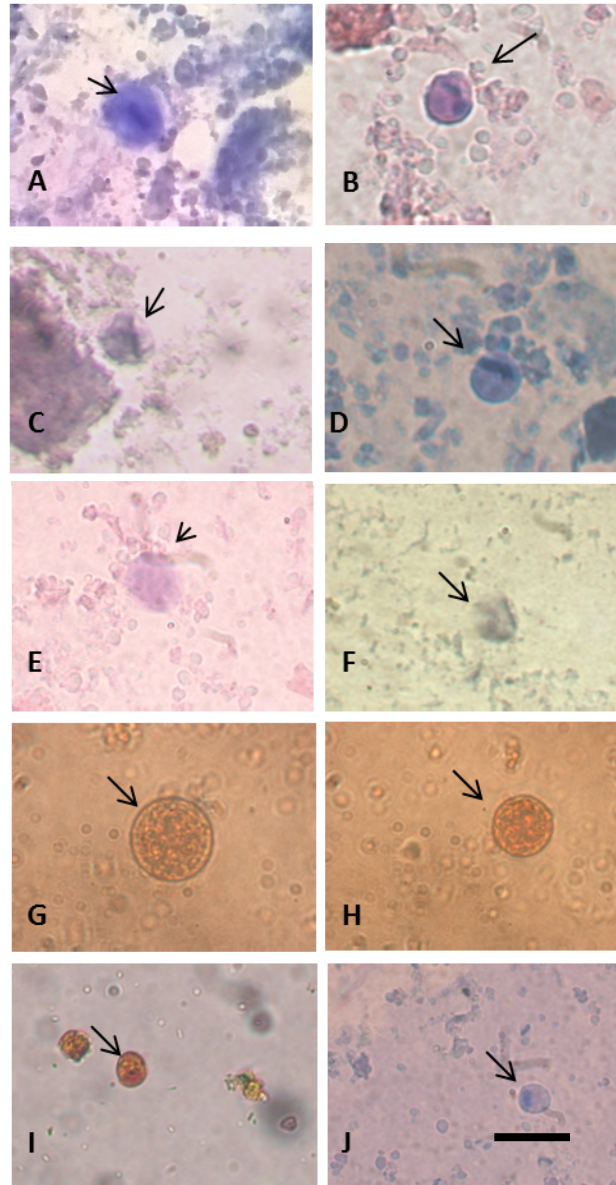
Una vez estandarizadas las técnicas y coloreadas las 10 muestras multiparasitadas se compararon, procediendo al conteo de cada uno de los protozoarios encontrados, aplicando los criterios ya establecidos. De acuerdo al análisis de estos criterios se obtuvieron los resultados reflejados en la tabla 2. En los cuales se observa que con los criterios 1 y 2, el método de lugol es quien permite identificar el mayor número de protozoarios presentes.

Midiendo el grado de efectividad, podemos observar que la H-E es menos efectiva para la identificación de los protozoarios presentes en las muestras, seguida por la coloración de MG-G. Por otro lado, la coloración HF mostró mayor efectividad a la hora de considerar los criterios establecidos. Por último, el método directo Lugol, permitió una observación completa y eficiente de los protozoarios de acuerdo con los criterios planteados, por lo que sigue siendo la técnica gold-standard para el diagnóstico de los mismos.

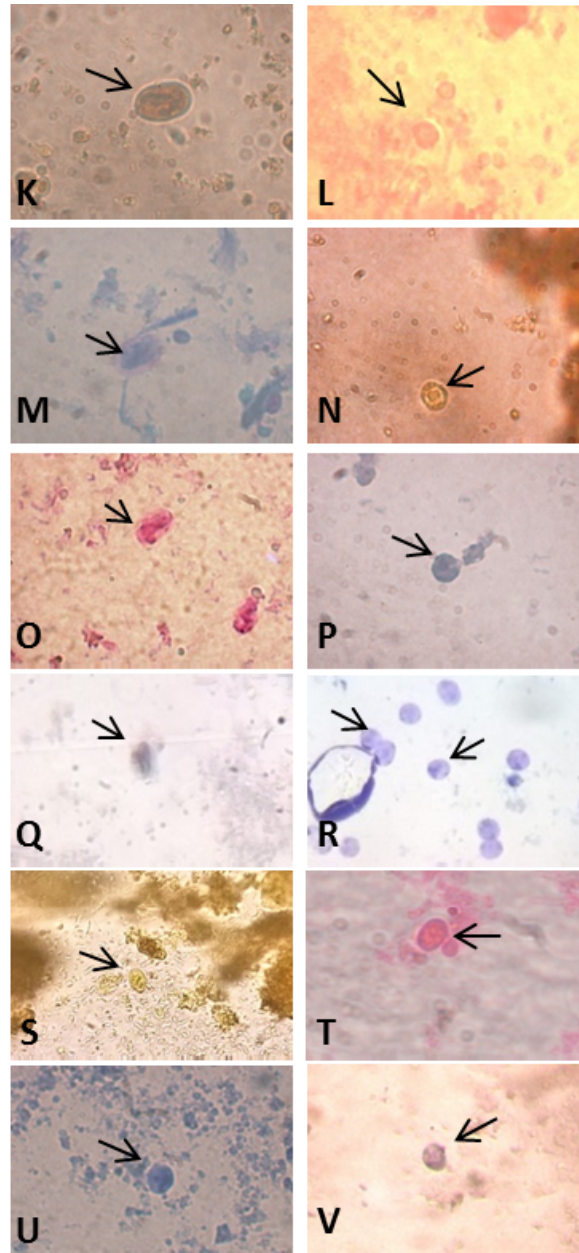
En las figuras 1 y 2 podemos apreciar quistes de los protozoarios, teñidos con las coloraciones estandarizadas y en un montaje con el método directo Lugol. En dichas imágenes se pueden apreciar características como conservación de la forma, membrana, coloración y al menos tres estructuras internas; parámetros que fueron establecidos en el criterio 5.

**Tabla 2.** Número de parásitos por campo expresados en frecuencias relativas y absolutos, visualizados con las coloraciones H-E, HF, MG-G y Lugol.

CRITERIOS	H-E		HF		MG-G		LUGOL		TOTALES DE PARASITOS POR CRITERIO
	FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR	
1	141	28,83%	43	8,79%	110	22,49%	195	39,87%	489
2	58	16,90%	80	23,32%	89	25,95%	116	33,82%	343
3	35	11,83%	108	36,48%	50	16,89%	103	34,79%	296
4	23	5,36%	72	28,13%	23	8,98%	138	53,90%	256
5	33	7,69%	52	12,12%	21	4,89%	323	75,29%	429
TOTAL DE PARÁSITOS POR COLORACIÓN	290	15,99%	355	19,58%	293	16,16%	875	48,26%	1813



**Figura 1.** Quiste de *Entamoeba coli* con coloración MG-G en la Imagen A. En las imágenes C, E, F y G se pueden observar quistes de *Entamoeba coli* criterio 5 en coloración HF, H&E y Lugol respectivamente. Por otro lado observamos en las Imágenes B, D, F, H Quistes del complejo *Entamoeba histolytica/E. dispar* en las coloraciones H-E, MG-G, HF y Lugol respectivamente. Finalmente en las imágenes I y J, tenemos quistes de *Iodamoeba bütschlii* en Lugol y MG Respectivamente. Barra=10µm.



**Figura 2.** Se observan quistes de *Giardia lamblia* en objetivo óptico de 100x en la imagen K asimismo podemos observarlos en las imágenes M,O y Q con las coloraciones MG-G, H-E y HF respectivamente según el criterio 5 antes pre-establecido. Por otro lado podemos apreciar quistes de *Endolimax nana* en las imágenes S, T, U y V con las coloraciones Lugol, H-E, MG-G y HF respectivamente, y por último se encuentran las imágenes L, N, R, P y T las cuales presentan *Blastocystis sp.* con las coloraciones H-E, Lugol, HF y MG-G respectivamente cada una establecido en el criterio cinco antes mencionado. Barra=10µm.

Luego de totalizar la cantidad de formas evolutivas de cada uno de los protozoarios encontrados en las muestras, se realizó una comparación entre las coloraciones permanentes en estudio y el método Lugol partiendo de cada uno de los protozoarios. Los resultados obtenidos, se reflejan de la tabla 3 a la 8.

En la identificación de quistes de *Giardia lamblia* (Tabla 3), para el criterio 1 que se refiere a la coloración de la forma evolutiva sin definición, se obtuvo que la coloración con mayor porcentaje fue la H-E con 25,84% al compararla con el método Lugol de 48,30%.

En cuanto al criterio 2, que se refiere a que la forma evolutiva conserva forma y membrana, se colorea y se observa una (1) estructura interna, tenemos que con la HF se coloreó 25% de las formas parasitarias en comparación con 37,69 % de efectividad del método Lugol.

En el criterio 3 que hace referencia a la conservación de la forma y membrana, coloración y observación de una (1) estructura interna de la forma evolutiva, tenemos que la coloración permanente que coloreó 31,90% bajo estas características fue la HF mientras que con el método Lugol se obtuvo 49,69%.

El criterio 4 referido a conservar forma o membrana quística, coloración y observación correcta de dos (2) estructuras internas tenemos que la técnica de mayor utilidad con 20,56% es la HF y con el método Lugol se obtuvo 73,76%.

Para el criterio 5 en el cual se considera la conservación de la membrana quística de *Giardia lamblia*, tinción con óptimo contraste y observación de 3 o más estructuras internas, tenemos que la coloración de

mayor efectividad con 4,06% es la HF mientras que el método Lugol que tiene 95,20% de utilidad.

**Tabla 3.** Comparación de las coloraciones permanentes con respecto al método Lugol, en base a los criterios pre-establecidos aplicados para quistes de *Giardia lamblia*, expresados en frecuencias absolutas y relativas.

CRITERIOS	H-E		HF		MG-G		LUGOL		TOTAL DE CRITERIOS
	FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR	
1	99	25,85%	28	7,31%	71	18,54%	185	48,30%	383
2	42	16,15%	65	25%	55	21,15%	98	37,69%	260
3	6	3,27%	52	31,90%	24	14,72%	81	49,69%	163
4	1	0,71%	29	20,57%	7	4,96%	104	73,75	141
5	1	0,37%	11	4,06%	1	0,37%	258	95,20%	271
<b>TOTAL DE PARASITOS</b>	149	12,23%	185	15,19%	158	12,97%	726	59,61%	1218

En la identificación de quistes de *Entamoeba coli* (Tabla 4), el criterio 1 la coloración permanente donde se observaron mayor cantidad de quistes fue la HE con 36,36%, mientras que con el método Lugol se observó 9,09% de quistes con estas características.

En el criterio 2, se obtuvo 52,94% de los quistes teñidos con la coloración HF. Con el método Lugol se pudo apreciar que hasta 11% de estos quistes corresponden al mismo criterio.

Al observar quistes bajo el criterio 3 coloreados con MG-G 33,33% de ellos cumplía con lo establecido en dicho criterio. Con respecto al método Lugol se observó 53,33% de los quistes con las mismas características.

Para el criterio 4 con 6,25% fue la HF la coloración que nos permitió apreciar lo considerado en el mismo y el método Lugol arrojó que 93,75% de estos protozoarios se colorearon, conservaron la forma, membrana y dos (2) estructuras internas.

Para el criterio 5 con 6,66% la coloración H-E resultó ser la más útil sobre las demás coloraciones y el método Lugol arrojó resultados de 93,33% bajo este criterio.

**Tabla 4.** Comparación de las coloraciones permanentes con respecto al método Lugol, en base a los criterios pre-establecidos aplicados para quistes de *Entamoeba coli*.

CRITERIOS	HE		HF		MG		LUGOL		TOTAL DE CRITERIOS
	FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR	
1	20	36,36%	14	25,45%	16	29,09%	5	9,09%	55
2	4	23,53%	9	52,94%	2	11,76%	2	11,76%	17
3	1	6,66%	1	6,66%	5	33,33%	8	53,33%	15
4	0	0%	1	6,25%	0	0%	15	9,37%	16
5	1	6,66%	0	0%	0	0%	14	9,33%	15
<b>TOTAL DE PARASITOS</b>	26	22,03%	25	21,19%	23	19,49%	44	37,29%	118

Al observar quistes de *Iodamoeba bütschlii* (Tabla 5), con H-E se obtuvo que 59,25% y 24,24% cumplen con el criterio 1 y 2 respectivamente. A diferencia del método Lugol donde no se observó ningún quiste bajo el

criterio 1. Con respecto al criterio 2 se observó 48,48% de quistes al hacer el montaje con el método Lugol.

En el criterio 3 la HF obtuvo 40.54% de utilidad y el método Lugol solo 37.84%.

En cuanto al criterio 4 tenemos que con 71,43% la coloración HF resultó de mayor efectividad que el método Lugol con 0% de efectividad.

La coloración May-grunwald giemsa fue más efectiva ante el Lugol (0%) con 66.6% para el criterio 5.

**Tabla 5.** Comparación de las coloraciones permanentes con respecto al método Lugol, en base a los criterios pre-establecidos aplicados para quistes de *Iodamoeba bütschlii*, expresados en frecuencias absolutas y relativas.

CRITERIOS	HE		HF		MG		LUGOL		TOTAL DE CRITERIOS
	FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR	
1	16	59,25%	1	3,70%	10	37,04%	0	0%	27
2	8	24,24%	5	15,15%	4	12,12%	16	48,48%	33
3	3	8,11%	15	40,54%	5	13,51%	14	37,83%	37
4	1	4,76%	15	71,43%	5	23,81%	0	0%	21
5	0	0%	1	33,33%	2	66,66%	0	0%	3
<b>TOTAL DE PARASITOS</b>	28	23,14%	37	30,58%	26	21,49%	30	24,79%	121

Con respecto al Complejo *Entamoeba histolytica/ E. dispar* (Tabla 6), la coloración MG-G presento una efectividad de 38,46% al colorear quistes en el criterio 1. Se observó el 30,76% de estos quistes coloreados con Lugol cumpliendo con el mismo criterio.

Para el criterio 2 la coloración donde se observaron quistes teñidos también fue MG–G con 44,4% de efectividad, no observándose ningún quiste bajo este criterio teñido en Lugol.

Para el criterio 3 y 4 no se obtuvo ningún resultado ni en las coloraciones permanentes ni en Lugol y solo se observaron quistes teñidos con las características establecidas en el criterio 5 en el método Lugol representando 26,1% del total de quistes.

**Tabla 6.** Comparación de las coloraciones permanentes con respecto al método Lugol, en base a los criterios pre-establecidos aplicados para quistes de Complejo *Entamoeba histolytica/ E. dispar*, expresados en frecuencias absolutas y relativas.

CRITERIOS	HE		HF		MG		LUGOL		TOTAL DE CRITERIOS
	FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR	
1	4	30,77%	0	0%	5	38,46%	4	30,77%	13
2	0	0%	0	0%	4	100%	0	0%	4
3	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0
4	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0
5	0	0%	0	0%	0	0%	6	100%	6
<b>TOTAL DE PARASITOS</b>	4	17,39%	0	0%	9	39,13%	10	43,48%	23

Considerando lo establecido en el criterio 1 para quistes de *Endolimax nana* (Tabla 7), la coloración MG-G destaca con 57,14% de quistes teñidos mientras que con el método Lugol que obtuvo solo 14,28%.

Para el criterio 2, se observó que dos de las coloraciones permanentes fueron igual de efectivas para la identificación de este

protozooario siendo 50 % de estos quistes coloreados tanto para H-E como para MG-G, mientras que el método Lugol tuvo 0% de efectividad.

Para el criterio 3 las coloraciones que mostraron más utilidad fueron H-E y HF con 34,4% mientras que el Lugol obtuvo 0%.

Bajo el criterio 4 con 27,03% de quistes teñidos se encuentra la HF en contraposición con método Lugol el cual arrojó 51.37% de quistes teñidos.

Por último, en el criterio 5 tenemos que la coloración permanente HF mostró 38,71% de quistes coloreados al igual que el método Lugol.

**Tabla 7.** Comparación de las coloraciones permanentes con respecto al método Lugol, en base a los criterios pre-establecidos aplicados para quistes de *Endolimax nana*, expresados en frecuencias absolutas y relativas.

CRITERIOS	HE		HF		MG		LUGOL		TOTAL DE CRITERIOS
	FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR	
1	2	28,57%	0	0%	4	57,14%	1	14,29%	7
2	9	50%	0	0%	9	50%	0	0%	18
3	10	3,45%	10	34,48%	9	31,03%	0	0%	29
4	1	2,70%	10	27,03%	7	18,92%	19	51,35%	37
5	7	22,58%	12	38,71%	0	0%	12	38,71%	31
<b>TOTAL DE PARASITOS</b>	29	23,77%	32	26,23%	29	23,77%	32	26,23%	122

Al observar diferentes formas evolutivas de *Blastocystis sp* (Tabla 8), para el criterio 1 la coloración MG-G resultó útil en 100% en comparación con el método Lugol (0%).

Tomando en cuenta lo establecido en el criterio 2, nuevamente la coloración más destacada es MG-G con 93,75% de protozoarios teñidos, mientras que en el método Lugol no se observaron los protozoarios teñidos (0%).

En cuanto al criterio 3 y 4 la coloración de elección sería la HF con 63,83% y H-E con 47,78% de *Blastocystis sp* teñidos respectivamente, mientras que con el método de Lugol para ambos criterios no se observaron los protozoarios coloreados (0%).

Finalmente bajo el criterio 5 se obtuvo que la HF coloreó 27,18% de parásitos, por otra parte el método Lugol logró una tinción del protozoario de 32,03%.

**Tabla 8.** Comparación de las coloraciones permanentes con respecto al método Lugol, en base a los criterios pre-establecidos aplicados para formas evolutivas de *Blastocystis sp.*, expresados en frecuencias absolutas y relativas.

CRITERIOS	HE		HF		MG		LUGOL		TOTALES DE CRITERIOS
	FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR	
1	0	0%	0	0%	4	100%	0	0%	4
2	0	0%	1	6,25%	15	93,75%	0	0%	16
3	10	21,28%	30	63,83%	7	14,89%	0	0%	47
4	20	48,78%	17	41,46%	4	9,76%	0	0%	41
5	24	23,30%	28	27,18%	18	17,47%	33	32,04%	103
<b>TOTAL DE PARASITOS</b>	54	25,59%	76	36,02%	48	22,75%	33	15,64%	211

La descripción, análisis e interpretación de los datos de la manera más practica posible, demostró que la coloración que presenta mayor utilidad para la identificación de formas evolutivas de protozoarios es la HF, tomando en cuenta que cumple con al menos 2 de los 5 criterios establecidos; siendo más específica para el diagnóstico de *Giardia lamblia*, *Endolimax nana* y *Blastocystis sp*. Lo cual hace considerar a esta tinción como un método esencial y confiable para la identificación de estos protozoarios tal como lo expone Chacín–Bonilla (7) en su trabajo de investigación donde plantea que la aplicación de coloraciones permanentes como la HF a frotis de heces podría evitar y reducir el diagnóstico errado con el método directo (Solución salina y Lugol) por sí solo, ya que amibas de pequeño tamaño como *Endolimax nana* podrían no ser detectadas en el mismo o si se detectan, sus rasgos morfológicos son indistinguibles.

En segundo lugar la coloración MG-G abarca la identificación de la mayoría de los protozoarios encontrados en las muestras examinadas, de manera deficiente e intermedia. Sin embargo resultó ser bastante efectiva específicamente en la identificación de *Iodamoeba bütschlii*. Por lo que podría considerarse como un método diagnóstico confirmatorio adjunto al directo con Lugol como lo aplicaron en su estudio Sánchez y col.(8) al corroborar con ésta tinción la identificación de protozoarios realizada en el examen directo.

Seguidamente la H-E resultó tener una utilidad de identificación deficiente para *Iodamoeba bütschlii*, intermedio para *Endolimax nana* de y óptima para *Blastocystis sp*, pero altamente específica para la identificación de *Entamoeba coli*.

Se sugiere continuar realizando estandarizaciones y mejoras en las coloraciones antes descritas, para así lograr la obtención de una técnica de tinción que nos permita observar todas las estructuras internas del protozooario sin modificarlo y que sea de fácil ejecución al igual que el método de Lugol.

El método directo Lugol demostró la más alta utilidad en la identificación de todos los protozoarios, con una efectividad intermedia para el diagnóstico de *Iodamoeba bütschlii*, mientras que tiene una gran especificidad en la identificación del Complejo *Entamoeba histolytica/E. dispar*. Para el resto de los protozoarios resultó ser el método más efectivo. Sin embargo, tal como señala Palmar y cols. En el 2011 (12) en ocasiones específicas se han observado que algunos quistes se retraen y pierden su estructura tomando una coloración anormal al entrar en contacto con la coloración de Lugol.

Se recomienda al personal de salud específicamente Licenciados en Bioanálisis tomar consideraciones con respecto al diagnóstico sobreestimado de parasitosis intestinales debido a la ejecución de técnicas rutinarias que podrían dar falso positivo o negativo afectando de manera directa al paciente. Se debería establecer en el día a día el apoyo con técnicas más específicas como las coloraciones permanentes.

Tal como lo refiere la literatura podríamos concluir que el método Lugol sigue siendo el método gold-standard en el diagnóstico de protozoarios sin embargo, todas las coloraciones permanentes que aquí se plantean tienen la capacidad de alcanzar la identificación ya sea de uno o varios parásitos y aunque no están al mismo nivel que el Lugol pueden

complementarlo como un adjunto en la identificación de protozoarios y de esta manera evitar falsos diagnósticos.

Las coloraciones que fueron objeto de estudio se encuentran se encuentran compitiendo frente a este método al destacar ciertas características estructurales o morfológicas de estos parásitos donde el método Lugol no llega y viceversa, por lo que pueden complementarse mutuamente. Es por ello que podemos concluir que:

La coloración permanente que presenta mayor utilidad para la identificación de formas evolutivas de protozoarios es la HF.

La coloración MG-G podría considerarse un método diagnóstico confirmatorio adjunto al método directo con Lugol.

La coloración H-E permite la coloración y observación de formas evolutivas de protozoarios bajo los criterios establecidos pudiendo ser una herramienta útil para corroborar el diagnóstico de los mismos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mora L, Segura M, Martínez I, Figuera L, Salazar S, Fermín I, *et al.* Parasitosis intestinales y factores higiénicos sanitarios asociados en individuos de localidades rurales del estado Sucre. *Kasmera*. 2009; 37(2): 148–156.
2. Navarro E. Diagnóstico de protozoarios intestinales frecuentes en niños. *Rev Bol Ped*. 2008; 47(3): 169-177.
3. Núñez F, Ginorio D, Finlay C. Control de la calidad del diagnóstico coproparasitológico en la provincia de Ciudad de La Habana, Cuba. *Cad. Saúde Pública*. 1997; 13(1): 67-72
4. Castro A, Guerrero O. Técnicas de Diagnóstico. 2da Edición. San José, Costa Rica: Editorial Casa Universitaria de Costa Rica; 2006: 21-38
5. Becton Dickinson and Company. Dobell & O'Connor Iodine Stain Droppers. 2003. Disponible en: <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L001118%28201006%29.pdf>
6. Gómez-Rivera N, Molina A, García M, Castillo J, Castillo J, García R. y col. Identificación de la *Entamoeba histolytica*/E. dispar por la técnica de amiba en fresco vs su tinción con hematoxilina-eosina en la diarrea aguda. *Rev Mex Ped*. 2005; 72(3): 109-112

7. Chacin-Bonilla L. Diagnóstico microscópico de amibiasis: Método obsoleto pero necesario en el mundo en desarrollo. Invest Clín 2011;52(4): 291-294
8. Sánchez L, Barrios E, Sardiña A, Araque W, Delgado V. Infección experimental de aislados humanos de Blastocystis sp. en ratones inmunosuprimidos con dexametasona. Kasmera; 2012; 40(1): 67-77.
9. Bancroft J, Cook D. Manual of histological techniques and their diagnostic application. 2da. Edición. Edinburgh. Churchill Livingstone; 1994.
10. Spencer, F. M., and L. S. Monroe. The Color Atlas of Intestinal Parasites, 2nd ed. Charles C Thomas, Publisher, Springfield, Ill. 1976.
11. Ribeiro R. Procedimentos Laboratoriais em Parasitologia Médica. 2da edición. Sao Paulo: Livraria Santos; 1999.
12. Palmar, E., La Corte, M. C., & Uribe, I. Presencia de giardia intestinalis en una población de niños en edad preescolar del estado Zulia, Venezuela. REDIELUZ, 2011; 1(2):130-135