



00344
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACION DE LA FACTIBILIDAD DE UTILIZAR
COLORANTES BIOLOGICOS PARA DETERMINAR
LA VIABILIDAD DE HUEVOS DE HELMINTOS.

T E S I S

Que para obtener el grado académico:

MAESTRIA EN CIENCIAS

(BIOLOGIA DE SISTEMAS Y RECURSOS ACUATICOS)

P r e s e n t a:

MARIA NEFTALI ROJAS VALENCIA

Director de Tesis:

DR. JORGE LUIS DE VICTORICA ALMEIDA

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

257603
1998



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIAS

Con todo cariño tengo el agrado de volver a dedicarles otra tesis a las dos estrellas que han iluminado por siempre mi horizonte - a mis padres -:

ALEJANDRO ROJAS SÁNCHEZ

NEFTALÍ VALENCIA DE ROJAS

a mis queridos hermanos:

ALEJANDRO,

FCO. JAVIER,

ALICIA,

RAFAEL

Y

J. REFUGIO.

Por su incansable afán de superación.

a mi querido esposo:

GUILLERMO FERNÁNDEZ

Que con su ayuda y paciencia hizo posible la feliz conclusión de esta tarea.

y a mi adorable cachorrita:

DENISE YEAZUL

Quien me inspira para seguir adelante, y a quien voy a darle siempre el mejor ejemplo y lo mejor de mí, para que se sienta orgullosa de su mamá, como yo me siento de tenerla a ella con migo.

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

Deseo hacer patente mi agradecimiento a las siguientes personas:

A la Dra. Ada Nelly Martínez Villalobos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por su apoyo en la obtención de hembras grávidas de *Ascaris suum*.

A la Q. F. B. Matilde Galván García del Instituto de Ingeniería de la UNAM, por sus valiosas observaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Al Biólogo Homer Alfredo Gamboa Romero de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por su apoyo en la toma de microfotografías.

A los miembros del Jurado Dictaminador

Dr. Jorge Luis De Victorica Almeida

Dr. Kuppusamy Ammal Ilangovan

M. en C. Pedro Alejandro De Jesús Magaña Melgoza

Dr. Marcos Rafael Lamothe Argumedo

Dr. Germán Buitrón Mendez

M. en C. Luis García Prieto

Dr. Adalberto Noyola Robles

Por sus observaciones y atinadas sugerencias para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Importancia sanitaria de los parásitos intestinales	3
<i>2.1.1 Definición</i>	3
<i>2.1.2 Relación parásito-hospedero y sus diferentes formas</i>	3
<i>2.1.3 Definición e importancia de los parásitos temporales intermitentes</i>	3
<i>2.1.4 Formas de transmisión de los helmintos</i>	5
<i>2.1.5 Factores que favorecen la propagación de infecciones gastrointestinales</i>	5
<i>2.1.6 Principales helmintos presentes en aguas residuales</i>	5
<i>2.1.7 Principales características morfológicas y diferencias entre Ascaris lumbricoides y Ascaris suum</i>	7
<i>2.1.7.1 Ciclo de vida de Ascaris lumbricoides y A. suum</i>	8
<i>2.1.7.2 Cuadro clínico de Ascaris lumbricoides</i>	8
2.2 Estructura y características de los huevos de Ascaris lumbricoides y Ascaris suum	10
<i>2.2.1 Formas de huevos de Ascaris lumbricoides y A. suum</i>	14
<i>a) Huevo fértil normal</i>	14
<i>b) Huevos fértiles descorticados</i>	14
<i>c) Huevo con embrión</i>	16
<i>d) Huevos no fertilizados</i>	16
<i>2.2.2 Resistencia a la acción de agentes químicos</i>	16

2.3 Características generales de los colorantes	17
2.3.1 <i>Clasificación de los colorantes</i>	17
2.3.2 <i>Teoría de la tinción</i>	17
2.4 Características específicas de algunos colorantes biológicos	20
2.4.1 <i>Características del colorante Azul Tripán</i>	20
2.4.2 <i>Características del Rojo Congo</i>	20
2.4.3 <i>Características de la Eosina "Y"</i>	21
2.4.4 <i>Características de la Solución Lugol</i>	21
2.4.5 <i>Características de la Hematoxilina</i>	22
2.4.6 <i>Características de la Safranina</i>	22
2.4.7 <i>Características del Verde de Metilo</i>	23
2.4.8 <i>Características del Azul de Metileno</i>	24
3. ANTECEDENTES	25
4. OBJETIVOS	27
5. METODOLOGÍA	28
5.1 <i>Ensayos exploratorios</i>	28
5.2 <i>Ensayos formales</i>	29
5.2.1 <i>Diseño experimental estadístico</i>	30
5.2.2 <i>Métodos estadísticos aplicados</i>	32
5.3 <i>Aplicación del método de tinción a muestras naturales</i>	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6.1 <i>Evaluación cualitativa</i>	36

6.2	<i>Tratamiento estadístico</i>	37
6.3	<i>Resultados y discisión de la aplicación de la técnica de tinción a muestras naturales</i>	44
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
8.	BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXO I	Técnica para obtención de huevos de <i>Ascaris suum</i>	60
ANEXO II	Técnica analítica de la environmental protection agency (US EPA, 1992) para la cuantificación y determinación de huevos de helmintos, incorporada como procedimiento norma en la NOM-001-ECOL-1996	62
	1. Fundamento	63
	2. Procedimiento	63
ANEXO III	Técnica por filtración /Transparentación de la membrana (F/TM) para la cuantificación y determinación de huevos de helmintos en aguas residuales	65
	1. Fundamento	66
	2. Procedimiento	66
ANEXO IV	Fotografías de los resultados de la determinación de la viabilidad de los huevos de helmintos mediante técnicas de tinción tomadas tanto en muestras preparadas con una suspensión de huevos como de muestras de aguas residuales crudas y tratadas de la Planta de Tratamiento de la UNAM	69

LÁMINA I-II	Huevos de <i>A. suum</i> en diferentes etapas de desarrollo embrionario	70-71
LÁMINA III-V	Fotografías de muestras preparadas con una suspensión de huevos viables y no viables, recientemente extraídos de una hembra grávida de <i>A. suum</i> teñidos con diferentes colorantes biológicos	72-74
LÁMINA VI-VIII	Huevos de helmintos aislados de muestras de la planta de tratamiento de la UNAM, mediante la técnica F TM en combinación con colorantes biológicos	75-77
LÁMINA IX	Huevos de helmintos aislados de muestras de agua cruda, mediante el raspado del filtro de membrana	78

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Principales helmintos presentes en aguas residuales	6
2. Variables y condiciones experimentales seleccionadas	31
3. Número asignado a los tratamientos y réplicas experimentales	31
4. Registro del orden aleatorio en que se evaluaron las réplicas de los tratamientos	32
5. Resultados de los experimentos de tinción e incubación <i>in vitro</i> de los huevos de <i>A. suum</i>	38
6. Promedios del número de huevos viables y no viables de cada uno de los tratamientos	39
7. Análisis de varianza para una clasificación doble y prueba de Fisher	40
8. Resultados correspondientes al número de huevos viables	42
9. Análisis de varianza para una clasificación simple y prueba de Fisher	43
10. Número promedio de huevos de helmintos presentes en las muestras de la planta de tratamiento de la UNAM	46
11. Comportamiento de los colorantes en el agua cruda con respecto a la tinción de los huevos de helmintos del agua cruda	48
12. Precios de los colorantes biológicos empleados en este estudio	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Ciclo de vida de <i>Ascaris lumbricoides</i>	9
2. Representación esquemática de la cubierta de los huevos de nematodos	11
3. Micrografía electrónica con pocos aumentos de un óvulo recientemente fecundado	12
4. Esquema de la estructura del huevo de <i>Ascaris suum</i>	14
5. Huevecillo fecundado de <i>A. lumbricoides</i> de las materias fecales humanas	15
6. Huevecillo no fecundado de <i>A. lumbricoides</i> de las materias fecales humanas	15
7. Formas de huevecillos de <i>A. lumbricoides</i>	15
8. Estructura química del trinitro benceno y del ácido pícrico	19
9. Estructura química del Azul Tripán	20
10. Estructura química del Rojo Congo	21
11. Estructura química de la Eosina "Y"	21
12. Estructura química Hematoxilina	22
13. Estructura química de la Safranina	23
14. Estructura química del Verde de Metilo	23
15. Estructura química del Azul de Metileno	24

16.	Esquema de la cubierta de los huevos de <i>Ascaris lumbricoides</i>	49
17.	Esquema de la cubierta de los huevos de <i>Trichuris trichiura</i>	50
18.	Esquema de la cubierta de los huevos de <i>Enterobius vermicularis</i>	50

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

1	Huevo corticado y no fecundado de <i>Ascaris suum</i> , aislado de una muestra testigo	70
2	Huevo fecundado viable de <i>Ascaris suum</i> , en primera fase de desarrollo embrionario, aún conserva la cubierta externa mamelonada, aislado de una muestra teñida con solución Lugol	70
3	Huevo fecundado viable de <i>Ascaris suum</i> , en primera fase de desarrollo embrionario, descorticado. Aislado de una muestra testigo	70
4	Huevo fecundado viable de <i>Ascaris suum</i> , en fase de desarrollo embrionario de 4 células, aún conserva su cubierta externa mamelonada. Aislado de una muestra teñida con solución Lugol	71
5	Huevo fecundado viable descorticado de <i>Ascaris suum</i> , en fase de desarrollo larval, aislado de una muestra teñida con Azul Tripán	71
6	Larva recién nacida de <i>Ascaris suum</i> , aislada de una muestra testigo	71
7	Huevos de <i>Ascaris suum</i> , dos en etapa larval y uno no fecundado, aislados de una muestra sintética. Teñidos con Azul Tripán	72
8	Huevos de <i>Ascaris suum</i> , uno en etapa larval y otro apunto de terminar la eclosión, aislados de una muestra sintética. Teñidos con Azul Tripán	72
9	Huevos de <i>Ascaris suum</i> , uno en etapa larval y otro no fecundado, aislados de una muestra sintética. Teñidos con Eosina "Y"	72

10	Huevos de <i>Ascaris suum</i> , uno no fecundado y dos en etapa larval, aislados de una muestra sintética. Teñidos con solución Lugol	73
11	Huevos de <i>Ascaris suum</i> , uno en etapa fecunda y los demás no fecundados, aislados de una muestra sintética. Teñidos con Rojo Congo	73
12	Huevos de <i>Ascaris suum</i> , uno en etapa larval y otro no fecundado, aislados de una muestra sintética. Teñidos con Hematoxilina	73
13	Huevos de <i>Ascaris suum</i> , dos en etapa larval y uno no fecundado, aislados de una muestra sintética. Teñidos con Safranina	74
14	Huevos de <i>Ascaris suum</i> , uno en etapa larval y otro no fecundado, aislados de una muestra sintética. Teñidos con Azul de Metileno	74
15	Huevo de <i>Trichuris trichiura</i> no fecundado, aislado de una muestra de agua del efl. de Lodos Activados. Teñido con Azul Tripán	75
16	Huevo de <i>Ascaris lumbricoides</i> en etapa fecunda, aislado de una muestra de agua cruda. Teñido con Azul Tripán	75
17	Huevo de <i>Ascaris lumbricoides</i> en etapa larval, aislado de una muestra de agua cruda. Teñido con Azul Tripán	75
18	Huevo de <i>Ascaris lumbricoides</i> no fecundado, aislado de una muestra del efl. del filtro rociador. Teñido con Azul Tripán	76
19	Huevo de <i>Ascaris lumbricoides</i> en etapa fecunda, aislado de una muestra de agua cruda. Teñido con Eosina "Y"	76

20	Huevo de <i>Ascaris lumbricoides</i> no fecundado, aislado de una muestra del efl. del Biodisco. Teñido con Hematoxilina	76
21	Huevo de <i>Ascaris lumbricoides</i> en etapa fecunda, aislado de una muestra de agua cruda. Teñido con Safranina	77
22	Huevo de <i>Ascaris lumbricoides</i> no fecundado, aislado de una muestra del efl. del Filtro Rociador. Teñido con Azul de Metileno	77
23	Huevo de <i>Ascaris lumbricoides</i> en etapa fecunda, aislado de una muestra de agua cruda. Teñido con Azul Tripán	78
24	Huevo de <i>Trichuris trichiura</i> en etapa fecunda, aislado de una muestra de agua cruda. Teñido con Azul Tripán	78

RESUMEN

El 6 de enero de 1997 la SEMARNAP publicó la Norma Oficial Mexicana 001-ECOL-1996 en la que se fijaron los nuevos límites permisibles del contenido de huevos de helmintos en aguas para riego, así como el método analítico cuantitativo correspondiente. Sin embargo, debido a las dificultades técnicas para su determinación, se eliminó la medición de la viabilidad de estos organismos, aspecto de primordial importancia en su epidemiología, ya que establece la capacidad de un huevo para desarrollarse hasta la etapa infectante, única en la que puede causar enfermedad. Con el fin de resolver este problema, se estableció un método rápido para evaluar la viabilidad potencial (huevos capaces de alcanzar la etapa infectante, no obstante su desarrollo puede verse interrumpido por varios factores), utilizando tinciones con Azul Tripán, Rojo Congo, Eosina "Y", Solución Lugol, Hematoxilina, Safranina, Verde de Metilo y Azul de Metileno junto con el método de incubación *in vitro* para evaluar la viabilidad de los huevos de *Ascaris suum* en muestras sintéticas preparadas con una suspensión fresca de huevos de esta especie.

Los resultados mostraron que los huevos viables son impermeables a cualquiera de los colorantes empleados en este estudio y por lo tanto no se tiñen, mientras que los huevos no viables fijaron el colorante. Este método se contrastó siempre con una muestra de huevos sin adición de colorante, de los que al final del tiempo de incubación se consideraron viables los que se desarrollaron hasta la etapa de larva móvil. Los resultados fueron validados estadísticamente con análisis de ANOVA doble y simple, t de Student y prueba de Tukey, con lo que se demostró que los colorantes son tan confiables como el método de incubación *in vitro* para determinar la viabilidad de los huevos de *Ascaris suum*. Debido a que la Eosina "Y", la Safranina y el Azul Tripán presentaron menores coeficientes de variación y que en la práctica fueron los colorantes que mejor diferenciaron los huevos teñidos de los no teñidos, se recomiendan como los más indicados para emplearse en este tipo de estudios.

También se evaluaron muestras de aguas residuales domésticas crudas y de sus efluentes tratados por lodos activados, biodisco y filtro rociador de la Planta de Tratamiento de la Universidad

Nacional Autónoma de México, aplicando el método Norma y el de filtración/transparentación de la membrana, conjuntamente con el de tinción al final. En las muestras analizadas por el método Norma se observó disgregación de colorantes por los reactivos empleados y no se detectaron huevos de helmintos ni en las muestras testigo. Con el segundo método, la concentración de huevos detectada en las mismas muestras fue de 9 a 17/l de agua cruda y de 0 a 11/l en el agua tratada. El número de huevos no teñidos (potencialmente viables) evaluados en el agua cruda fue de 0 a 7/l, mientras que en los efluentes sólo se observaron huevos teñidos. Se concluye que el método de tinción es confiable, rápido, barato, sencillo y de aplicación general, por lo que es recomendable que se incluya el aspecto de viabilidad, dentro de la norma para helmintos en el agua para riego.

1. INTRODUCCIÓN

El empleo e importancia del agua dulce para el hombre no cesa de crecer; el abastecimiento del agua se hace cada vez más difícil, por lo que el reuso del agua residual representa una interesante alternativa; no obstante, su empleo representa riesgos en la salud pública en la mayor parte de los países en desarrollo como el nuestro, ya que la calidad microbiológica del agua tratada, si no es la adecuada para los usos humanos, es un factor de transmisión de los microorganismos causantes de muchas infecciones gastrointestinales, como protozoarios y helmintos.

En nuestro país existe abundancia del recurso hídrico, pero su distribución irregular propicia escasez en muchas zonas, lo que ha favorecido el uso de aguas residuales en actividades como el riego agrícola, con el fin de liberar agua de primer uso para el consumo humano.

Un caso típico de esta actividad se da en el Valle de México y en el Valle del Mezquital, en el estado de Hidalgo donde el riego con agua residual se practica desde principios de siglo. Otros estados en los que esta práctica es común son Michoacán, Morelos y Veracruz que, junto con Hidalgo, representan el 69.9% de la superficie total dedicada a la agricultura (**Guerrero *et al.*, 1982**). Con el reuso de las aguas residuales se han presentado aspectos benéficos tales como el incremento en los rendimientos agrícolas debido al aporte de nutrientes -según (**Blumenthal *et al.*, 1992**) se han observado incrementos en la productividad desde 67 hasta 150%- la disminución en el uso de fertilizantes químicos, el amortiguamiento de la salinización de ciertos tipos de suelo por el aporte de materia orgánica, la liberación de grandes volúmenes de agua de primer uso para fines de abastecimiento y una depuración del agua residual por efectos de su infiltración en el suelo.

Sin embargo, se han presentado aspectos negativos sobre la salud pública por el contacto con las aguas residuales y el consumo y manejo de productos agrícolas regados con éstas, debido a su contenido de microorganismos patógenos como bacterias, huevos viables de helmintos y quistes de protozoarios. **Siebe y Cifuentes (1993)**, realizaron un estudio epidemiológico en el Valle del Mezquital y comprobaron que en la zona, la incidencia de infecciones gastrointestinales

se incremento por un factor de 24 sobre la media nacional. Esto concuerda con el modelo epidemiológico de **Blumenthal *et al.*, (1989)** y justifica las restricciones impuestas en la Norma Oficial Mexicana **NOM-CCA-003 ECOL/93**, sobre el contenido de bacterias y huevos de helmintos en las aguas residuales que se usarán para riego.

La norma clasificaba al agua en cuatro tipos, de acuerdo con su contenido de bacterias coliformes y huevos viables de helmintos, y restringía su aplicación dependiendo del tipo de cultivo (hortalizas y productos hortofructícolas); además, se especificaba el tipo de riego e intervalo mínimo entre el último riego y la cosecha de cultivos (para definir cultivos no permitidos). El ámbito de concentración de huevos viables de helmintos era de 0-1 por litro (para aguas de tipo 1 y 2, respectivamente); sin embargo, en esta norma no se especificaron los métodos para determinar número ni viabilidad.

El 6 de enero de 1997, se publicó en el Diario Oficial la **NOM-001-ECOL-1996**, en la que se marcaron los nuevos límites permisibles del contenido de huevos de helmintos en aguas para riego, así como el método analítico cuantitativo correspondiente. No obstante, se sigue sin especificar un método para determinar viabilidad de estos organismos y además se ha eliminado de la norma dicha medición, aunque este aspecto es de suma importancia, ya que los huevos viables son los que determinan la capacidad de un huevo para desarrollarse hasta la etapa infectiva. Es posible que esta eliminación se haya debido a que los métodos tradicionales para medir viabilidad (incubación *in vitro* o incubación *in vivo*) toman 21 días para la obtención de resultados y presentan dificultades técnicas, que limitan su aplicación de manera rutinaria.

Por otro lado, con anterioridad a la publicación de esta norma, en este trabajo de tesis se estaban realizando estudios enfocados a subsanar la falta de una técnica rápida y confiable para la determinación de la viabilidad de los huevos de helmintos. Fue así como se desarrolló el método de tinción que se presenta en este trabajo, el cual se basa en los cambios de permeabilidad de la cubierta externa de los huevos, misma que se ha demostrado esta relacionada con la viabilidad potencial (huevos capaces de alcanzar la etapa infectante, pero que pueden correr el riesgo de no llegar a esa etapa), de estos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Importancia sanitaria de los parásitos intestinales

2.1.1 Definición

La palabra "**parásito**", deriva de las voces griegas "para" = al lado de y "sito" = comer. En general se considera a los parásitos como organismos que viven en el interior, sobre o se alimentan a expensas de otros organismos llamados **hospederos** (Lamothe y García, 1988).

2.1.2. Relación parásito-hospedero y sus diferentes formas

Algunos parásitos requieren de un hospedero intermediario, otros de un hospedero definitivo. Como consecuencia de esta relación, el hospedero puede verse afectado por trastornos funcionales y orgánicos que van de leves a graves e incluso mortales al afectar su estado general (Read, 1981).

Para mantener la relación parásito-hospedero, los parásitos han desarrollado una variedad de adaptaciones morfológicas, fisiológicas, inmunológicas y bioquímicas; así mismo, han adoptado diversas formas de vida, las cuales reciben nombres descriptivos como por ejemplo: ectoparásitos, endoparásitos, parásitos facultativos, obligados, incidental, permanentes, patógeno, seudoparásito, coprozoico y temporales. Un parásito temporal lleva vida libre parte de su existencia, y busca al huésped en forma **intermitente** para obtener de él su alimento; éstos últimos son de especial interés en este trabajo, por lo cual se definen a continuación.

2.1.3. Definición e importancia de los parásitos temporales intermitentes

Los parásitos temporales intermitentes son aquellos que requieren del hospedero enciertas etapas o estadios de su ciclo vital, se desarrollan en el intestino, y se conocen genéricamente como "helminos" (Brown y Belding, 1985). El término "helminto" deriva del griego helmis = "gusano", por tanto es aplicado a todos aquellos parásitos con forma de gusano (Lamothe y

García, 1988; SEMARNAP, 1996) que pertenecen principalmente a tres Phyla de invertebrados: Platyhelminthes (Clases: Turbellaria, Temnocephaloidea, Monogenea, Aspidogastrea, Trematoda, Didymozoida, Cestodaria y Cestoda), Nematoda (cuyo nombre es una modificación del término Nematoidea, deriva del griego *nema* "hilo") y Acantocephala.

Las tres clases de helmintos de interés médico y más reconocidas en México por ser parásitas del hombre son:

1) Los **Tremátodos**, también conocida como distomas, duelas o helmintos planos son endoparásitos de vertebrados incluido el hombre, el término con el que se les designa deriva del griego *trema* (que significa "agujero" y *trao* "atravesar") y hace referencia a los dos órganos de fijación (ventosas) que, comúnmente, presenta. En México, hasta ahora sólo se han descrito dos especies autóctonas de tremátodos parásitos del hombre: la *Fasciola hepatica*, muy frecuente en animales domésticos y causante de la fasciolosis y la *Paragonimus mexicanus*, productora de la paragonimiasis.

2) Los **Céstodos**, también conocidos como tenias o helmintos segmentados, el término céstodo, se deriva del latín *cestus* "cinta" y hace referencia al respecto típico de estos organismos. Las especies de céstodos parásitos del hombre registradas en México son: *Taenia solium* y su larva (*Cysticercus cellulosae*), *Taeniarhynchus saginatus*, *Echinococcus granulosus* (en etapa larvaria), *Dipylidium caninum*, *Vampirolepis nana* e *Hymenolepis diminuta*.

3) Los **Nemátodos**, constituyen uno de los grupos más abundantes. Se estima que hasta ahora se han descrito más de 15 000 especies, de las cuales, la mayoría es de vida libre, tanto de aguas dulces como marinas y terrestres, aunque también se han registrado numerosas especies parásitas de vegetales y de animales, incluyendo al hombre, presentan diferentes formas (fusiforme, filiforme, piriforme y combinadas). Su tamaño varía de unas cuantas micra a varios metros, la mayoría son incoloros. Las especies de nemátodos registradas en México como parásitas del hombre son: *Trichuris trichiura*, *Trichinella spiralis*, *Capillaria hepatica*, *Strongyloides stercoralis*, *Rhabditis pellio*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Angiostrongylus costaricensis*, *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Toxocara canis*, *Toxocara mystax*,

Lagocheilascaris minor, *Enterobius vermicularis*, *Gnathostoma spinigerum*, *Onchocerca volvulus* y *Mansonella ozzardi*.

2.1.4 Formas de transmisión de los helmintos

En muchos casos, la transmisión ocurre directamente por vía oral (al consumir alimentos contaminados como carne de cerdo, de res, pescados y moluscos, entre otros), a través del contacto con aguas residuales que contienen formas infectivas de los helmintos, o por la ingestión de productos que han tenido contacto con dichas aguas como hortalizas y otros cultivos o con el suelo contaminado con excretas. Por último, existe la transmisión por penetración de las larvas infectivas a través de la piel, mecanismo de importancia primordial en el caso de los trabajadores agrícolas que tienen contacto directo con suelos regados con aguas negras o abonados con excretas (Read, 1981; Brown y Belding, 1985).

2.1.5 Factores que favorecen la propagación de infecciones gastrointestinales

Existen numerosos factores que favorecen la propagación de infecciones gastrointestinales, especialmente las ocasionadas por helmintos, los principales son: 1) la falta de servicios públicos como drenaje, agua potable, etc.; 2) el uso de aguas negras para el riego de hortalizas; 3) el empleo de heces humanas como fertilizantes; 4) el fecalismo al aire libre; 5) la cría descuidada de cerdos y otros animales domésticos; 6) la falta de higiene en los rastros y su proliferación clandestina; 7) la acumulación de basura, y 8) la contaminación ambiental, entre otros (Alvarez-Chacon *et al.*, 1985; Lamothe y García, 1988).

2.1.6 Principales helmintos presentes en aguas residuales

En estudios recientes Stien y Schwartzbrod (1990), Shuval (1991), Ayres *et al.* (1992), Gaspard y Schwartzbrod (1993) prestaron principal atención al papel que desempeñan las aguas para el riego de cultivos y áreas de recreación en la diseminación de las infecciones gastrointestinales; en los diferentes estudios se observó que dichas aguas contienen, entre sus múltiples componentes, concentraciones elevadas de agentes patógenos al hombre como virus,

bacterias, protozoarios y helmintos (en etapa infecciosa "huevos embrionados" o "larvas") y podrían considerarse como un vehículo para la diseminación de estos agentes, sobre todo cuando se emplean para el riego de cultivos sin haber recibido un tratamiento adecuado que inhiba o elimine dichos agentes.

Los principales helmintos presentes en aguas residuales y que por lo tanto tienen importancia en ingeniería sanitaria se muestran en la **tabla 1**.

TABLA 1. PRINCIPALES HELMINTOS PRESENTES EN AGUAS RESIDUALES.

TREMÁTODOS	CÉSTODOS	NEMÁTODOS
<i>Fasciola hepatica</i> caracol-hombre	<i>Diphyllobothrium latum</i> pez-hombre	<i>Capillaria hepatica</i> carnívoros-hombre
<i>Paragonimus mexicanus</i> cangrejo-hombre	<i>Dipylidium caninum</i> pulga-hombre	<i>Ancylostoma duodenale</i> suelo-piel del hombre
<i>Schistosoma sp.</i> caracol-hombre	<i>Echinococcus granulosus</i> perro-hombre	<i>Ascaris lumbricoides</i> ingestión-hombre
	<i>Hymenolepis diminuta</i> pulga-hombre	<i>Ascaris suum</i> ingestión-cerdo
	<i>Vampirolepis nana</i> (sinónimo: <i>Hymenolepis nana</i>) pulga-hombre	<i>Enterobius vermicularis</i> ingestión-hombre
	<i>Taeniarhynchus saginatus</i> (sinónimo: <i>Taenia saginata</i>) res-hombre	<i>Necator americanus</i> suelo-piel del hombre
	<i>Taenia solium</i> cerdo-hombre	<i>Rhabditis pellio</i> vida libre-hombre
		<i>Strongyloides stercoralis</i> vida libre- piel del hombre
		<i>Toxocara canis</i> perros y gatos-hombre
		<i>Trichinella spiralis</i> cerdo-hombre
		<i>Trichuris trichiura</i> ingestión-hombre

* De esta tabla las únicas especies que no han sido registradas en México son: *Schistosoma sp.* y *Diphyllobothrium latum*.

De todos estos helmintos, los más abundantes, con distribución cosmopolita y que se transmiten por la ruta oral-fecal son *Ascaris lumbricoides* en un 90 %, *Trichuris trichiura* en el 1 % y *Ascaris suum*, *Enterobius vermicularis* y las tenias en etapa de cisticerco entre otras especies se distribuyen entre el 9 % restante.

En México la ascariasis por *Ascaris lumbricoides* es la parasitosis con mayor prevalencia, la presencia de esta especie es uno de los principales indicadores de contaminación por huevos de helmintos, se considera que infecta uno de cada cuatro individuos en el mundo, tiene distribución cosmopolita y formas infectivas sumamente resistentes a las condiciones ambientales adversas, por lo que se seleccionó a este helminto como modelo en nuestro estudio. Sin embargo, para disminuir el riesgo de infección durante su manipulación, se decidió utilizar a la especie *Ascaris suum*, parásito exclusivo de cerdos y que es morfológicamente indistinguible de *A. lumbricoides* de humanos (Schmidt y Roberts, 1984; Giono *et al.*, 1994).

2.1.7. Principales características morfológicas y diferencias entre *Ascaris lumbricoides* y *Ascaris suum*

A. lumbricoides es el nemátodo de mayor tamaño de los que infectan al intestino del hombre. En estado adulto es alargado, cilíndrico, blanco o rosado, y presenta el extremo anterior romo y el posterior agudo; el macho mide de 15 a 31 cm de largo por 2 a 4 mm de diámetro y la hembra mide de 20 a 49 cm de largo por 3 a 6 mm de ancho; la cutícula es finamente estríada y lisa, de composición química quitinoide; las extremidades anteriores y posteriores son cónicas y en el macho la posterior es curvada. Pueden presentar huevos fértiles normales, fértiles descorticados, con embrión y no fertilizados.

Durante mucho tiempo, el ascárido del cerdo (*Ascaris suum*) estuvo considerado como sinónimo de *A. lumbricoides* dada la gran similitud morfológica y bioquímica que presentan. Es probable que *A. lumbricoides* fuera originalmente un parásito de cerdos que se adaptó al hombre cuando aquéllos fueron domesticados y empezaron a vivir en contacto estrecho con los seres humanos, o quizá fue un parásito del hombre que pasó a los cerdos, lo cual no es sorprendente por cuanto la fisiología de las personas y de los cerdos son muy similares (Schmidt y Roberts, 1984).

Sin embargo, en la actualidad, existen las dos especies separadas y ambas son válidas: *A. suum* en los cerdos y *A. lumbricoides* en el hombre; se les separa con base en su composición de hidratos de carbono, que los diferencia a nivel antigénico (formación de anticuerpos), y en que en el extremo anterior de *A. lumbricoides* se encuentra la boca provista de tres labios salientes

con bordes dentados y bien diferenciados, que lo hacen distinto de *A. suum* ya que no presenta estas características. Estas diferencias son constantes y mucho más claras cuando las estructuras se observan con el microscopio electrónico de barrido. También se ha informado del aislamiento reproductivo existente entre ambas especies en algunas regiones del mundo y de la migración incompleta que realizan cuando una infecta el hospedero de la otra (Schmidt y Roberts, 1984; Giono, *et al.*, 1994).

2.1.7.1. Ciclo de vida de *Ascaris lumbricoides* y *Ascaris suum*

El gusano hembra tiene capacidad productora de hasta 27 millones de huevos y, en promedio, oviposita 200,000 diarios. Cuando salen en las heces, los huevos no están segmentados; en condiciones ambientales favorables (temperatura óptima de 25°C, humedad y oxígeno) en tres semanas se forman embriones en etapa infectante. Éstos, después de ser digeridos, se fijan en el intestino delgado proximal, donde liberan sus larvas rabditoides que penetran la pared intestinal y llegan a las vénulas o linfáticos; por la vena porta pasan al hígado y de ahí a corazón y pulmones, a donde llegan más o menos 7 días después de la infección, rompen los capilares y pasan a los alvéolos de donde emigran a bronquiolos y bronquios, ascienden por la tráquea y glotis, se degluten y llegan a esófago y por último a intestino delgado. Durante su ciclo pulmonar, sufren dos mudas y aumentan cinco veces su tamaño, hasta 1.5 mm de largo. Al llegar al intestino, sufren una cuarta muda, después de la cual se desarrollan al estado maduro y las hembras inician su etapa de oviposición; desde la ingestión del huevo infectante hasta la etapa adulta transcurren alrededor de 60 a 65 días y los gusanos adultos viven de 12 a 18 meses (Schmidt y Roberts, 1984). En la figura 1, se esquematiza el ciclo vital de *A. lumbricoides*. La dinámica de infección de los cerdos por *Ascaris suum* es esencialmente la misma que sigue en los humanos *A. lumbricoides*.

2.1.7.2. Cuadro clínico de *Ascaris lumbricoides*

Los signos y síntomas producidos por la ascariasis pueden dividirse en dos grupos: 1) los ocasionados por los adultos en el intestino y 2) los causados por las larvas durante su migración por el cuerpo. La gravedad de las lesiones en ambos casos dependerá de la cantidad de parásitos

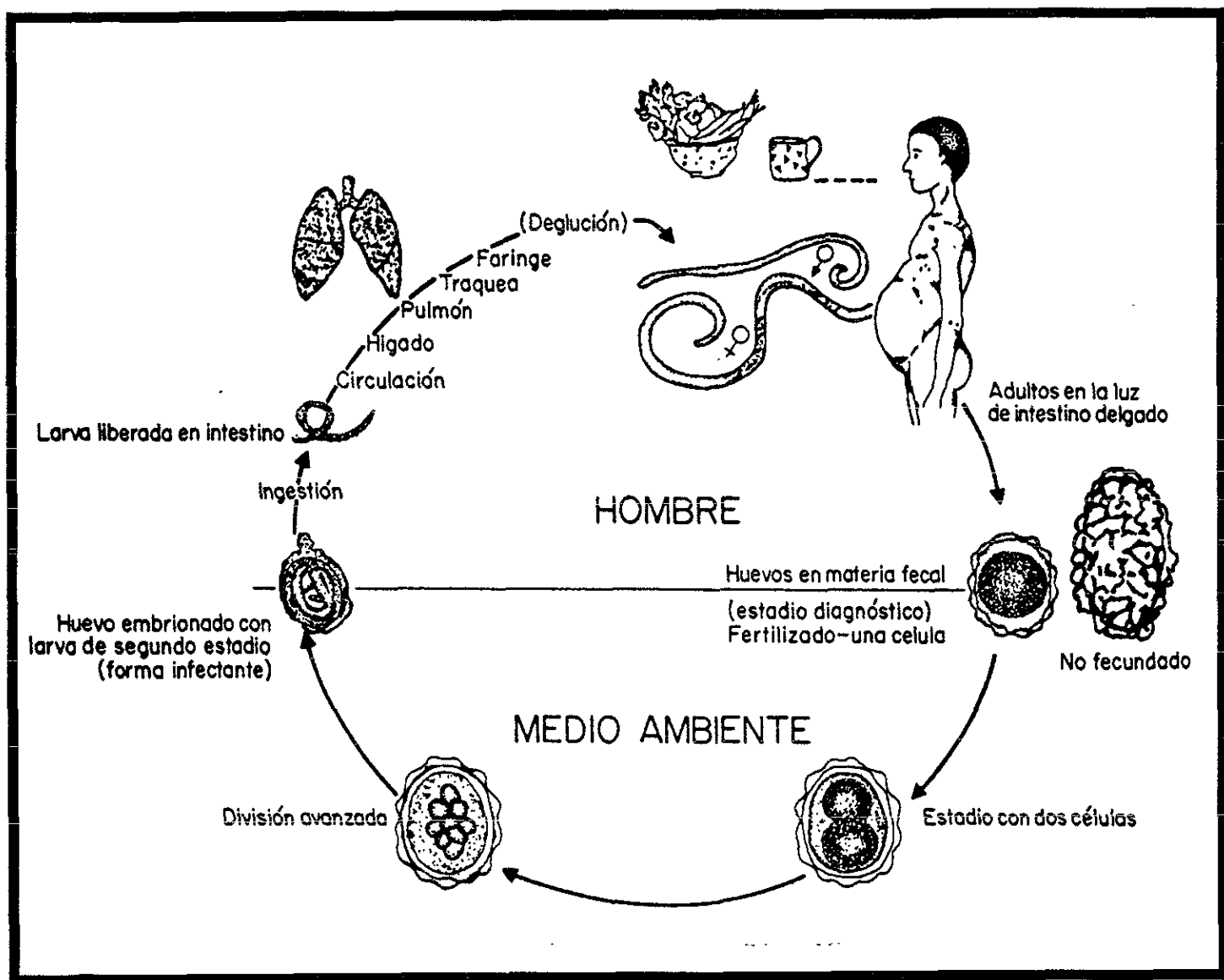


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Ascaris lumbricoides* (modificada de Giono *et al.*, 1994)

involucrados en la infección; cuando el número de adultos es escaso, ésta por lo general pasa inadvertida o puede causar dolor abdominal, náuseas, vómito, trastornos en la digestión y evacuaciones diarreicas y durante la migración pulmonar suele presentarse sensibilización del hospedero. Los efectos graves se deben a la migración de los gusanos adultos, que pueden ser regurgitados y vomitados o son inhalados a un bronquio. Aún cuando los gusanos causen daños escasos o nulos, los productos de su metabolismo pueden provocar manifestaciones en personas sensibilizadas, como edema facial y urticaria gigante, insomnio, pérdida de apetito y peso. Por lo general el pronóstico es favorable y la infección responde fácilmente al tratamiento. Es grave en enteritis aguda y obstrucción intestinal en niños pequeños o cuando el parásito adulto ha invadido órganos vitales (Lamothe y García, 1988).

Cabe recalcar que las parasitosis intestinales en nuestro país y en especial la helmintiasis son muy frecuentes y representan tal importancia que ocupan uno de los primeros lugares dentro de los problemas de salud pública, debido entre otros factores a su difícil control, dado que generalmente este tipo de padecimientos se maneja individualmente (Alvarez-Chacón *et al.*, 1985).

2.2 Estructura y características de los huevos de *Ascaris lumbricoides* y *Ascaris suum*

La penetración del óvulo por el esperma inicia el proceso por medio del cual se producen capas protectoras alrededor del huevo o cigoto y del embrión en desarrollo. Numerosas investigaciones se han hecho en torno a la composición química y física de los huevos de *Ascaris* y todas coinciden en que la cubierta completamente formada en la mayoría de los nemátodos consta de tres capas (Rogers, 1958; Foor, 1967; Hinck, 1972; Schmidt y Roberts, 1981; Schmidt y Roberts, 1984; Salazar y De Haro, 1986): 1) una capa proteíca externa, que frecuentemente no se detecta con el microscopio óptico; 2) una capa quitinosa, y 3) una capa de lípidos más interna denominada "membrana vitelina" (fig. 2 y 3).

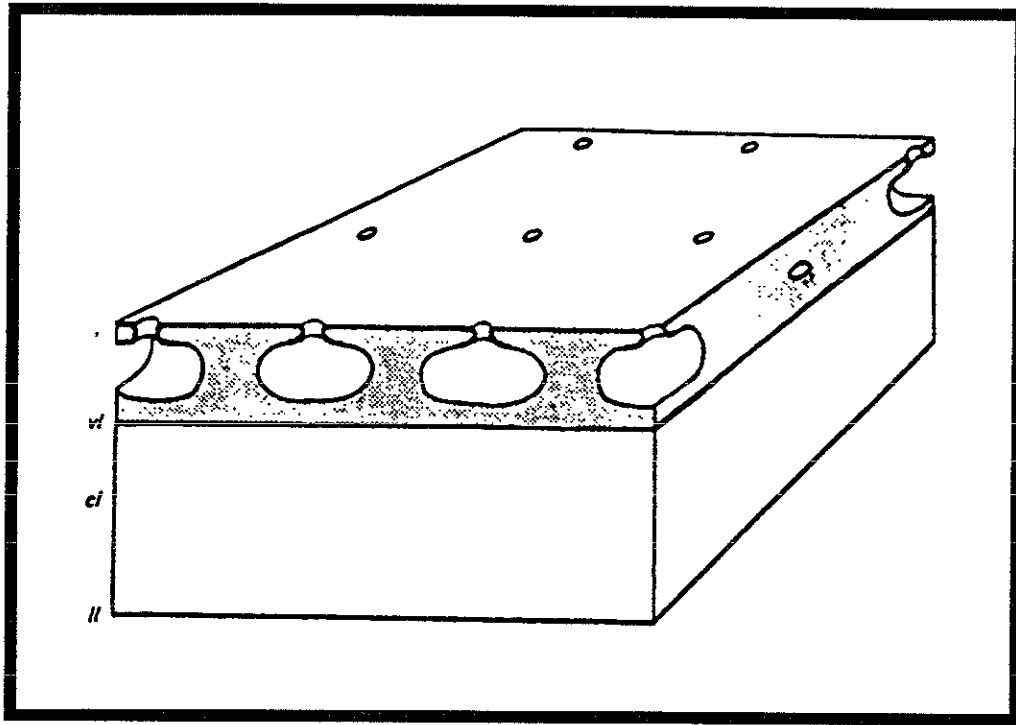


FIGURA 2. Representación esquemática de la cubierta de los huevos de nemátodos. La cáscara consiste de una capa vitelina (*vl*), una capa quitinosa (*cl*) y una capa de lípidos (*ll*) (por Wharton, 1979).



FIGURA 3. Micrografía electrónica con poco aumento de un óvulo recientemente fecundado de *Ascaris lumbricoides*, en el que se ve la capa vitelina (VL), capa quitinosa (CL), citoplasma denso cortical particulado (DC) y numerosas gotas de lípidos (LD). El núcleo femenino (FN) se encuentra cerca de la superficie y algunos gránulos refrigerantes (RG) han emigrado justamente por debajo del citoplasma cortical. Después de su salida el contenido de los gránulos refrigerantes constituirá la capa de lípidos (por Foor, 1967).

La formación de las capas de la cubierta de los huevos ha sido estudiada mejor en *Ascaris*, pero al parecer el proceso es similar en otros nemátodos. Justamente después de la penetración del esperma, una nueva cubierta se forma junto a la original; la cubierta vieja viene a formar la capa vitelina y se separa del citoplasma periférico, el cual se contrae, dejando un espacio dentro del cual se forman las capas quitinosas. Los cuerpos refringentes que previamente están dispersos en el citoplasma migran a la periferia y arrojan su contenido, el cual, al fundirse, forma la capa de lípidos. La función de la llamada capa quitinosa es probablemente de soporte o estructural y también contiene proteínas; la proporción de quitina presente varía entre los grupos desde gran cantidad -ascáridos, oxiúridos- a muy poca -estrongílidos- (Foor, 1967; Schmidt y Roberts, 1984).

La resistencia a la desecación y la penetración de sustancias polares se la confiere la capa de lípidos. Al menos en *Ascaris*, esta capa está compuesta del 25 % de proteínas y 75 % de **ascarósidos**. Los ascarósidos son glucósidos muy interesantes y únicos (compuestos con azúcar y alcohol unidos por un puente glucosídico). En los ascarósidos, el azúcar es **ascarilosa** (3, 6-didesoxy- L - arabinohexosa), y los alcoholes son una serie de manoles y dioles secundarios que contienen de 22 a 37 átomos de carbono. Los ascarósidos hacen que la cubierta del huevecillo sea virtualmente impermeable a todas las sustancias que no sean gases o solventes de lípidos (Schmidt y Roberts, 1981)

En particular, el huevo de *Ascaris suum* (fig. 4) está compuesto de una membrana interna lipo-proteica (compuesta por ascaril alcohol más nueve aminoácidos), que actúa como una barrera impermeable, la cual protege a los huevos de posibles daños químicos; una membrana quitinosa intermedia, que le confiere sostén y resistencia a daños mecánicos y una tercera membrana externa proteica (compuesta por 16 aminoácidos), muy resistente a pepsinas, tripsina, etc. (Hinck, 1972).

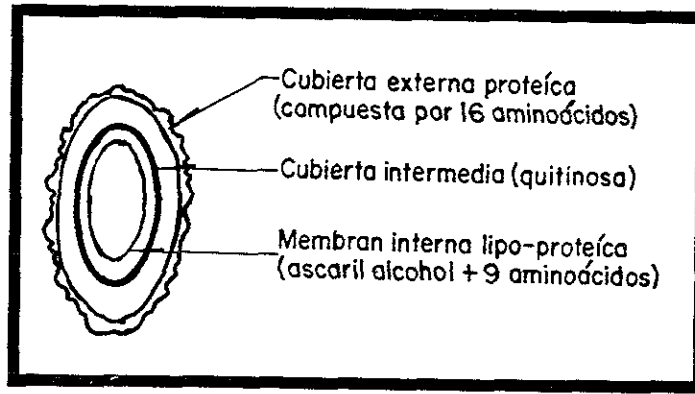


FIGURA 4. Estructura de la cubierta de los huevos de *Ascaris suum*

2.2.1 Formas de los huevos de *Ascaris lumbricoides* y *Ascaris suum*

Se reconocen en general cuatro formas de huevos (fig. 5, 6 y 7):

a) Huevo fértil normal

Este es un huevo ancho y oval que mide de 45 a 70 por 35 a 50 μm , con una cubierta externa proteica uterina o mamelonada, albuminosa, que sirve como barrera auxiliar contra la permeabilidad, la cual puede faltar; dicha cubierta está teñida de color pardo por los pigmentos biliares, y es secretada por la pared uterina. Al microscopio, esta capa mamelonada da la impresión de estar festoneada. El huevo propiamente dicho tiene una capa gruesa, transparente, hialina con cubierta externa, que actúa como estructura de sostén y otra interna, vitelina, delicada, lipoidal, muy impermeable. En la oviposición, la cubierta contiene una masa ovoide de protoplasma no segmentado, densamente impregnada con gránulos de lecitina (Brown y Belding, 1965; Lambert, 1975; Schmidt y Roberts, 1984; Salazar y De Haro, 1986).

b) Huevos fértiles descorticados

Son los que han perdido su gruesa cubierta albuminosa exterior y la cubierta interior se hace visible con un color amarillento que le da también los pigmentos biliares. (Lambert, 1975; Salazar y De Haro, 1986).

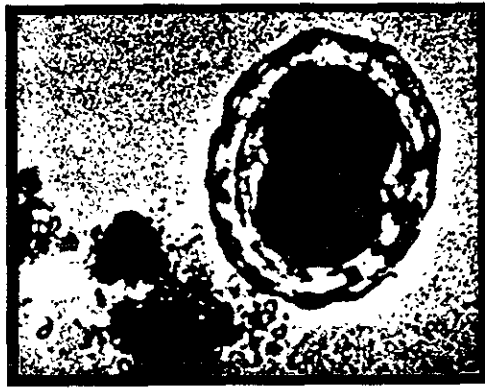


FIGURA 5. Huevo fecundado de *Ascaris lumbricoides* de las materias fecales humanas, mide de 70 de largo por 50 μm de ancho (Fotografía por Robert E. Kuntz, citado por Schmidt y Roberts, 1984).

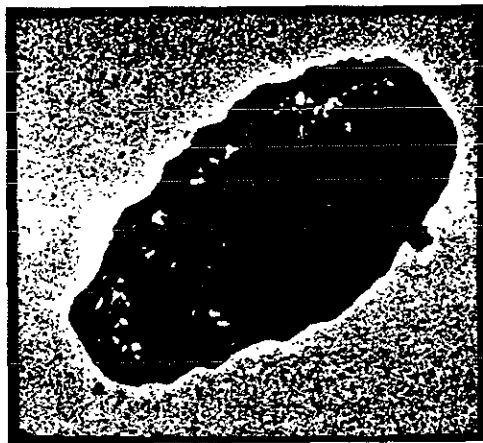


FIGURA 6. Huevo no fecundado de *Ascaris lumbricoides* de las materias fecales humanas, miden 80 de largo por X 40 μm de ancho (Fotografía por Robert E. Kuntz, citado por Schmidt y Roberts, 1984).

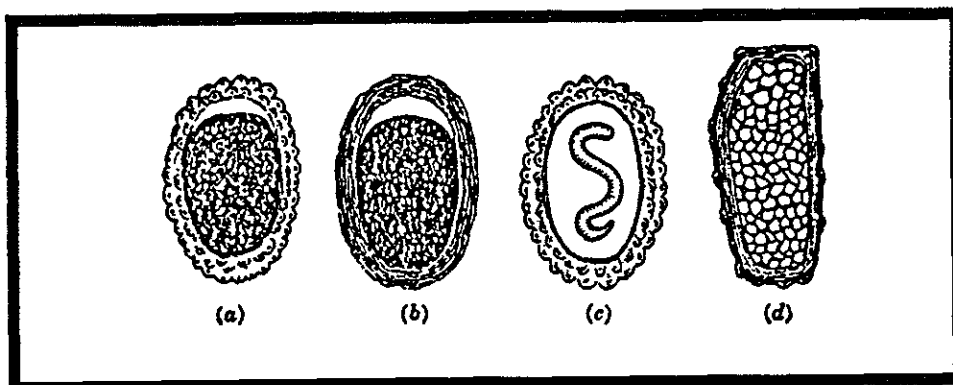


FIGURA 7. Huevos de *Ascaris*: a) normal; b) decorticado; c) con embrión; d) no fértil.

c) Huevo con embrión

La masa embrionaria, que no está segmentada en los huevos recientemente expulsados, puede segmentarse si pasa algún tiempo; se pueden encontrar larvas y éstas mostrarán movimientos (Lambert, 1975; Salazar y De Haro, 1986).

d) Huevos no fertilizados

Son más largos y más angostos que los fértiles. Miden aproximadamente 90 X 40 μm . Tanto la capa externa albuminoidea como la interior son más delgadas, mientras que el material embrionario es una masa amorfa que llena por completo el espacio circundado por la cubierta. También hay huevos de aspectos caprichosos, sin cubierta albuminosa y con cubiertas irregulares anormalmente extensas. Los huevos no fértiles son difíciles de identificar y pueden pasar inadvertidos (Brown y Belding, 1965; Lambert, 1975; Schmidt y Roberts, 1981; Schmidt y Roberts, 1984; Salazar y De Haro, 1986).

2.2.2 Resistencia a la acción de agentes químicos

La resistencia de los huevos de *Ascaris* a la acción de los agentes químicos es casi legendaria. La membrana vitelina que encierra al embrión, presenta lípidos insaponificables y consiste principalmente de ascaril alcohol, lo que la hace altamente impermeable y muy resistente a desinfectantes químicos; pueden soportar la inmersión transitoria en agentes químicos enérgicos. Sobreviven meses en albañales o aguas negras. Se ha observado que no son afectados por algunas sales de agentes óxido-reductores, ácidos y bases (Fairbairn y Passey, 1955; Brown y Belding, 1965). Pueden embrionar con éxito en formol al 2 % y 5 % (Odda y Jiménez, 1987), en bicromato de potasio y en soluciones al 50 % de ácido clorhídrico, nítrico, acético y sulfúrico, entre otras sustancias inhóspitas similares. El efecto del dióxido de carbono en la inducción de la eclosión del embrión encapsulado de los gusanos intestinales es un fenómeno común que se ha demostrado en siete especies de *Ascaris* (Schmidt y Roberts, 1981; Schmidt y Roberts, 1984). No obstante se ha visto que la membrana vitelina se disuelve en cloroformo y solventes similares (Fairbairn y Passey, 1955 y Fairbairn, 1961).

Aunque los huevos son extremadamente resistentes a las bajas temperaturas, humedad, cambio de suelo, fertilizantes, lavado de alimentos contaminados y agentes químicos poderosos, la embrionación se retarda por dichos factores. La luz del sol y las temperaturas elevadas son letales en corto tiempo (Schmidt y Roberts, 1981; Schmidt y Roberts, 1984; Odda y Jiménez, 1987). Son destruidos por la luz solar directa en 15 horas y por temperaturas superiores a 40 °C, persistiendo sólo una hora a 50 °C. La exposición de 8 a 12 °C, carece de efectos sobre los huevos de *Ascaris*, que en el suelo pueden sobrevivir las temperaturas congelantes ordinarias de invierno (Brown y Belding, 1965). Los huevos larvados de *Enterobius vermicularis* permanecen viables durante más tiempo a una temperatura que oscile entre 4 y 44 °C (Alvarez-Chacón *et al.*, 1985).

2.3 Características generales de los colorantes.

2.3.1 Clasificación de los colorantes

Los colorantes se clasifican en dos grandes grupos atendiendo a su origen: colorantes naturales y colorantes artificiales. El primer grupo es de poca importancia ya que en la actualidad la mayor parte de estos colorantes son preparados artificialmente. El segundo grupo comprende casi el total de los colorantes biológicos usados en las técnicas microscópicas y se agrupan bajo la denominación de "colorantes de la hulla" (Murillo, 1981).

2.3.2 Teoría de la tinción

Se han formulado diversas teorías, unas de carácter físico, otras de carácter químico, sobre las formas cómo penetran los colorantes a los tejidos y cómo se fijan en ellos. La penetración del colorante por ósmosis es generalmente admitida. El problema se presenta al tratar de explicar cómo se fija el colorante a los tejidos. La teoría física trata de explicar este hecho recurriendo al fenómeno de adsorción (propiedad que poseen los cuerpos sólidos de atraer hacia ellos partículas minúsculas de materia del líquido que lo rodea, estas partículas pueden ser compuestos o iones). Así, en esta forma, se incorpora el colorante a las diversas partes del tejido, no sólo

en la tinción simple, sino que también en la tinción diferencial, ya que existe una adsorción selectiva (Bavink, 1977; Ham y Cormack, 1985; Murillo, 1981).

La teoría química, en términos generales, establece que tiene lugar una unión química entre el colorante y los elementos constituyentes del tejido. El principio fundamental que involucra esta teoría es que ciertas partes de la células tienen carácter ácido y por lo tanto tendrán afinidad por los colorantes básicos, en tanto que en otras partes son de carácter básico y por consiguiente presentan afinidad para los colorantes ácidos; por ejemplo: el núcleo de las células es de carácter ácido y se tiñe con los colorantes básicos; en cambio, el citoplasma tiene reacción alcalina y se tiñe con colorantes ácidos (Hazen *et al.*, 1985; Ham y Cormack, 1985; Weiss, 1986).

Los colorantes básicos o catiónicos que se emplean con más frecuencia son el azul de metileno, el azul de toluidina, la fucsina básica, el carmín y la hematoxilina. La eosina, el naranja G, la floxina, el azul de anilina y el verde claro son los colorantes ácidos o aniónico más comunes.

Tanto la teoría química como la física tienen su pro y su contra, por lo que un grupo de investigadores admiten que el fenómeno de tinción, es un fenómeno físico-químico, es decir, en un gran número de casos es imposible separar la acción física de la acción química.

También se dice que para que una sustancia sea materia colorante, depende de la presencia de ciertos grupos "cromógenos" en la molécula y además, de la acumulación de anillos y núcleos en la misma; los cromógenos son ciertos grupos que contienen nitrógeno como los NO_2 , $-\text{N}=\text{N}-$, y también los enlaces dobles entre dos carbonos $\text{C}=\text{C}$. Un cromógeno, a pesar de ser un cuerpo colorido, no puede considerarse como colorante de tinción, si no posee afinidad por las fibras o por los tejidos. Para que un colorante se considere apto para la tinción, debe contener además del grupo cromóforo, otro que le imparta propiedades de electrólito, estos grupos auxiliares se denominan *auxocromos*. Los auxocromos introducidos en la molécula le comunican un carácter ácido o básico y, con ello, la facilidad de reacción suficiente para que pueda combinarse con la fibra o con la sustancia que constituye el mordente. Los auxocromos pueden dar un carácter ácidos introduciendo un radical OH y un carácter básicos introduciendo un radical NH_2 (Bavink, 1977; Murillo, 1981).

Por ejemplo: el trinitro benceno es cromógeno, pero no colorante de tinción, éste no se disocia iónicamente; pero si al trinitrobenceno se le introduce un OH, se obtiene una substancia ionozable de carácter ácido llamada ácido pícrico, que sí es colorante de tinción (**fig. 8**).

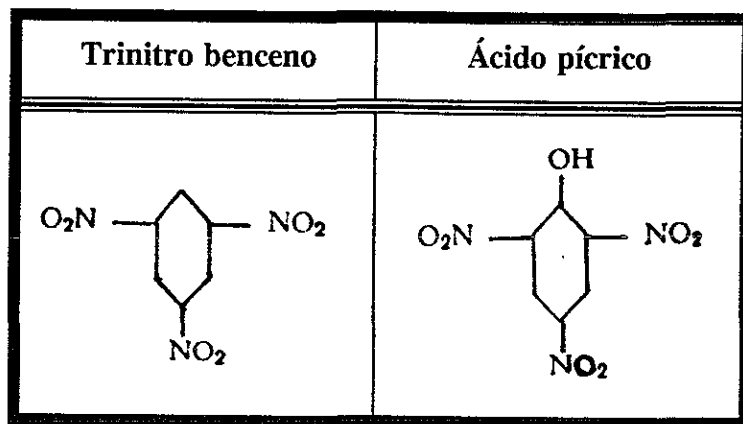


FIGURA 8. Estructura química del trinitro benceno y del ácido pícrico

El compuesto $C_6H_5-N=N-C_6H_5$ recibe el nombre de **azobenceno**, este compuesto contiene un cromógeno y varios núcleos, pero le falta un auxocromo, y a pesar de ser una materia de color rojo brillante, no sirve para teñir a menos que se le introduzca un radical amino (**Zollinger, 1987**).

Los colorantes orgánicos azoicos están compuestos principalmente por $-N=N-$ (el nitrógeno recibe también el nombre de ázoe, del griego a= partícula negativa, y zo= yo vivo); su uso principal es el teñido de fibras textiles y tejidos. El colorante se adhiere a una fibra ya sea por enlaces de hidrógeno o por enlace iónico (**Morrison y Nelson, 1979**).

La capacidad de coloración se aprecia más fácilmente en relación con la naturaleza química de las proteínas. Una proteína es un polímero de una variedad de aminoácidos: es anfotérica porque ciertos grupos laterales son ácidos, ya que algunos de los residuos contienen funciones químicas adicionales (por ejemplo grupos fenólicos, o carboxilos, etc.) y otros poseen funciones catiónicas (por ejemplo, amino, amidazol o guanidina). La proteína puede actuar como un anión o un catión, lo cual depende de la suma algebraica de sus cargas positivas y negativas, muchas veces la fijación aumenta la afinidad por los colorantes, ya que libera grupos secundarios que pueden

combinarse con las moléculas del colorante.

2.4 Características específicas de algunos colorantes biológicos

2.4.1 Características del colorante Azul Tripán.

El Azul Tripán se encuentra entre los colorantes azoicos sustantivos o derivados de otros colorantes, su estructura química se muestra en la **figura 9** (Zollinger, 1987), ha tenido un interés especial como agente quimioterápico para combatir enfermedades producidas por los protozoos, utilizándose en los compuestos medicinales o colorante para histología, también se ha usado como colorante vital (colorante que tiñe células vivas) para teñir parásitos sanguíneos, huevos de helmintos, para ver la permeabilidad de vasos o venas capilares y para calcificar abolladuras de huesos (Victor y Cowdry, 1964; Morrison y Nelson, 1979).

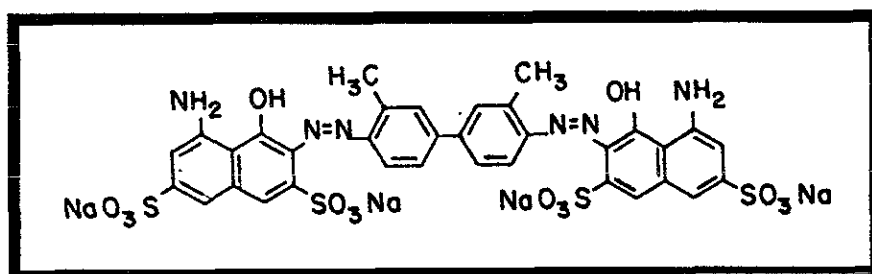


FIGURA 9. Estructura química del Azul Tripán

2.4.2 Características del Rojo Congo

Es un colorante sintético capaz de teñir el algodón directamente; representa el prototipo del grupo de colorantes sustantivos, tiene una absorción máxima de 497 nm (4970 °Å); su estructura química se observa en la **figura 10**; se prepara fácilmente a partir de bencidina diazoada y ác. naftiónico. Es un compuesto azoico utilizado como indicador, ya que cambia de color con el pH, es azul en medio ácido y rojo en solución básica, también se le ha empleado como colorante vital. Tiene un peso molecular muy elevado, lo cual le confiere propiedades coloidales, quedando fijado a la fibra por un proceso de adsorción (Morrison y Nelson, 1979).

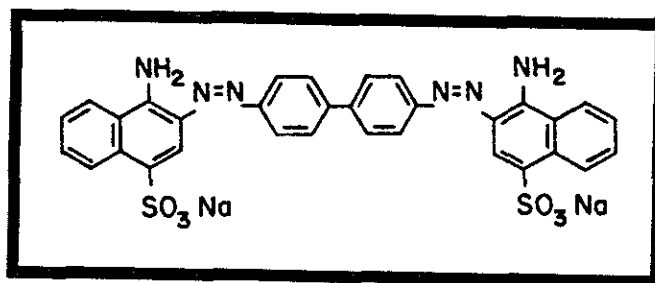


FIGURA 10. Estructura química del Rojo Congo

2.4.3 Características de la Eosina "Y"

La **Eosina Y** es un colorante ácido, muy soluble en el agua y poco soluble en el alcohol; es un tinte aniónico hidroxí-xanteno, tiene una absorción máxima de 538 nm (ver su estructura química en la **figura 11**). Se emplea para teñir las paredes celulósicas, como colorante citoplásmico, se considera un buen colorante vital (Murillo, 1985; Stockert *et al.*, 1994). La eosina confiere un color rosado a rojo, generalmente a los componentes que no aceptan mucho la hematoxilina. El color en la eosina, por otra parte, depende del radical aniónico (que lleva carga negativa). Los componentes acidófilos tienen cargas catiónicas (positivas) suficientes para conjugar los aniones de color de la eosina (Ham y Cormack, 1985).

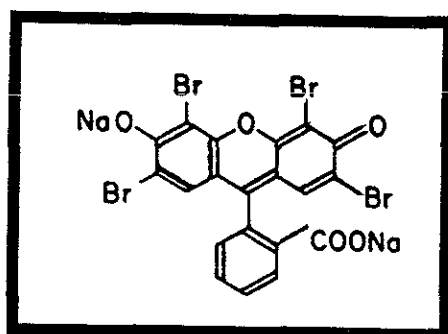


FIGURA 11. Estructura química de la Eosina "Y"

2.4.4 Características de la solución Lugol

El lugol es una solución acuosa compuesta de yoduro de potasio (KI) y yodo en polvo (I), se utiliza para preservar muestras, evitar posibles daños a especies cuya constitución sea delicada,

para diagnosticar especies microscópicas, teñir quistes de protozoarios, etc. El yodo del lugol tiñe las estructuras internas de los huevos de helmintos y quistes de protozoarios revelando detalles que no son vistos en las preparaciones sin teñir (Lambert, 1975; Lambert, 1976). Los huevos de helmintos se tiñen de un color que varía de amarillo brillante al café pardo; con lugol adquieren una tonalidad pardo más oscuro. Se recomienda utilizar una solución iodada débil, una solución demasiado fuerte puede oscurecer los microorganismos (Salazar y De Haro, 1986, Shore y Ash, 1987).

2.4.5 Características de la Hematoxilina

La hematoxilina es un colorante básico; como se extrae de su fuente natural (la madera rojo pardusca del palo del árbol de Campeche - *Haematoxylin campechanum* -, nativo de México y América Central) es colorante débil, su estructura química se muestra en la **figura 12**. Cuando se "maduran" extractos de hematoxilina se forma otro colorante llamado hemateína, que es el agente de tinción en las soluciones de la hematoxilina. Sin embargo, la hemateína no es un colorante muy eficaz a menos que se utilice en combinación con lo que se llama mordente, que en este caso es un ion metálico. Cuando se emplea el ion Al^{+++} el complejo formado se llama *hemalum* o *hematoxilina* y *alumbre* y presenta un color púrpura muy intenso. Este colorante se le ha empleado principalmente como colorante vital, para teñir tejidos, componentes nucleares como la cromatina y nucléolos, el DNA y RNA (Ham y Cormack, 1985).

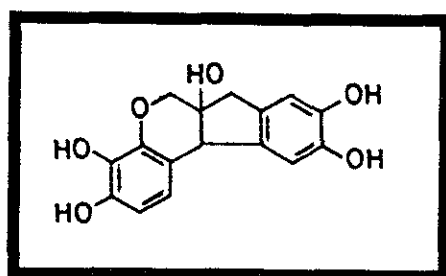


FIGURA 12. Estructura química Hematoxilina

2.4.6 Características de la Safranina

Este colorante pertenece a un grupo muy pequeño que se designan como sales de fenilfenazonio,

tiene una absorción máxima de 530 nm (5300 °Å); su estructura química es la que corresponde a la **figura 13**. La safranina da un color rosa vivo; se prepara oxidando una mezcla de p-toluiden-diamina, o-toluidina y anilina. Se considera un buen colorante vital (Fieser y Fieser, 1980).

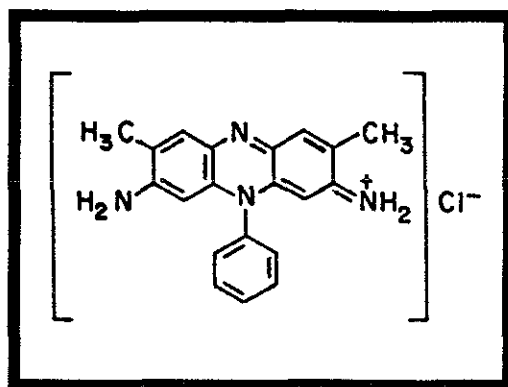


FIGURA 13. Estructura química de la Safranina

2.4.7 Características del Verde de Metilo

Es un colorante básico, con una absorción máxima de 673 nm, fue empleado por primera vez por Heine en 1895, para diferenciar los ácidos nucleicos de las nucleoproteínas (Estrada et al., 1982). En la actualidad se usa para teñir telas y para tintes biológicos, y también como colorante vital su estructura química es la que se observa en la **figura 14** (Merck Index, 1990).

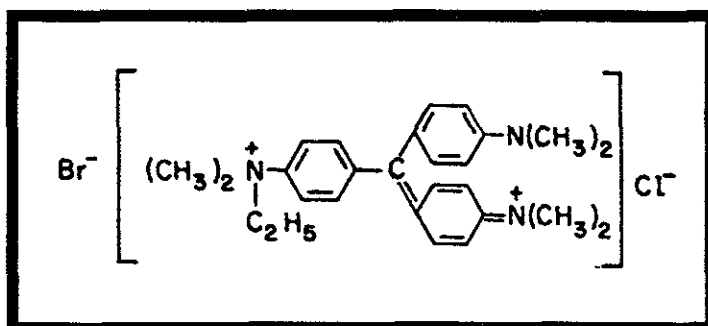


FIGURA 14. Estructura química del verde de Metilo

2.4.8 Características del Azul de Metileno

Es un colorante básico soluble en agua y en alcohol, presenta una absorción máxima de 6678 a 6993 $\text{\AA}$ (667 a 699 nm); su estructura química se muestra en la **figura 15**; es comúnmente utilizado como colorante nuclear; en histología se le ha utilizado para teñir frotis, es un colorante vital empleado para diferenciar los tejidos del sistema nervioso central, en bacteriología se le ha empleado para diferenciar bacterias (Estrada *et al.*, 1982; Weiss, 1986).

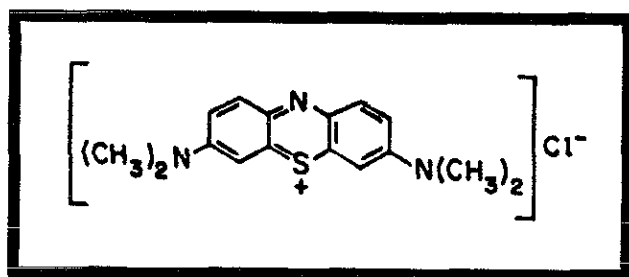


FIGURA 15. Estructura química del Azul de Metileno

3. ANTECEDENTES

Los estudios epidemiológicos de las aguas residuales en México y en otros países, han evidenciado que existen riesgos en la salud pública debido a infecciones gastrointestinales; principalmente las ocasionadas por helmintos (Stien y Schwartzbrod, 1990; Shuval 1991; Ayres *et al.*, 1992; Blumenthal *et al.*, 1992; Gaspard y Schwartzbrod, 1993; Blumenthal *et al.*, 1996). Esto pone de manifiesto la necesidad de legislar el contenido de huevos de helmintos en las aguas destinadas para riego, por lo que la Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-003-ECOL de 1993 y la Norma vigente NOM-001-ECOL-1996, establecieron los límites permisibles del contenido de huevos de helmintos en aguas para riego. Con el fin de proteger a la salud pública y para eliminar las restricciones que marcan las normas, existe una gama muy amplia de opciones que incluyen métodos físicos, químicos, biológicos y sus combinaciones. La selección de cualquiera de ellos deberá tomar en cuenta las características de estas formas infectivas, como son su gravedad específica (1.056 a 1.238), su tamaño (30 a 80 μm), las propiedades adherentes de su superficie y su resistencia a las condiciones adversas del entorno (Stein y Schwartzbrod, 1988).

Hasta el momento, los métodos de tratamiento con los que se obtiene un efluente que cumple con las normas mexicanas son sedimentación, filtración, floculación/coagulación y lagunas de estabilización (Shephard, 1987; Ayres *et al.*, 1992 y Ayres *et al.*, 1993). Sin embargo, estos procesos sólo transfieren los huevos de helmintos de la fase líquida a una fase sólida, sin destruirlos ni afectar su viabilidad, es decir, la capacidad para desarrollarse hasta la etapa infectiva. Son muy pocos los métodos que se han desarrollado en torno a determinar la viabilidad de los huevos de helmintos. Dado que es precisamente esta característica el factor de riesgo en la transmisión de helmintiasis por el uso de aguas residuales en el riego, es muy importante determinarla, aún cuando la norma vigente ya no exija su medición.

Para tal fin, se dispone de dos procedimientos: a) embrionamiento *in vivo*, que consiste en inocular animales de experimentación, como conejos, con los huevos de helmintos, esperar el tiempo requerido para el desarrollo de los embriones y después disectar los animales para observar las larvas en los órganos donde se establecen y b) embrionamiento *in vitro*, que consiste

en colocar los huevos de helmintos en un soporte, incubar durante el tiempo requerido revisando diariamente el desarrollo para determinar cuántos alcanzan el estadio infectante (Hass y Todd, 1962; Hinck e Ivey, 1976; Meyer, 1978; Hubert and Kerboeuf, 1984; Ayres *et al.* 1993 ; Sttot *et al.* 1994; Stien y Schwartzbrod, 1988). La técnica de embrionamiento *in vitro* ha sido usada para determinar la viabilidad de *Ascaris lumbricoides*, *A. suum*, *Trichuris* sp, *Toxocara* sp. e *Hymenolepis diminuta*. La mayoría de trabajos se han enfocado a determinar la viabilidad de *Ascaris lumbricoides* y *Ascaris suum* (Stien y Schwartzbrod, 1988).

Estos métodos de embrionamiento requieren de un tiempo de aproximadamente 21 días (según el ciclo vital de las distintas especies de helmintos) para obtener los resultados y además que el embrionamiento *in vivo* necesita infraestructura material y humana bastante especializada; por lo tanto, no son muy recomendables para aplicarse de manera rutinaria para el análisis de las aguas.

Una opción puede ser el uso de colorantes para determinar la viabilidad potencial de los huevos de helmintos, ya que de acuerdo con su fisiología y morfología, los huevos viables conservan su impermeabilidad y por lo tanto no aceptan el colorante (Meyer, 1978; Zhou *et al.*, 1985).

Buitrón y Galván (1997), para evaluar el proceso de compresión/descompresión sobre la estructura de los huevos de helmintos, en especial de *Ascaris suum*, emplearon la técnica de incubación paralelamente con la tinción con Azul Tripán. En este caso se observó que los huevos teñidos se desintegraron con el tiempo al igual que los incubados (sin tinción), por lo que no se pudo ver claramente si los huevos se desintegraron por el proceso de compresión/descompresión o por la aplicación del colorante.

Debido a que los trabajos al respecto son muy escasos y se tienen dudas sobre la factibilidad de su aplicación, se estima necesario dilucidar si es conveniente utilizar colorantes en sustitución del procedimiento de incubación para determinar viabilidad potencial de los huevos de helmintos presentes en aguas para riego. Esto disminuiría el tiempo de análisis, permitiendo no sólo informar la cantidad de huevos presentes, sino también simultáneamente si constituyen un riesgo y de qué magnitud.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue:

Determinar la factibilidad de utilizar tinción con los colorantes: Eosina "Y", Azul Tripán, Lugol, Rojo Congo, Hematoxilina, Safranina, Verde de Metilo, y Azul de Metileno para evaluar la viabilidad potencial de los huevos de helmintos, en substitución del método de incubación *in vitro*.

Los objetivos secundarios fueron:

- a) Analizar cualitativamente las interferencias de cada uno de los colorantes con los huevos de helmintos.
- b) Probar la técnica de tinción para determinar la viabilidad potencial de los huevos de helmintos en aguas residuales crudas y tratadas por los tres procesos convencionales de tratamiento que integran la Planta de Tratamiento de la Universidad Nacional Autonoma de México.

5. METODOLOGÍA

Para cumplir con cada uno de los objetivos, la metodología se dividió en tres fases: la primera consistió en estudiar y analizar cualitativamente, mediante ensayos exploratorios, las posibles interferencias de los colorantes con los huevos de *Ascaris suum*, con los reactivos empleados en el método de extracción de los mismos y con los reactivos empleados en el método de incubación *in vitro*; la segunda fase, con base en los resultados de la primera, se enfocó a evaluar con ensayos formales si existía relación entre la tinción y la viabilidad, y posteriormente en la tercera fase se probó la técnica desarrollada para determinar la viabilidad de los huevos de helmintos en aguas residuales crudas y tratadas.

Es importante aclarar que la viabilidad estrictamente hablando se refiere a la capacidad de un huevo para desarrollarse en el medio hasta la etapa infectante, y que este desarrollo puede verse interrumpido por varios factores, de tal suerte que no todos los huevos que son viables a la oviposición alcanzan la etapa infectante. Por esta razón y para evitar conflictos conceptuales, es conveniente que la viabilidad determinada por el método de tinción que se presenta en este trabajo, se le denomine "viabilidad potencial", sin que por ello disminuya su importancia epidemiológica.

5.1 Ensayos exploratorios

El trabajo de investigación se inició con la recolección de hembras grávidas de helmintos con la finalidad de obtener una suspensión de huevos frescos para la experimentación. Para manejar de manera segura dicho material en el laboratorio, se decidió trabajar con huevos de *Ascaris suum* ya que, aunque son morfológicamente iguales a la especie de los humanos (*Ascaris lumbricoides*), tienen la particularidad de ser específicamente infectantes para los cerdos y, en la mayoría de los casos, no infectantes para los humanos. La recolección de hembras se hizo a través de una búsqueda minuciosa en los intestinos delgados de cerdos sacrificados en diferentes rastros localizados en el Edo. de México, Puebla y Morelos y en la Facultad de Veterinaria de la UNAM.

Las hembras grávidas se conservaron en solución salina isotónica para transportarlas al laboratorio, en donde se sometieron a disección para extraer los úteros grávidos, de los cuales se obtuvieron los huevos por maceración, filtración y lavados, y se conservaron en solución salina y en refrigeración. Esta metodología se describe en el **ANEXO I**.

Con la suspensión de huevos se efectuaron ensayos exploratorios para determinar tres aspectos importantes: 1) si se fijaban los diferentes colorantes; 2) si las muestras debían ser teñidas permanentemente, o 3) si era mejor teñir las muestras cada vez que se hicieran las observaciones del desarrollo embrionario de los huevos; para esto se incubaron, durante un mes, muestras teñidas desde el inicio de la incubación y otras que se teñían cada semana.

También se efectuaron pruebas para detectar las posibles interferencias de los colorantes con los reactivos empleados en la preparación de la suspensión de huevos de helmintos y en el procedimiento de incubación *in vitro* para determinar viabilidad (última parte de la técnica de la **US EPA**, que fue propuesta en el proyecto de NOM-001-ECOL-1996 publicado el 24 de junio de 1996, descrita en el **ANEXO II**).

5.2 Ensayos formales

Para los ensayos formales, se prepararon unidades experimentales, según lo recomendado por **Fairbairn (1961)**, **Hass and Todd (1962)**, **Hinck and Ivey (1976)** y **US EPA (1992)**, de la siguiente manera: a cada uno de 9 tubos de centrífuga de 1.5 ml se le añadió 0.8 ml de solución salina isotónica (NaCl al 0.85%), 0.1 ml ácido sulfúrico 0.1 N (para disminuir la posible interferencia bacteriana) y 0.1 ml de una suspensión de huevos cuya concentración promedio fue de 500 huevos/0.1 ml.

Al inicio de la incubación, de cada unidad experimental se tomaron alícuotas de 0.1 ml y se colocaron en portaobjetos; a 7 de ellos se les adicionó 0.1 ml de una solución acuosa al 0.1 % del colorante biológico correspondiente; al octavo se le añadió la misma cantidad de Lugol parasitológico, que fungió como **testigo negativo** (puesto que tiñe indistintamente estructuras viables y no viables); al noveno no se le añadió ningún colorante, ya que se utilizó como **testigo**

positivo (este procedimiento constituye los "tratamientos").

Enseguida se determinó microscópicamente el número de huevos teñidos y sin teñir en cada preparación. Para los testigos positivo y negativo, se tomaron en cuenta las características morfológicas y la evolución del desarrollo embrionario de los huevos, con el fin de hacer la comparación entre estadio de desarrollo y penetración del colorante (tinción).

Una vez hechas las lecturas iniciales, se descartaron las preparaciones y las unidades experimentales se sometieron a incubación a 25 °C, en obscuridad y con agitación constante para mantener una adecuada aereación del cultivo, para facilitar el embrionamiento. Las subsecuentes lecturas se hicieron cada ocho días, cuatro veces más, siguiendo el mismo procedimiento y manteniendo las unidades experimentales en incubación entre una y otra lectura. Al final de la experimentación, se obtuvieron los datos sobre número de huevos teñidos y no teñidos de cinco observaciones para cada unidad experimental. En la **tabla 2** se resumen las características bajo las cuales se realizaron los experimentos.

5.2.1 Diseño experimental estadístico

Para propósitos del análisis estadístico de los resultados, se efectuaron 5 réplicas de cada uno de los 9 tratamientos, lo que dio como resultado un total de 45 muestras por ensayar. El número que se le designó a cada tratamiento y a sus réplicas correspondientes se muestra en el **tabla 3**.

TABLA 2. VARIABLES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES SELECCIONADAS.

VARIABLES DE CONTROL	
Tiempo total de incubación	30 días
Temperatura de incubación	25 °C
Obscuridad	Constante
Aireación	diaria
Concentración de la suspensión de huevos	500 huevos en 0.1 ml (aproximadamente)
Muestras testigo	Preparadas con solución salina más ácido sulfúrico 0.1 N sin teñir.
Muestras teñidas	Igual que el testigo más teñidas con Azul Tripán, Eosina "Y", Rojo Congo, Hematoxilina, Safranina, Verde de Metilo, Azul de Metileno y Lugol (al 0.1 %).
Periodicidad de medición de cada unidad experimental	Al inicio y posteriormente cada ocho días durante un mes
VARIABLES DE RESPUESTA	
No. de huevos teñidos	
No. de huevos no teñidos	
No. de huevos viables	
No. de huevos no viables	

TABLA 3. NÚMERO ASIGNADO A LOS TRATAMIENTOS Y RÉPLICAS EXPERIMENTALES

No.	TRATAMIENTO	Número asignado a las réplicas				
		I	II	III	IV	V
1	Testigo	1	2	3	4	5
2	Azul Tripán	6	7	8	9	10
3	Rojo Congo	11	12	13	14	15
4	Lugol	16	17	18	19	20
5	Eosina "Y"	21	22	23	24	25
6	Hematoxilina	26	27	28	29	30
7	Verde de metilo	31	32	33	34	35
8	Safranina	36	37	38	39	40
9	Azul de Metileno	41	42	43	44	45

No. Número asignado a cada tratamiento

Los experimentos de cada una de las 5 réplicas por tratamiento se realizaron de manera aleatoria, como se muestra en la tabla 4.

TABLA 4. REGISTRO DEL ORDEN ALEATORIO EN QUE SE EVALUARON LAS RÉPLICAS DE LOS TRATAMIENTOS

ORDEN DEL PROCEDIMIENTO (5 réplicas)				
I	II	III	IV	V
43	9	32	16	3
26	31	11	37	36
44	18	22	5	24
30	41	6	14	45
1	12	34	15	13
21	7	29	27	20
38	17	42	35	33
40	10	28	2	8
4	23	39	19	25

5.2.2 Métodos estadísticos aplicados

Para el análisis estadístico de los resultados se hicieron dos consideraciones, una en la que se tomó en cuenta tanto la variación entre los tratamientos como la capacidad de los huevos de impedir o permitir la fijación de los diferentes colorantes y en la otra sólo se tomaron en cuenta los resultados de los huevos viables dada su importancia sanitaria.

Para la primera consideración, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para una clasificación doble, con el fin de determinar la variación entre los tratamientos y entre las características de los huevos viables y no viables. Para este análisis, se planteó un doble juego de hipótesis, que se probaron usando la prueba de Fisher (F):

- a) Para determinar la variación entre los tratamientos:

Ho: Los diferentes tratamientos son igual de confiables para determinar huevos viables y no viables.

Ha: Los diferentes tratamientos utilizados muestran variación de resultados para determinar huevos viables y no viables, o al menos dos tratamientos dan resultados diferentes.

b) Para determinar la variación del número de huevos viables y no viables en relación con los colorantes:

Ho: No existe diferencia significativa en cuanto a la cuantificación y comportamiento de los huevos viables y no viables frente a los colorantes.

Ha: Se presentan diferencias significativas en la cuantificación de huevos viables y no viables.

Para el análisis estadístico de la segunda consideración se planteó un análisis de varianza para una clasificación simple, cuyas hipótesis también se probaron mediante la prueba de F y fueron:

Ho: Los colorantes vitales se pueden emplear para determinar la viabilidad de huevos de helmintos al igual que la técnica de incubación *in vitro*.

Ha: No todos los colorantes sirven para determinar la viabilidad de los huevos de helmintos.

Sin embargo, dado que por el tipo de experimentación de que se trata, no es posible controlar todos los factores que pueden influir en el comportamiento de los colorantes, se decidió aplicar también la prueba de Tukey para obtener información más específica que la prueba de F no proporciona. Para la prueba de Tukey se utilizaron las mismas hipótesis ya planteadas.

5.3 Aplicación del método de tinción a muestras naturales

Para cumplir con el tercer objetivo del trabajo se aplicó el método de tinción para evaluar la viabilidad de los huevos de helmintos presentes en aguas residuales y tratadas, para establecer

la factibilidad de su uso en muestras naturales que contienen una variedad de sustancias que no están presentes en las muestras experimentales con las cuales se desarrolló el método inicialmente.

Debido a que el número de huevos de helmintos suele ser pequeño en aguas naturales, residuales y tratadas (dado que no es su hábitat natural), para poder hacer un análisis cualitativo o cuantitativo de estos organismos, es necesario primero concentrarlos y luego separarlos de dichas aguas. Para tal fin se dispone de varios procedimientos, entre ellos uno desarrollado por la **US EPA** en 1992 que fue incorporado en nuestra legislación como procedimiento norma en la **NOM-001-ECOL-1996** que entró en vigor en enero de 1997.

Sin embargo, como en este procedimiento se aplican los reactivos sulfato de zinc, alcohol-ácido, ácido sulfúrico y éter etílico, que pudieran presentar interferencias con los colorantes, se realizaron varios análisis exploratorios para definir su factibilidad de uso.

Primero se analizaron muestras del agua residual cruda influente de la Planta de Tratamiento de la Universidad Nacional Autónoma de México (**PT-UNAM**) así como de los efluentes de sus sistemas de lodos activados, biodisco y filtro rociador.

Se procesaron dos muestras de cada sistema de tratamiento de la siguiente manera: una muestra se analizó por la técnica **norma** tal como es (detallada en el **ANEXO II**) y la otra por la misma técnica pero dividiendo el concentrado final en 8 alícuotas de 0.1 ml, colocándolas en portaobjetos y añadiendo a cada una, uno de los 8 colorantes por probar.

Debido a que con este procedimiento no se detectaron huevos de helmintos en ninguna muestra (ni aún en el agua cruda) y a que se observó disgregación de los colorantes por los reactivos ya mencionados, se decidió aplicar la **técnica de Filtración /transparentación de la membrana (F/TM)** desarrollada y calibrada en el Instituto de Ingeniería, UNAM (**Galván *et al.*, 1996**) la cual se detalla en el **ANEXO III**. Con este procedimiento sí se lograron determinar y cuantificar los huevos de helmintos y no se observaron interferencias de los colorantes con los reactivos de la técnica.

Estos resultados sirvieron de base para seleccionar el método **F/TM** para procesar un nuevo lote de muestras de agua residual cruda y efluentes de los sistemas de lodos activados, biodiscos y filtro rociador, de los sedimentadores secundarios de cada uno, del filtro de arena y del efluente final clorado de la **PT-UNAM**. En total se probaron nueve tipos de muestra con ocho colorantes cada una y haciendo tres repeticiones por muestra.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación cualitativa

Los ensayos exploratorios pusieron de manifiesto aspectos interesantes; por ejemplo, en ninguna de las unidades experimentales no teñidas (testigo), teñidas permanentemente o teñidas cada semana se detectó desarrollo embrionario de los huevos, aún cuando las observaciones se prolongaron por 45 días, que es el doble del tiempo estipulado en el procedimiento convencional de incubación *in vitro* (21 días), pero se observó que todos los colorantes impartían dos tonos de color a los huevos, fuerte y tenue.

La falta de desarrollo de los huevos, incluyendo los testigos se debió a que la hembra de *Ascaris suum* que se obtuvo para los primeros análisis no estaba fecundada o se encontraba en los inicios de la oviposición (ya que la mayoría de los huevos que se encontraron en esta hembra aproximadamente median 90 de largo por 40 μm de ancho, eran más largos y más angostos que los fértiles que miden de 45 a 70 por 35 a 50 según Schmidt y Roberts (1984), Salazar y De Haro (1986), por lo que es de suma importancia antes de hacer este tipo de análisis verificar los tamaños de los huevos ya que es la única manera de asegurar si hay huevos fértiles.

Por lo tanto, fue necesario recurrir a un nuevo lote de hembras grávidas para proceder con los ensayos, cuyos resultados indicaron que es indiferente teñir los huevos permanentemente o cada semana, ya que en ambos casos se observaron huevos bien teñidos y no teñidos. En cuanto a los testigos (muestras sin colorantes) se observó el desarrollo embrionario de algunos huevos (fotografías de la 1 a la 6), cuyo número era similar al número de huevos sin teñir en las muestras con colorantes. Esto se tomó como una primera indicación de que los huevos viables no fijan el colorante y todo huevo capaz de fijarlo es no viable, sin importar la intensidad con que el colorante es retenido.

De acuerdo con estos resultados, se decidió aplicar tinción cada vez que se fueran a hacer las observaciones. En cuanto a los ensayos formales, los resultados mostraron cualitativamente que todos los huevos fecundados potencialmente viables (huevos capaces de alcanzar la etapa

infectante, aunque su desarrollo puede verse interrumpido por varios factores) no se teñían con todos los colorantes empleados como se muestra en las **fotografías 7, 8, 9, 11, 12, 13 y 14 del anexo IV** (con excepción de los que se tiñeron con el Lugol -**fot. 10-**) y en un lapso de 8 a 15 días, el embrión se desarrolló hasta larva activa de primer y segundo estadio antes de salir a través de un abertura poco visible **fotografías 6 y 8**.

Al salir la larva del cascarón, éste se teñía inmediatamente y la larva se mantenía sin teñir (**fot. 8**). En el caso del Lugol las larvas se observaron bien teñidas e inmóviles dentro del huevo y nunca eclosionaron, debido a que este colorante es también fijador.

Así los huevos teñidos con los colorantes vitales se consideraron no viables y los no teñidos, viables. Estos resultados concuerdan con lo citado por Meyer (1978) y Zhou *et al.*, (1982), que demuestran que, de acuerdo con su fisiología y morfología, los huevos viables conservan su impermeabilidad y por lo tanto no aceptan los colorantes.

Con estas observaciones, que se ilustran en el **ANEXO IV** se puede decir que, desde el punto de vista cualitativo, todos los colorantes vitales empleados en este estudio son confiables para discriminar entre huevos viables y no viables.

6.2 *Tratamiento estadístico*

En la **tabla 5** se muestran los resultados de los experimentos de tinción realizados con muestras experimentales. Cada uno de los datos de las réplicas son el resultado de la suma de las cinco lecturas tomadas durante el tiempo de incubación.

Los resultados están expresados en términos del número de huevos que se tiñeron (considerados como no viables) y que no se tiñeron (considerados como viables). Para los casos del testigo (**testigo positivo**) y del Lugol (**testigo negativo**), se tomaron en cuenta las características morfológicas (como tamaños de los huevos, destrucción de una porción de la parte externa de la cubierta protéica y desintegración del huevo) y la evolución del desarrollo embrionario, características que fueron siguiéndose durante el proceso de incubación, considerando que los

huevos que presentaron desarrollo eran viables y los que no se modificaron a lo largo de las cinco semanas de incubación, como no viables.

De los resultados presentados en la **tabla 5** se tomaron los promedios de las cinco réplicas por cada tratamiento de los huevos teñidos, de los no teñidos, de los huevos desarrollados y no desarrollados y se agruparon en la **tabla 6**.

TABLA 5. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE TINCIÓN E INCUBACIÓN *IN VITRO* DE LOS HUEVOS DE *Ascaris suum*.

TRATAMIENTOS		Σ RÉPLICAS					$\bar{X}$
		I	II	III	IV	V	
Testigo	ND	365	363	370	327	340	353
	D	175	150	191	191	233	188
Azul Tripán	T	309	329	323	320	309	318
	N	128	122	118	122	140	126
Rojo Congo	T	296	272	310	244	248	274
	N	166	144	148	152	169	155
Lugol	ND	302	307	307	309	310	307
	D	155	148	161	151	200	163
Eosina "Y"	T	389	359	364	379	404	379
	N	160	144	155	164	167	158
Hematoxilina	T	367	335	358	340	408	361
	N	147	142	158	149	174	154
Verde de Metilo	T	275	287	285	262	266	275
	N	185	190	188	204	223	198
Safranina	T	311	287	286	313	263	292
	N	161	145	155	155	174	158
Azul de Metileno	T	298	316	308	316	347	317
	N	184	158	182	191	230	189

Σ RÉPLICAS = Suma de cinco lecturas de cada réplica tomada durante un mes de incubación *in vitro*; $\bar{X}$ = media de 5 réplicas; ND = huevos no desarrollados; D = huevos desarrollados; T = huevos teñidos (no viables); N = huevos no teñidos (viables).

De los datos mostrados en el **tabla 6**, se observa que de un total de 4366 huevos, los no viables son casi el doble de los viables; la desviación estándar es mayor en el caso de los huevos no viables, no obstante, el coeficiente de variación (definido como la relación entre la desviación estándar y la media, expresada en porcentaje) es ligeramente menor (de 11.8 %), en comparación con el coeficiente de los huevos viables (de 13.1 %), estos últimos resultados indican que la desviación estándar (dispersión de los datos alrededor de la media) representa menos del 15 % de la variación del total de la población por lo que las variaciones observadas no son muy significativas por lo que se puede confiar en la recolección de los resultados individuales.

TABLA 6. PROMEDIO DEL NÚMERO DE HUEVOS VIABLES Y NO VIABLES DE CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS.

TRATAMIENTOS	Huevos de <i>Ascaris suum</i>		
	No viable	Viable	
1. Testigo	353	188	
2. Azul Tripán	318	126	
3. Rojo Congo	274	155	
4. Lugol	307	163	
5. Eosina "Y"	379	158	
6. Hematoxilina	361	154	
7. Verde de Metilo	275	199	
8. Safranina	292	158	
9. Azul de Metileno	317	189	
ΣX_j	2876	1490	Σ TOTAL 4366
$\bar{X}_j$	319.5	165.5	$\bar{X}$ TOTAL 242.5
S	37.6	21.73	
CV	11.8%	13.1%	

ΣX_j = sumatoria por columnas de huevos viables y no viables; X_j = media por columnas de huevos viables y no viables; S = desviación estándar; CV = coeficiente de variación; ΣTOTAL = de huevos evaluados; $\bar{X} \text{TOTAL}$ = media de todos los huevos evaluados.

No obstante es conveniente determinar las posibles causas de las variaciones observadas las cuales pueden deberse a múltiples causas, por ejemplo a las características químicas de los colorantes, a una baja fertilidad de la hembra de la cual se obtuvo la suspensión (por lo cual no todos los huevos se encontraron fértiles), a las diferencias entre la composición bioquímica de la membrana externa de los huevos viables y no viables, o a un error aleatorio.

Con el fin de establecer la significancia de tales variaciones se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para una clasificación doble, cuyos resultados se muestran en la **tabla 7**.

TABLA 7. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CLASIFICACIÓN DOBLE Y PRUEBA DE FISHER.

CAUSAS	GL		SC	CM	F	FT	
	Fórmula general	Caso particular				.05	.01
Colorantes	(a-1)	8	6784.5	848.06	0.78	3.4	6
Huevos teñidos o no teñidos	(n-1)	1	106722	106722	98.4	5.3	11
Error	(a1)(n-1)	9	8673.9	1084.3			
Total	(an-1)	17	122180				

a = número de tratamientos (9); n = características de los huevos (2: viables y no viables); an = 18; GL = Grados de libertad; SC = suma de cuadrados; CM = cuadrados medios; F = F calculada; FT = F de tablas.

De la prueba de F o relación de varianza para evaluar la **variación entre los tratamientos**, se obtuvo como resultado que la **F calculada (0.78)** es menor que la **F de tablas ($F_{0.05(8,9)} = 3.44$)**. Esto implica que la variación entre los diferentes tratamientos no es significativa; por lo que se acepta la hipótesis nula con una probabilidad menor del 5 % de error de rechazar una cosa cierta. **Se concluye** que cualquiera de los colorantes puede utilizarse indistintamente para diferenciar los huevos viables de los no viables.

Por otro lado, el valor de la **F calculada (98.4)** para evaluar la variación entre huevos viables y no viables es mucho mayor que el valor de **F de tablas ($F_{0.01(1,9)} = 11.3$)**, lo que significa que los colorantes discriminan entre huevos viables y no viables debido a causas no aleatorias, siendo

precisamente la característica de viabilidad-permeabilidad la que determinará si un huevo se tiñe o no; por lo tanto se acepta la hipótesis alterna.

Además, de la prueba de F, se aplicó la prueba de t de Student para corroborar los resultados, ya que:

$$t_{calculada} = \sqrt{F_{calculada}}$$

o bien,

$$t^2 = F$$

El valor de la $t_{calculada} = 9.92$; por lo tanto $t^2 = 98.45$. Este valor es prácticamente igual al de la $F_{calculada} = 98.42$. Por lo tanto se cumple la igualdad y se llega a la misma conclusión.

También se evaluó la variación relativa mediante el cálculo del **coeficiente de variación de los resultados de huevos viables más no viables**, se obtuvo que la desviación estándar representa el **13.58 %** de la media de la población bajo estudio; por lo que se puede confiar tanto en el manejo de las unidades experimentales como en la recolección de los resultados individuales y en la variación dentro de la muestras.

En cuanto al manejo de los resultados de los huevos viables, en la **tabla 8** se observa que las medidas de tendencia central y de variabilidad están acordes con los resultados cualitativos que se observaron en el laboratorio.

En el caso del Testigo (1) y del Verde de Metilo (7) se observa una mayor variación en la media, desviación estándar, varianza y coeficiente de variación. La similitud de resultados del Testigo con el Verde de Metilo se debe a que éste último da una coloración muy tenue, por lo tanto es difícil determinar los huevos teñidos de los no teñidos; la determinación de la viabilidad en este caso, al igual que en el Testigo y el Lugol, se basó sobre todo en la morfología y el desarrollo embrionario de los huevos.

En el caso del Azul de Metileno (9), posiblemente la variación que se observó se debió a que se complicó el localizar a los huevos no teñidos, porque este colorante es muy oscuro y la materia orgánica que también se tiñe encubría a los huevos no teñidos.

Por lo que respecta a los tratamientos con Eosina "Y" (5), Safranina (8) y Azul Tripán (2) se consideraron, cualitativa y cuantitativamente, los más indicados para determinar los huevos viables y no viables, ya que además de presentar los menores coeficientes de variación (6.8, 5.7 y 6.7, respectivamente) diferenciaron en el laboratorio notablemente los huevos teñidos de los no teñidos, sin presentar interferencias con la materia suspendida o particulada en el fondo.

TABLA 8. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL NÚMERO DE HUEVOS VIABLES.

RÉP	TRATAMIENTOS									ΣX.h
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
I	175	128	166	155	160	147	185	161	184	1461
II	150	122	144	148	144	142	140	145	158	1293
III	191	118	148	161	155	158	188	155	182	1456
IV	191	122	152	151	164	149	204	155	191	1479
V	233	140	170	200	167	174	223	174	230	1711
ΣXc	940	630	780	815	790	770	940	790	945	ΣTOT 7400
$\bar{X}$	188	126	156	163	158	154	188	158	189	$\bar{X}$ 164
S	30	8.6	11	21	9	12	30	10	26	
S ²	913	74	131	451	81	158	948	112	679	
CV	16	6.8	7.3	13	5.7	8.1	16	6.7	13.8	

RÉP. = Réplicas; ΣX.h sumatoria por hileras; ΣXc = sumatoria por columnas; X = Media muestral; S = Desviación estándar; S² = Varianza o cuadrado medio; CV = coeficiente de variación ΣTOT = suma total de resultados; $\bar{X}$ = media total de los resultados .

El soporte estadístico se obtuvo mediante un análisis de varianza para una clasificación simple, con prueba de F, y posteriormente por comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey.

En la **tabla 9** se muestran los resultados del ANOVA y de la prueba de F.

TABLA 9. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA UNA CLASIFICACIÓN SIMPLE Y PRUEBA DE FISHER (F)

CAUSAS	GL		SC	CM	F	FT	
	Fórmula general	Caso particular				.05	.01
Colorantes	(a-1)	8	17281	2160	1.21	2.2	3.1
Error	a(n-1)	36	14205	1775			
Total	(an-1)	44	31486				

a = número de tratamientos (9); n = número de réplicas para cada tratamiento (5); an = número total de observaciones (45); GL = Grados de libertad; SC = suma de cuadrados; CM = cuadrados medios; F = F calculada; FT = F de tablas.

El valor de la F experimental es menor que el de la F de tablas ($F_{0.05(8,36)} = 2.2$), por lo que no existe diferencia significativa entre los colorantes y el método de incubación *in vitro*; es decir, para determinar la viabilidad de los huevos de helmintos se puede aplicar indistintamente el método de incubación *in vitro* o el de tinción con cualquiera de los colorantes biológicos probados.

Además, para comparar los tratamientos de manera individual entre sí, se aplicó la prueba de Tukey, para la cual se tomaron los valores promedios de los huevos viables (**tabla 7**) y se ordenaron por su magnitud creciente a decreciente:

- | | |
|----------------|----------------|
| a) $X_a = 189$ | f) $X_f = 158$ |
| b) $X_b = 188$ | g) $X_g = 156$ |
| c) $X_c = 188$ | h) $X_h = 154$ |
| d) $X_d = 163$ | i) $X_i = 126$ |
| e) $X_e = 158$ | |

Se obtuvo el número de comparaciones múltiples o diferencias entre los tratamientos mediante la fórmula:

$$\frac{a(a-1)}{2}$$

dando como resultado 36 comparaciones a efectuar. Se prosiguió a elaborar las comparaciones o diferencias: a) $X_a - X_b; \dots X_a - X_i$; b) $X_b - X_c; \dots X_b - X_i$; c) $X_c - X_d; \dots X_c - X_i$ yh) $X_h - X_i$. Éstas se compararon con el valor teórico común o diferencia mínima significativa mediante la aplicación de la fórmula:

$$W = q\alpha Sx,$$

en donde: Sx = error estándar de la media = a la raíz cuadrada de S^2/n ; S^2 = CM o varianza del error experimental (1775); n = número de observaciones, repeticiones o valores para calcular las medias (5) y $q\alpha$ = valor tabular, o valor de t modificado, dependiente del número de tratamientos (9) y de los GL del error (36). Al efectuar los cálculos se obtuvo que:

$$W = q_{0.05(9,36)} Sx = 4.63 \times 18.84 = \underline{87.23}$$

Todos los resultados de las diferencias entre medias fueron menores que el valor teórico calculado, por lo tanto las diferencias son estadísticamente no significativas. Con estos últimos análisis estadísticos se comprueba sin lugar a dudas que el método de incubación *in vitro* y el método de tinción son equivalentes para determinar la viabilidad de los huevos de helmintos (en particular de *Ascaris suum*).

No obstante, aún cuando los resultados de los análisis estadísticos indican que se pueden utilizar todos los colorantes probados de manera confiable, en la práctica se demuestra que su aplicación depende de la percepción del observador y que los más recomendables son los tres colorantes que ya se mencionaron (Eosina "Y", Safranina y Azul Tripán).

6.3 Resultados y discusión de la aplicación de la técnica de tinción a muestras naturales

En ninguna de las muestras analizadas con el método **Norma**, sin tinciones, se observaron huevos de helmintos, ni aún en el agua cruda; posiblemente se presentó una sobreposición entre

los huevos y el detritus o materia orgánica en el volumen final que se cuantifica en una celda Sedgwick-Rafter. Otra posible razón por la cual no se observaron huevos de helmintos podría ser que esta metodología no es apropiada, ya que originalmente se diseñó para la determinación y cuantificación de huevos de helmintos en muestras de suelos y lodos (donde se encuentran altas concentraciones de huevos), aunque en la Norma se indica que es aplicable con la misma eficiencia para cuantificar huevos de helmintos en aguas residuales crudas y tratadas.

También pudo presentarse el caso de que durante la toma de muestras no hubiera huevos de helmintos en las aguas, debido a condiciones epidemiológicas naturales. Cabe aclarar que en estudios anteriores se había demostrado que las aguas residuales analizadas en este trabajo, contenían huevos de varias especies de helmintos en concentraciones detectables con otro método analítico.

Por otro lado, en las porciones de las muestras analizadas paralelamente por el mismo procedimiento Norma, pero añadiendo los colorantes para la lectura final, se observó un cambio de color y/o una disgregación, de manera que se formaron grumos fuertemente coloreados que entorpecían la observación; esta disgregación se comprobó que se debía a la reacción con el ácido sulfúrico $<0.1\text{ N}>$, con la solución de alcohol-ácido $<0.1\text{ N}>$ y con el éter etílico, pero no con el sulfato de zinc. Este hecho, definitivamente es limitante para la aplicación del método de **tinción** conjuntamente con el método cuantitativo **Norma**, ya que puede dar lugar a resultados falsos negativos.

Debido a lo anteriormente expuesto, se decidió probar con la técnica de concentración por filtración y transparentación de la membrana (**F/TM**) en combinación con la técnica de tinción, para dilucidar si la ausencia de huevos de helmintos en las aguas crudas se debió a un bajo rendimiento o eficiencia del propio método, o a la calidad de las aguas en el momento del muestreo, así como para comprobar lo que al principio se pretendía, ésto es, si el método de tinción es aplicable para la determinación de la viabilidad de los huevos de helmintos presentes en muestras de aguas residuales.

Las pruebas que se efectuaron para determinar posibles interferencias del método de tinción con

los reactivos químicos empleados en el método F/TM (solución salina <NaCl al 0.85%>, sulfato de zinc <Gr. esp. 1.20> y glicerol) no mostraron ninguna reacción, además los tonos de los diferentes colorantes empleados se mantuvieron estables por más de dos meses. Por lo que respecta a los resultados de la determinación y cuantificación de huevos de helmintos fueron positivos, por lo que se seleccionó este método para evaluar el comportamiento de los colorantes en muestras naturales.

Se aplicaron todos los colorantes a los mismos tipos de muestras de aguas residuales analizadas con el método norma. En la **tabla 10** se muestran los resultados de los análisis realizados a las muestras de la **PTUNAM**, los datos son el promedio de tres muestreos, se analizaron muestras del agua cruda influente, en los efluentes de los sistemas de lodos activados, biodisco y filtro rociador, en los efluentes de los sedimentadores de cada tratamiento, en el efluente del filtro de arena y en el efluente final clorado.

TABLA 10. NÚMERO PROMEDIO DE HUEVOS DE HELMINTOS VIABLES Y NO VIABLES, PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE LA UNAM.

COLORANTES	TIPO DE MUESTRA DE LA PTUNAM (No. huevos/l)								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Azul Tripán	17	3	7	11	1	1	2	0	0
Rojo Congo	12	4	4	7	1	2	1	0	0
Lugol	10	2	3	5	0	1	1	0	0
Eosina "Y"	16	4	5	8	2	2	1	0	0
Hematoxilina	9	1	1	3	1	0	0	0	0
Verde de Metilo	10	2	2	3	1	0	0	0	0
Safranina	14	2	1	4	0	0	1	0	0
Azul de Metileno	11	1	2	4	0	0	1	0	0

A = agua cruda; B = efl. de lodos activados; C = efl. del biodisco; D = efl. del filtro rociador; E = efl. del sedimentador secundario de lodos activados; F = efl. del sedimentador secundario del biodisco; G = efl. del sedimentador secundario del filtro rociador; H = efl. filtro de arena I = efl. agua clorada.

La proporción en promedio encontrada de huevos viables (no teñidos) y no viables (teñidos) en el agua cruda se observa en el **tabla 11**. Como se puede ver, la mayoría de los colorantes aplicados diferenciaron bien los huevos teñidos de los no teñidos; en el caso de las **muestras testigo** a las cuales no se les agregó ningún tipo de colorante no se pudo observar bien los huevos ya que no resaltaban y quedaban cubiertos por la materia orgánica, el Lugol se comportó del mismo modo que con las muestras experimentales, ya que tiñó indistintamente a todos los huevos de helmintos y no se pudo diferenciar claramente un huevo viable de otro no viable. Con el verde de Metilo se presentaron interferencias con algunos componentes del agua, ya que el color no se distinguía claramente. El Azul de Metileno presentó el inconveniente de teñir fuertemente en algunos casos el fondo de la preparación, interfiriendo con las lecturas. De todos los colorantes probados, los que siempre diferenciaron claramente los huevos teñidos de los no teñidos, sin presentar interferencias ni problemas, fueron nuevamente el Azul Tripán, la Safranina y la Eosina "Y".

Es importante mencionar que sólo se detectaron huevos no teñidos (potencialmente viables) en el agua cruda (**tabla 11**), esto no quiere decir que en los diferentes procesos de tratamiento no se encuentren huevos viables, si no que debido a que es menor la cantidad de huevos fértiles que se producen en comparación de los no fértiles la mayor parte de huevos que se obtuvieron se tiñeron y también puede ser que los huevos viables se sedimentaron debido a que son más pesados que los huevos no fértiles los cuales flotan fácilmente y debido a que se tomaron muestras de los efluentes de todos los procesos de tratamiento y no de los sedimentos pudo haber pérdida en las lecturas de huevos viables. No obstante bajo las condiciones de estudio de este trabajo y con los huevos que se capturaron, se observó que los huevos que no se tiñeron presentaron desarrollo embrionario por lo que se consideraron huevos potencialmente viables, algunos de esos huevos se muestran en las **fotografías 16, 17, 23 y 24 anexo IV**.

En los análisis de la **PTUNAM** no se elaboró un análisis estadístico por que no se tuvo control de ningún parámetro ya que no era el objetivo ver la eficiencia de remoción de huevos de helmintos; sino probar la utilidad técnica de tinción para determinar la viabilidad potencial de los huevos de helmintos en las aguas residuales crudas y tratadas por tres procesos convencionales de tratamiento y comparar resultados con los experimentales para tener una base más

solida para futuros y necesarios estudios.

TABLA 11. COMPORTAMIENTO DE LOS COLORANTES EN EL AGUA CRUDA CON RESPECTO A LA TINCIÓN DE LOS HUEVOS DE HELMINTOS DEL AGUA CRUDA PROVENIENTE DE COPILCO EL ALTO.

COLORANTES	A G U A C R U D A	
	HUEVOS VIABLES (NO TEÑIDOS)	HUEVOS NO VIABLES (TEÑIDOS)
Azul Tripán	7	10
Rojo Congo	3	9
Lugol	0	10
Eosina "Y"	5	11
Hematoxilina	1	8
Verde de Metilo	0	10
Safranina	5	9
Azul de Metileno	0	11

Evaluar la viabilidad mediante la técnica de incubación *in vitro* fue un tanto difícil, ya que los huevos que se lograron ver en las muestras de aguas residuales (recuperados al raspar el filtro de membrana), se observaron una vez y ya no se pudieron recuperar para su posterior observación; no obstante, se pudo tomar un par de fotografías de un huevo de *Ascaris lumbricoides* y otro de *Trichuris trichiura* (obtenidas del agua cruda fot. 23 y 24 respectivamente) que no se tiñeron al aplicar Azul Tripán, por lo que se consideraron viables. Se probó únicamente un colorante porque no se encontraron muestras positivas suficientes para hacer la prueba con todos los colorantes.

Las especies de helmintos encontradas en la PTUNAM fueron: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y ocasionalmente *Enterobius vermicularis*. Entre las tres especies, se presentan diferencias en la composición de la cubierta de huevo, la cubierta de *Ascaris lumbricoides* (fig.16) es muy similar a la cubierta del huevo de *Ascaris suum* (especie experimental fig. 4) y los resultados observados en las muestras de la PTUNAM de la tinción de los huevos no viables (teñidos) y potencialmente viables (no teñidos) de esta especie estan ocordes con lo observado

en el laboratorio para la especie de *Ascaris suum* ya que se localizaron huevos que no se tiñeron a pesar de haber agregado colorante al medio como se puede ver en la fot. 23 obtenida del agua cruda y las fot. 16 y 17, tomadas de las preparaciones por medio de la técnica F/TM, en especial en la foto 17 se logró ver hasta la fase larval de desarrollo después de ser observada la preparación por más de 21 días.

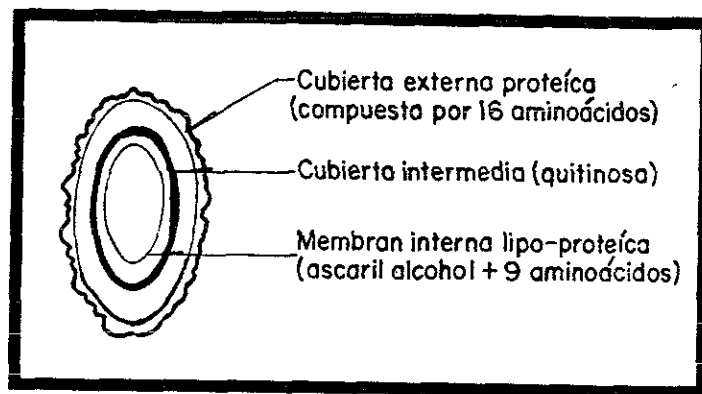


FIGURA 4. Estructura de la cubierta de los huevos de *Ascaris suum*

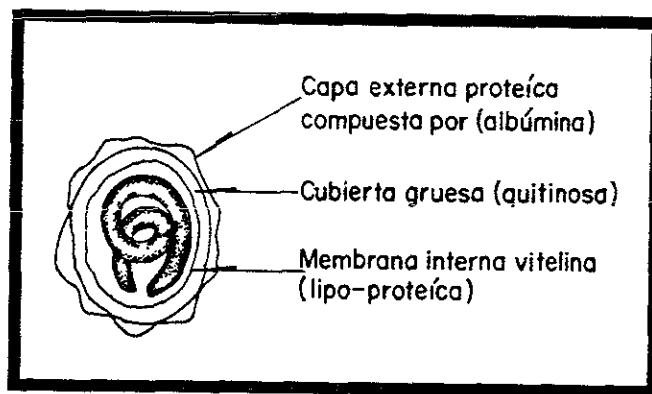


FIGURA 16. Estructura de la cubierta de los huevos de *Ascaris lumbricoides*.

En el caso de la especie *Trichuris trichiura* (fig. 17), se observa que también presenta tres cubiertas muy similares a la especie experimental y se logró observar un huevo de esta especie que no se teñía a pesar de agregar colorante al medio fot. 24 y otro que se tiño fot. 15. La última preparación se obtuvo por medio de la técnica de F/TM.

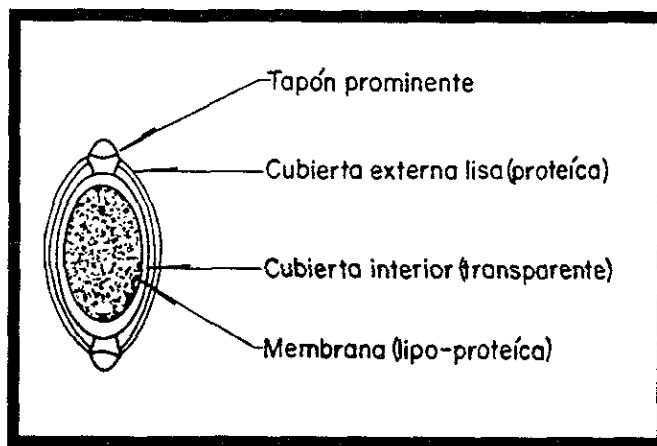


FIGURA 17. Estructura de la cubierta de los huevos de *Trichuris trichiura*

Por lo que respecta a la cubierta de *Enterobius vermicularis* fig 18, su cubierta es más simple esto puede influir en que los colorantes penetren indistintamente en los huevos viables y en los no viables, desafortunadamente fueron muy pocos los organismos que se localizaron y todos se observaron teñidos, faltó probar si eran viables o no.

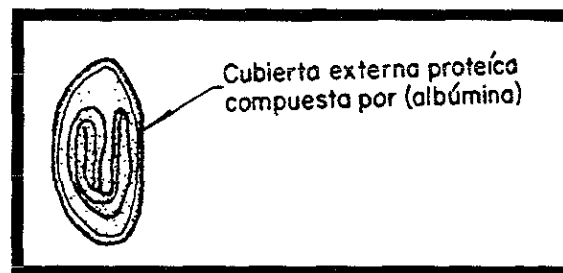


FIGURA 18. Estructura de la cubierta de los huevos de *Enterobius vermicularis*

Estos últimos resultados ponen de manifiesto que aunque la experimentación se realizó con *Ascaris suum*, el método de tinción también es confiable para evaluar la viabilidad de otras especies que se encuentran ordinariamente en las aguas residuales y naturales.

Las concentraciones de huevos de helmintos que se encuentran en las aguas residuales varían conforme a la zona de estudio por sus características en cuanto al aspecto climático y sociocultural, además de las técnicas que se emplean para su análisis. Para el caso de este

estudio, fue conveniente trabajar con aguas residuales que tuvieran bajas concentraciones de huevos de helmintos, para distinguir de manera más efectiva si se presentaba alguna interferencia por la materia orgánica y sustancias que pudiera tener las aguas residuales y principalmente para distinguir claramente entre un huevo viable y no viable y la especie de helminto correspondiente.

Las preparaciones obtenidas por medio de la técnica de F/TM permitieron que se pudiera observar el desarrollo embrionario de algunos huevos como los de las fot. 16 y 17, ya que la glicerina que se aplica antes de la observación final, permite mantener hidratada la membrana sin alterar las estructuras, ni obstaculizar el desarrollo embrionario del huevo, ni cambiar el tono del colorante, durante más de dos meses. Los colorantes vitales empleados en este estudio, además de ser muy baratos y de fácil adquisición, son estables en solución acuosa por largo tiempo si se mantienen en frascos color ámbar.

Los precios (tabla 12) en pesos mexicanos son realmente muy baratos, ya que con un gramo de cualquiera de estos colorantes se puede preparar 100 ml. los cuales pueden servir para teñir aproximadamente 1000 muestras, esto depende del uso del experimentador. En el caso del colorante Verde de Metilo que es el más caro, se puede omitir de la lista ya que da una coloración muy tenue y por lo tanto no muy buenos resultados. Para el caso de la solución Lugol se necesita yoduro de potasio y yodo en polvo, no obstante su costo sigue siendo muy accesible, el problema es que como ya se dijo, no sirve para diferenciar un huevo viable de otro no viable.

TABLA 12. PRECIOS DE LOS COLORANTES BIOLÓGICOS EMPLEADOS EN ESTE ESTUDIO, HASTA EL 24 DE NOVIEMBRE DE 1997.

COLORANTES	PESO (gr.)	PRECIO
Azul Tripán	25	113.00
Rojo Congo	25	103.00
Lugol	25	24.5 + 40.75
Eosina "Y"	25	275.00
Hematoxilina	25	370.00
Verde de Metilo	25	1,790.00
Safranina	25	367.50
Azul de Metileno	25	64.00

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Del análisis y evaluación de los resultados presentados se desprenden las siguientes conclusiones:

- ◆ Los resultados de este trabajo muestran que es factible sustituir el método de incubación *in vitro* por la técnica de tinción, con lo que se reduce a unos minutos el tiempo de respuesta.
- ◆ La técnica de tinción se puede emplear de manera confiable para determinar la viabilidad potencial de los huevos de helmintos -en particular de *Ascaris suum*- al mismo tiempo que se realiza el recuento.
- ◆ De entre los colorantes probados la solución de Lugol, si bien sirve para teñir, no determina la viabilidad, porque tiñe indistintamente huevos viables y no viables.
- ◆ Los colorantes Azul Tripán, Eosina "Y" y Safranina, mostraron los mejores resultados cuando se aplican junto con la técnica de filtración, ya que diferenciaron claramente los huevos teñidos de los no teñidos.
- ◆ La metodología analítica recomendada como Norma Oficial Mexicana, no presentó los resultados esperados al utilizarla para el análisis de los efluentes tratados de la Planta de Tratamiento de la UNAM.
- ◆ La técnica de filtración utilizada en este trabajo, además de permitir un manejo seguro de los colorantes (ya que no se presenta ninguna reacción que pudiera alterar su tonalidad), permite la conservación de las preparaciones por la adición de la glicerina y el almacenamiento en oscuridad.
- ◆ Aunque la experimentación se realizó con *Ascaris suum*, los resultados obtenidos parecen indicar que también son confiables para evaluar la viabilidad de otras

especies, aspecto probado en las muestras analizadas de la planta de tratamiento de la UNAM, no obstante falta realizar más estudios al respecto.

- ◆ Es conveniente continuar con estudios de la aplicación de la técnica de tinción en aguas residuales crudas y tratadas de origen doméstico y municipal, para constatar la eficiencia de la técnica en dichas muestras.
- ◆ La técnica de filtración puede ser adoptada por la mayoría de los laboratorios de las instituciones públicas y privadas que estén involucradas en la evaluación y control de la calidad parasitológica del agua.
- ◆ Aunque los procedimientos descritos son sencillos, es recomendable que el personal que aplique estas técnicas tenga conocimientos prácticos y experiencia en la identificación microscópica de las estructuras parasitarias, ya que el agua puede contener materiales que un observador inexperto confundiría con huevos o quistes.
- ◆ Dada la importancia de determinar la viabilidad de los huevos de helmintos, puesto que esta característica determina la capacidad de un huevo de desarrollarse hasta la etapa infectante, única en la que puede causar enfermedad, los comités de normalización deben retomar este punto tan importante para incluirlo en la legislación, sobre todo porque ahora ya se cuenta con una técnica sencilla, confiable y rápida para determinar la viabilidad potencial de los huevos de helmintos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- **ALVAREZ-CHACON, R., Pérez, B. y Farías, M.G. (1985).** "Viabilidad de huevos larvados de *Enterobius vermicularis* a diferentes temperaturas". In: VOLUMEN CONMEMORATIVO DEL XXV ANIVERSARIO DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE PARASITOLOGIA Vol. 1. México, D. F. pp. 166-171.
- **AYRES, R.M., Stott, R., Mara, D.D. and Lee, D.L. (1992).** "Wastewater reuse in agriculture and the risk of intestinal nematode infection" *Parasitology Today* **8**(1):32-35.
- **AYRES, R. M., Lee, D. L., Mara, D. D. and Silva, S. A. (1993).** "The accumulation, distribution and viability of human parasitic nematode eggs in the sludge of a primary facultative waste stabilization pond". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* **87**:256-258.
- **BAVINK, B. (1977).** "Introducción a la química orgánica" Ed. Labor, Barcelona. 218 pp.
- **BLUMENTHAL, U.J., Strauss, M., Mara, D.D. and Cairncross, S. (1989)** "Generalised model of the effect of different control measures in reducing health risks from waste reuse" *Wat. Sci. Tech.* **21**:567-577.
- **BLUMENTHAL, U.J., Cifuentes, E., Beneth, S and Ruiz-Palacios, G. (1992)** "Health Impact Evaluation of Wastewater in México" *Public Health Revue*, **19**:243-250
- **BLUMENTHAL, U.J., Ducan, D.M., Ayres, M.R., Cifuentes, E., Peasey, A., Stott, R., Lee, L.D. and Ruiz-Palacios, G. (1996)** "Evaluation of the who nematode egg guidelines for restricted and unrestricted irrigation" *Wat. Sci. Tech.* **33**:(10-11)277-283.
- **BROWN, H.W. y Belding, L.D. (1965)** " Parasitología Clínica " Segunda Edición. Ed. Interamericana, S. A. 313 pp.

- **BITRON, M. G. y Galván, G. M. (1997).** "Effect of compression-descompression on helminth eggs present in sludge of a settling tank" *Water Research*. EN PRENSA.
- **ESTRADA, F. E., Peralta, Z. L. y Rivas, M. P. (1982)** "Manual de técnicas Histológicas". AGT. EDITOR, S.A. 140 pp.
- **FAIRBAIRN, D. and Passey, I.B. (1955)** "The lipid components in the vitelline membrane of *Ascaris lumbricoides* eggs". *Can. J. Biochem. Physiol.* **33**:130-134.
- **FAIRBAIRN, D. (1961)** "The In Vitro Hatching of *Ascaris lumbricoides* Eggs". *Canad. J. Zool.* **39**:153-162.
- **FIESER, F. L. y Fieser, M. (1980)** "Química orgánica" Ed. Grijalbo, S. A. México, D. F. 1330 pp.
- **FOOR, W.E. (1967)** "Ultrastructural aspects of oocyte development and shell formation in *Ascaris lumbricoides*". *The Journal of Parasitology*, **53**(6):1245-1261.
- **GASPARD, P. and Schwartzbrod, J. (1993)** "Determination of the parasitic contamination of irrigated vegetables" *Wat. Sci. Tech.* **27**(7-8):295-302.
- **GIONO, C. S., Escobar, G. A. y Valdespino, G. J. (1994)** "Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales". Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Secretaría de Salud. México D. F, 637 pp.
- **GUERRERO, V. G., Moreno, F. A. y Garduño, V.A. (1982)** "El sistema hidráulico del Distrito Federal". Un servicio público en transición D.D.F. Secretaría de Obras y Servicios, Dirección General de Construcción y Operación Hidráulica. 560 pp.
- **HAM, W.A. y Cormack, H.D. (1985)** "Tratado de histología" Ed. Interamericana, México, D.F. págs. 17 y 18.

- **HASS, D. K. and Todd, A. C. (1962).** "Extension of a Technique for Hatching Ascarid Eggs in Vitro". A.M.J. VET. REB. pp. 169-170.

- **HAZEN, M. J., Villanueva, A., Juarranz, A., Cañete, M. and Stockert, J. C. (1985)** "Histochemistry". The Williams & Wilkins Company. 341 pp.

- **HINCK, L.W. (1972)** "Enzyme studies with hatching fluid and developmental stages of *Ascaris suum*". Doctoral dissertation. University of Oklahoma 87 pp.

- **HINCK, L. W. & Ivey, M. H. (1976).** "Proteinase activity in *Ascaris suum* eggs, hatching fluid and excretions-secretions. *Journal of Parasitology*, **62**:771-774.

- **HUBERT, J. and Kerboeuf, D. (1984)** "A new method for culture of larvae used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongylosis: comparison with fecal cultures" *Can. J. Comp. Med.* **48**:63-71.

- **LAMBERT, R.A. (1975)** "Identificación de helmintos". Guías de Laboratorio, Ed. El Manual Moderno, S.A. 45 pp.

- **LAMBERT, R.A. (1976).** "Identificación de protozoarios". Guías de Laboratorio, Ed. El Manual Moderno, S.A. 65 pp.

- **LAMOTHE, A. R. y García, P. L. (1988)** "Helmintiasis del hombre en México". A. G. T. Editor, S. A. México, D. F. 131 pp.

- **MEYER, Y.B. (1978)** "Recovery of *Ascaris* eggs form sludge". *J. of Parasitology*. **64**(2):380-383.

- **MORRISON, T.R. and Nelson, B.R. (1979)** "Organic chemistry" Second Edition. Printed in USA. 1204 pp.

- **MURILLO, H. (1981)** "Tratado elemental de química orgánica" Ed. Porrúa, S. A. México, D.F. 469 pp.

- **ODDA, R. y Jiménez-Albarran, M. (1987)** " Viabilidad de los huevos de *Ascaris lumbricoides* ". Rev. Ibér. Parasitol., **47(2)**:159-160.

- **READ, P.C. (1981)** "Parasitismo Animal" Ed. CONTINENTAL. S. A. de CV. México. 207 pp.

- **ROGERS, W.P. (1958)** "Physiology of the hatching of eggs of *Ascaris lumbricoides*". *Nature* **181**:1410-1411.

- **SALAZAR, S.P. y De Haro, A.I. (1986).** "Manual de técnicas para el diagnóstico morfológico de las parasitosis". Ed. Francisco Mendez Cervantes. 235 pp.

- **SCHMIDT, G.D. y Roberts, L.S. (1981).** "Foundations of parasitology". Second Edition. Ed. C.V. Mosby Company. 795 pp.

- **SCHMIDT, D.G. y Roberts, L. S. (1984)** "Fundamentos de parasitología" Ed. Continental, S. A. de C. V. 665 pp.

- **SECRETARÍA DE DESARROLLO SOCIAL. (1993).** Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-033-ECOL/1993. Que establece las condiciones bacteriológicas para el uso de aguas residuales de origen urbano o municipal o de la mezcla de estas con la de los cuerpos de agua, en el riego de hortalizas y productos hortofructícolas. Diario Oficial, 18/10/93.

- **SECRETARÍA DEL MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA. (1996)** Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial, 06/01/97.

- **SHEPHARD, M.R.N. (1987)** "Helminthological aspects of sewage treatment in hot climates". In: *Water, wastes and health in hot climates*. R. Feachem, M. McGarry and D. Mara, Editors. John Wiley and Sons, New York. 456 pp.
- **SHORE, G. L. y Ash, R. L. (1987)** "Manual de laboratorio clínico". Segunda edición. Ed. Medica Panamericana. 147 pp.
- **SHUVAL, H. I. (1991)** "Health guidelines and standards for wastewaterreuse in agriculture: Hitorial perspectives" *Wat. Sci. Tech.* **23**: 2073-2080.
- **SIEBE, C. and Cifuentes, E. (1993)** "Environmental impact of wastewater irrigation in central Mexico: an overview" *Int. Jour. Environ. Health Res.* **3**(4):35-56.
- **STIEN, J. L. and Schwartzbrod, J. (1988)** "Viability determination of *Ascaris* eggs recovered from waste-water" *Environ. Tech. Letters*, **9**:401-406.
- **STIEN, J. L. and Schwartzbrod, J. (1990)** "Experimental contamination of vegetables with helminth eggs" *Wat. Sci. Tech.* **22**(9):51-57.
- **STOCKERT, J. C., Villanueva, A y Canete, M. (1994).** "Spectroscopic observations on photofading and fluorescence changes of eosin Y solutions in the presence of sodium azide". *Spectrochimica acta*. Part A: Molecular spectro. **50**(6):1197-1200.
- **STOTT, R., Ayres, R., Lee, D and Mara, D. (1994)** "An experimental evaluation of potential risks to human health from parasitic nematodes in wastewater treated in waste stabilization ponds and used for crop irrigation" Research Monograph No. 6 University of Leeds Departament of Civil Engineering 520 pp.
- **THE MERCK INDEX, (1990):** "An Encyclopedia of Chemical, Drogs, and Biologicals". Eleventh Edition. Published by Merck & CO; Inc. RAHWAY, N. J., U.S.A 2058

pp.

- **U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1992).** "Environmental Regulations and Technology Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge" (Including domestic septage) under 40 CFR part 503. Appendix I Analytical Method for Viable Helminth Ova. Washinton, D.C. 1540 pp.
- **VICTOR, M. E. and Cowdry, E.V. (1964).** "Laboratory technique in Biology and Medicine". The Williams & Wilkins Company. 230 pp.
- **WHARTON, D. A. (1979).** "The structure and formation of the egg-shell of *Hammerschmidtella diesingi* Hammerschmidt (Nematoda: Oxyuroidea). *Parasitology*, **79**:1-12.
- **WEISS, L. (1986)** "Histología, Biología celular y tisular". Quinta edición. Ed. El Ateneo, impreso en Argentina. págs. 80-98.
- **ZHOU, B; Li, F and Liang, J. (1985)** "The use of methylene blue-eosin-borax stain in determining viability of *Ascaris* ova". *Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, **3**(1):48-49.
- **ZOLLINGER, H. (1987).** "Color Chemistry: Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments" Ed. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. 249 pp.

A N E X O I

TÉCNICA PARA OBTENCIÓN DE HUEVOS DE *Ascaris suum*

La metodología para extraer los huevos y preparar la suspensión fué la siguiente:

1. Las hembras, (gusanos con el extremo posterior recto) se diseccionaron longitudinalmente para extraer los órganos internos, los que se colocaron en un mortero, se añadieron unos mililitros de solución salina isotónica y se molieron con el pistilo, de manera de hacer una suspensión.
2. Dicha suspensión, se recibió en un tubo de centrifuga de 50 ml., se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos y se removió el sobrenadante con una bomba de succión al vacío, se dejó el paquete en el fondo del tubo y se le agregó solución acuosa de Tritón X-100 (0.01%) con el fin de desprender en su mayor parte la materia orgánica que estuviera pegada a los huevos (este lavado se repitió por tres veces).
3. A la pastilla final se le agregó nuevamente solución salina y se pasó la suspensión por un colador y se recibió en frasco de vidrio, perfectamente limpio.
4. Se hizo un recuento de la concentración de huevos en la suspensión, en una gota tomada con una asa de siembra calibrada.

A N E X O I I

TÉCNICA ANALÍTICA DE LA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA, 1992) PARA LA CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE HUEVOS DE HELMINTOS, INCORPORADA COMO PROCEDIMIENTO NORMA EN LA NOM-001-ECOL-1996.

1 Fundamento

La técnica de incubación *in vitro* de la EPA, es aplicable a suelos, lodos y aguas residuales crudas o tratadas que contengan cantidades apreciables de sólidos suspendidos. Se basa en la concentración de la muestra por sedimentación, recuperación de los huevos por flotación con sulfato de zinc (Gr. esp. 1.20) y recuento por observación microscópica directa. El recuento y la determinación de la viabilidad se hacen diluyendo el concentrado final en 4 ml de solución 0.1 N de H₂SO₄. Las muestras se incuban a 26 °C durante 21 días. Se consideran viables los huevos que presentan larva móvil al final de la incubación.

2 Procedimiento

1. Tomar 5 L de aguas residuales y dejar sedimentar por tres horas o una noche; posteriormente aspirar el sobrenadante.
2. Pasar el sedimento por un tamiz de 165 μ m y lavar enseguida con 5 L de agua (potable o destilada). Recibir el filtrado en la misma botella de 5 L.
3. Dejar sedimentar por tres horas o una noche.
4. Aspirar el sobrenadante al máximo y depositar el sedimento en una botella de centrífuga de 450 ml, enjuagar las botellas de 5 L 2 ó 3 veces.
5. Centrifugar a 1600 rpm por 3 minutos.
6. Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 150 ml de ZnSO₄ (Gr. esp. 1.20). Homogenizar la pastilla con una espátula.
7. Centrifugar a 1600 rpm por 3 minutos.

8. Verter el sobrenadante en un frasco de 2 litros y diluir cuando menos con un litro de agua.
9. Dejar sedimentar por 3 horas.
10. Aspirar al máximo el sobrenadante y resuspender el sedimento agitando; verter el líquido resultante en 2 tubos de 50 ml y lavar 2 a 3 veces con agua destilada.
11. Centrifugar a 1600 rpm por 3 minutos.
12. Reagrupar las pastillas en un tubo de 50 ml y centrifugar a 1600 rpm por 3 minutos.
13. Resuspender la pastilla en 15 ml de solución de alcohol-ácido (0.1 N H_2SO_4) + ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 33 %) y adicionar 10 ml de éter-etílico.
14. Agitar y abrir de vez en cuando los tubos para dejar escapar los gases y homogenizar la muestra con una espátula.
15. Centrifugar a 2500 rpm por 3 minutos.
16. Aspirar el máximo de sobrenadante y dejar menos de 1 ml del líquido.
17. Pasar 1 ml a una celda Sedgewick-Rafter y contar el número de huevos presentes, expresar los resultados en número de huevecillos por litro.
18. **DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD:** Diluir el sedimento con 4 ml de solución 0.1 N de ácido sulfúrico. Distribuir la muestra en tubos con tapón suelto. Incubar a 26 °C; durante 4 a 6 semanas, al término contar los huevos embrionados (que contengan larvas móviles).

A N E X O III

**TÉCNICA POR FILTRACIÓN/TRANSPARENTACIÓN DE LA MEMBRANA (F/TM)
PARA LA CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE HUEVOS DE HELMINTOS
EN AGUAS RESIDUALES.**

Esta técnica fue desarrollada y validada originalmente para aplicarse en aguas de abastecimiento; posteriormente se introdujeron algunas modificaciones para su aplicación en efluentes tratados, modificaciones que dieron origen al procedimiento que se describe a continuación.

1. FUNDAMENTO

La técnica se basa en la concentración de la muestra por filtración a través de una membrana de ésteres de celulosa, con poros de 8.0 μm de diámetro, mediante la aplicación de vacío de 40 cm Hg. Los organismos adheridos al filtro se recuperan por flotación con solución de sulfato de zinc (Gr. esp. 1.20); el recuento se realiza por observación microscópica directa según la técnica de transparentación de la membrana.

2. PROCEDIMIENTO

1. Tomar de cuatro a cinco litros de muestra. Si ésta contiene sólidos suspendidos o basura de diversa índole, será necesario un paso de prefiltración antes del filtrado por membrana, para lo cual se deberá homogenizar la muestra perfectamente y pasarla por un tamiz de 165 μm . Un litro del filtrado se procesará como se indica.
2. En caso de que la muestra no contenga sólidos, agitarla vigorosamente para desprender los organismos adheridos a las paredes internas del recipiente y filtrar un litro a través de un filtro de membrana de 47 mm de diámetro y poros de 8.0 μm , aplicando vacío máximo de 40 cm Hg; al término, lavar las paredes del recipiente de muestreo y del embudo de filtración con solución salina isotónica (NaCl al 0.85%) y pasar estos lavados por el mismo filtro.
3. Colocar la membrana sobre la pared interna de un vaso de precipitados y rasparla perfectamente con una espátula; lavar la membrana y la espátula con

- solución de sulfato de zinc (Gr. esp. 1.20), recibiendo todos los lavados en el mismo vaso. A veces será necesario dar, antes de este paso, uno a tres lavados con solución salina (centrifugando entre cada uno como se indica en el inciso 4) para eliminar lo más posible de materiales gruesos. Después proceder como se indica en el inciso 3.
4. Pasar cuantitativamente los lavados del vaso a un tubo de centrifuga (de fondo redondeado o cónico) de 50 ml de capacidad, añadir 25 ml de sulfato de zinc y homogenizar perfectamente (de preferencia con un vortex); añadir más sulfato hasta completar el volumen de 50 ml; centrifugar a 2,300 rpm durante tres minutos. Verter el sobrenadante a una jeringa de 50 ml conectada a un sistema de microfiltración equipado con un filtro de membrana de 25 mm de diámetro y poros de 8.0 μm . Filtrar aplicando poca presión.
 5. Añadir 5 ml del cualquier colorante vital al 0.1 % y filtrar lentamente.
 6. Dejar deshidratar la membrana a temperatura ambiente.
 7. En un portaobjetos calentado a 37 °C colocar una gota de glicerol, esparcirla con una varilla de vidrio y colocar encima la membrana, procurando que no queden burbujas de aire atrapadas; añadir otra gota de glicerol y esparcirla con cuidado; dejar que la membrana se transparente (este proceso se puede acelerar si se coloca el portaobjetos en una incubadora a 37 °C). Montar el cubreobjetos y observar con el microscopio usando los objetivos de 10 y 40 aumentos y contar los huevos teñidos y sin teñir.
 8. Incubar la preparación a temperatura ambiente, en la obscuridad, durante 21 días. Al término observar si hay huevos embrionados y comparar los resultados con el resultado inicial.

3. CÁLCULO DE RESULTADOS

Contar todos los huevos de helmintos que se encuentren en la preparación y expresar los resultados como número total de huevos por litro. Pueden enlistarse las diferentes especies identificadas.

A N E X O IV

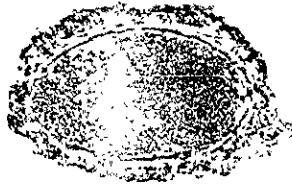
FOTOGRAFÍAS DE LOS RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS HUEVOS DE HELMINTOS MEDIANTE TÉCNICAS DE TINCIÓN, TOMADAS TANTO EN MUESTRAS PREPARADAS CON UNA SUSPENSIÓN DE HUEVOS COMO DE MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES CRUDAS Y TRATADAS DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE LA UNAM.

LÁMINA I - II. Huevos de *Ascaris suum* en diferentes etapas de desarrollo embrionario.

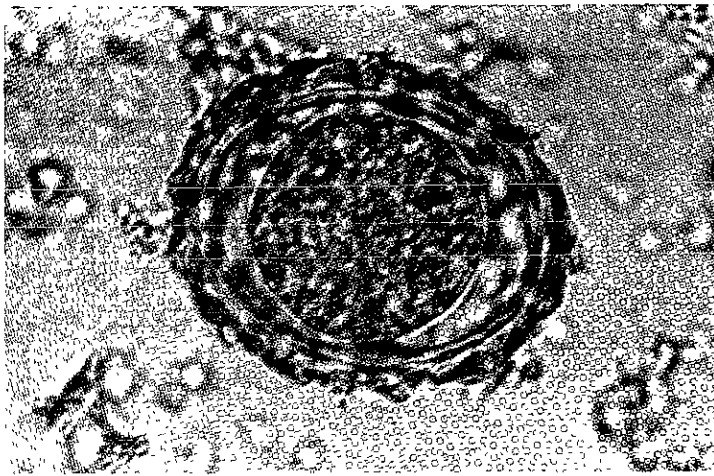
LÁMINA III-V Fotografías de muestras preparadas con una suspensión de huevos viables y no viables, recientemente extraídos de una hembra grávida de *Ascaris suum* teñidos con diferentes colorantes biológicos. Aumento: 40X 2X 3.2

LÁMINA VI-VIII Huevos de helmintos aislados de muestras de la planta de tratamiento de la UNAM, mediante la técnica F/TM en combinación con colorantes biológicos. Contraste de fases. Aumento: 40X 2X 3.2

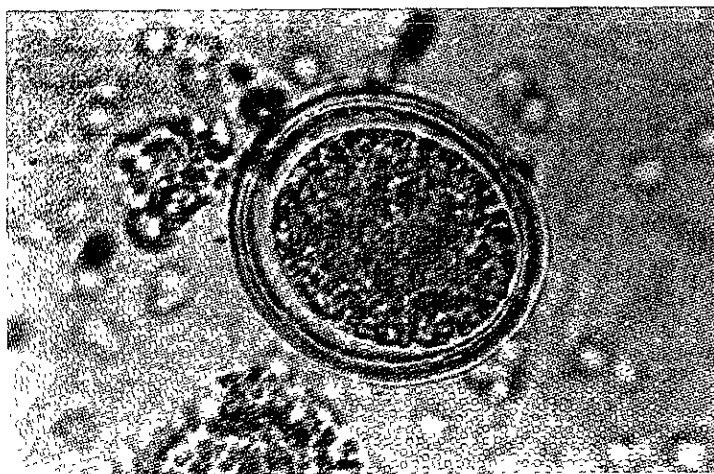
LÁMINA VIII-IX Huevos de helmintos aislados de muestras de agua cruda, mediante el raspado del filtro de membrana de la planta de tratamiento de la UNAM. Campo claro. Aumento: 40X 2X 3.2.



Fot. 1 Huevecillo corticado y no fecundado de *Ascaris suum* aislado de una muestra testigo. Aumento: 40X 2X 3.2.

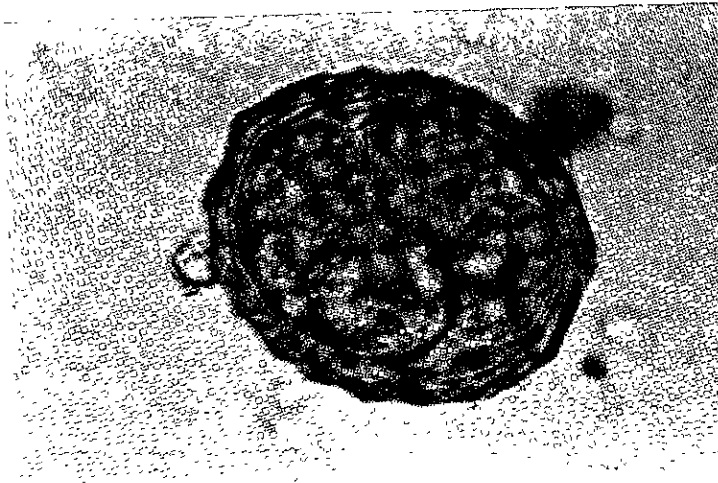


Fot. 2 Huevecillo fecundado viable de de *Ascaris suum*, en primera fase de desarrollo embrionario, aún conserva la cubierta externa mamelonada, aislado de una muestra teñida con solución Lugol. Aumento: 100X 2X 3 2.

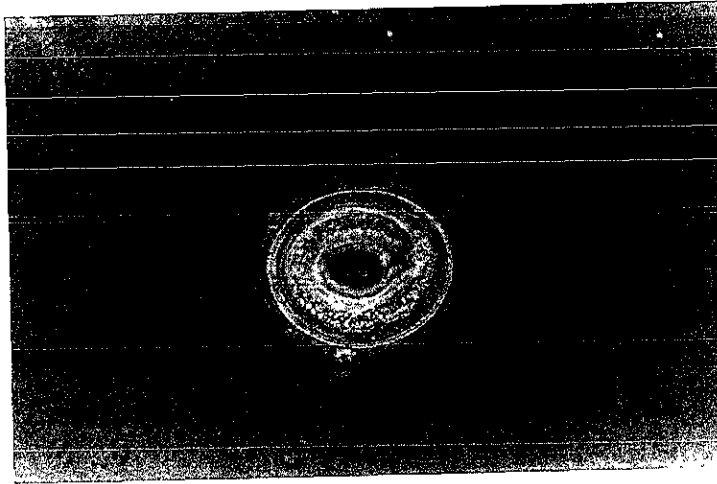


Fot. 3 Huevecillo fecundado viable de *Ascaris suum*, en primera fase de desarrollo embrionario, descorticado. Aislado de una muestra testigo. Aumento: 100X 2X 3.2.

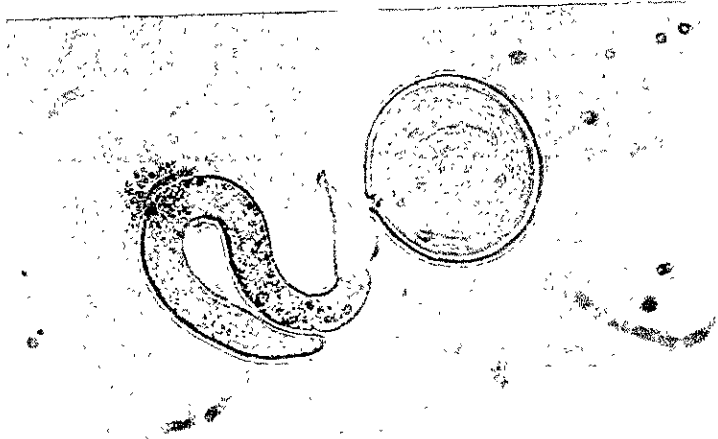
LÁMINA II



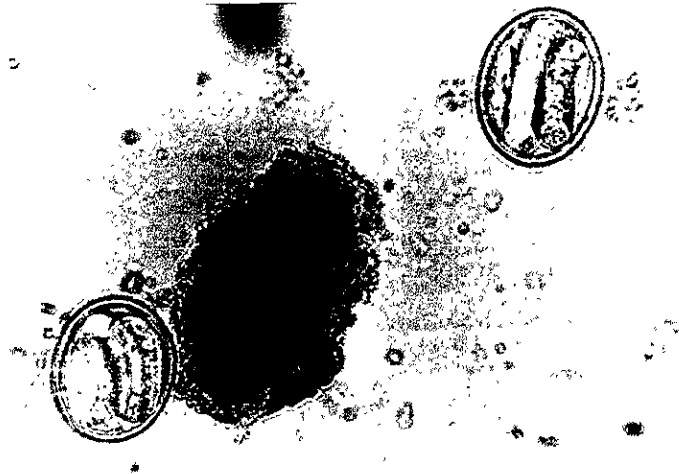
Fot. 4 Huevecillo fecundado viable de *Ascaris suum*, en la fase de desarrollo embrionario de cuatro células, aún conserva su cubierta externa mamelonada. Aislado de una muestra teñida con solución Lugol. Aumento: 100X 2X 3.2.



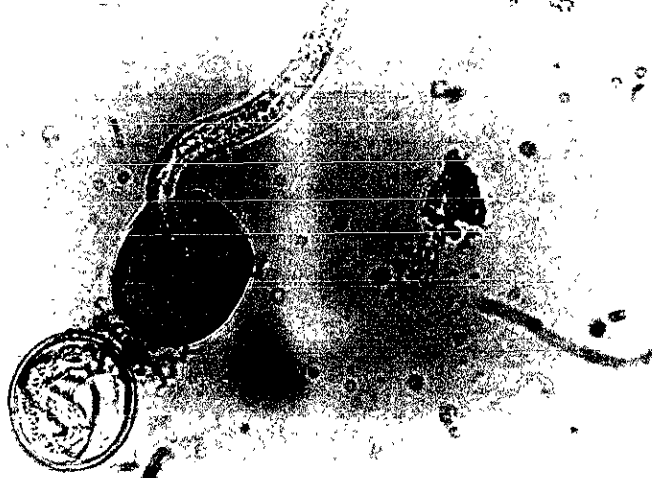
Fot. 5 Huevecillo fecundado viable descorticado de *Ascaris suum*, en fase de desarrollo larval, aislado de una muestra teñida con Azul Tripán. Aumento: 40X 2X 3.2.



Fot. 6 Huevecillo de *Ascaris suum*, ya eclosionado, aislado de una muestra testigo. Aumento: 40X 2X 3.2.



Fot. 7 Huevos de *Ascaris suum* en etapa larval y no fecundado. (al centro), aislado de una muestra sintética. Teñidos con Azul Tripán.



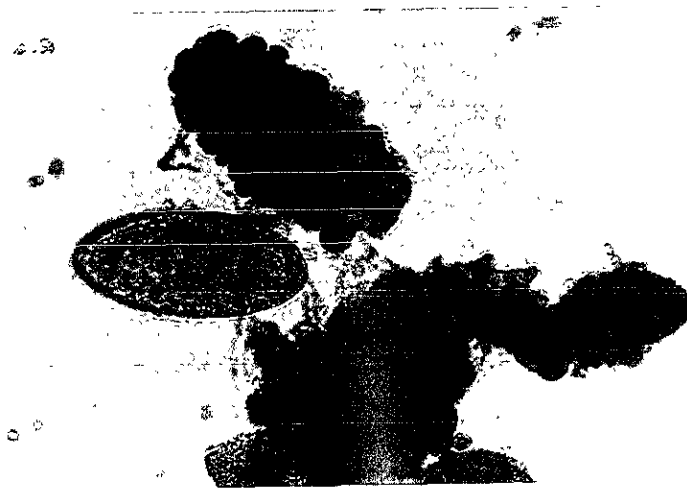
Fot. 8 Huevos de *Ascaris suum* en etapa larval y otro punto de terminar la eclosión (notese que al momento de salir la larva el colorante penetra y tiñe el cascarón), aislado de una muestra sintética. Teñidos con Azul Tripán.



Fot. 9 Huevos de *Ascaris suum* en etapa larval y no fecundado. aislado de una muestra sintética. Teñidos con Eosina "Y".



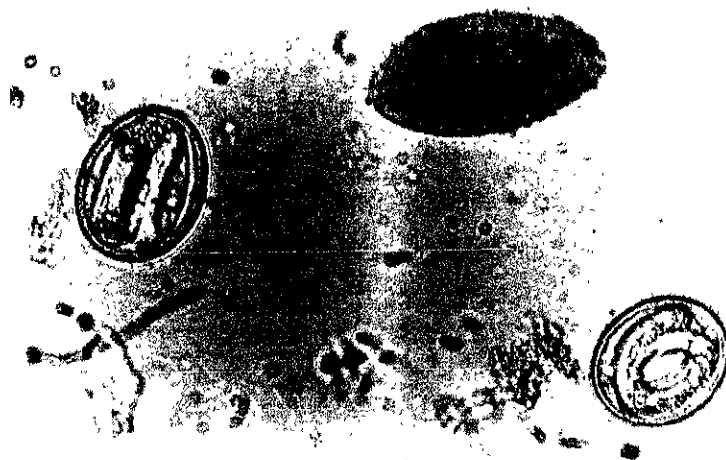
Fot. 10 Huevos de *Ascaris suum* no fecundado y en etapa larval, aislado de una muestra sintética. Teñidos con solución Lugol



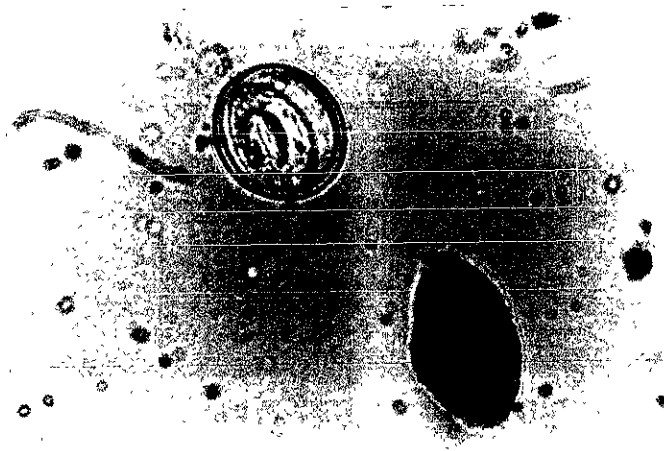
Fot. 11 Huevos de *Ascaris suum* en etapa fecunda (el no teñido) y no viables, aislado de una muestra sintética. Teñidos con Rojo Congo.



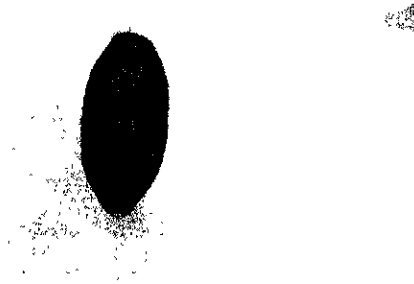
Fot. 12 Huevos de *Ascaris suum* en etapa larval y no fecundado, aislado de una muestra sintética. Teñidos con Hematoxilina.



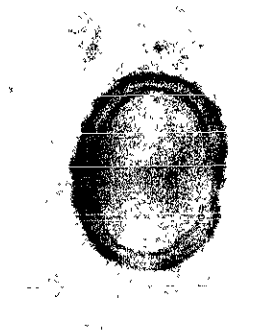
Fot. 13 Huevo de *Ascaris suum* en etapa larval y no fecundado, aislado de una muestra sintética. Teñidos con Safranina.



Fot. 14 Huevo de *Ascaris suum* en etapa larval y no fecundado, aislado de una muestra sintética. Teñidos con Azul de Metileno.



Fot. 15 Huevo de *Trichuris trichiura* no fecundado, aislado de una muestra del efl. de Lodos Activados. Teñido con Azul Tripán.



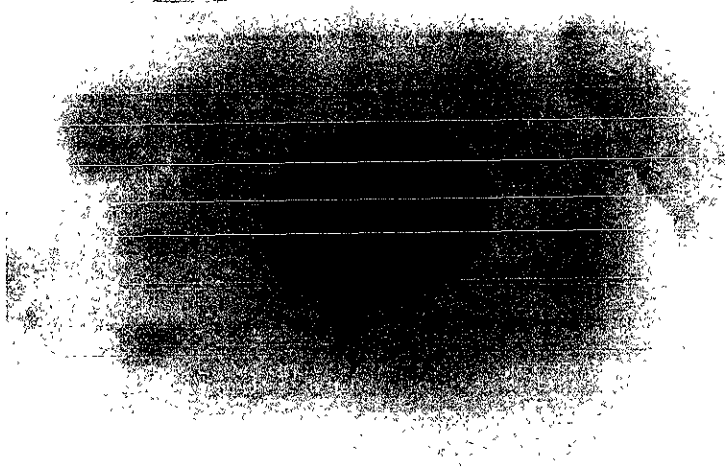
Fot. 16 Huevo de *Ascaris lumbricoides* en etapa fecunda, aislado de una muestra de agua cruda. Teñido con Azul Tripán.



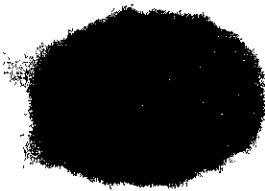
Fot. 17 Huevo de *Ascaris lumbricoides* en etapa larval, aislado de una muestra de agua cruda. Teñido con Azul Tripán.



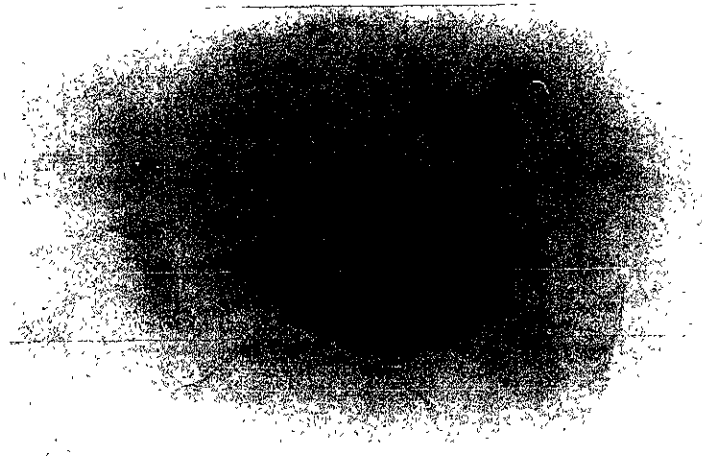
Fot. 18 Huevo de *Ascaris lumbricoides* no fecundado, aislado de una muestra del efl. del Filtro Rociador. Teñido con Azul Tripán.



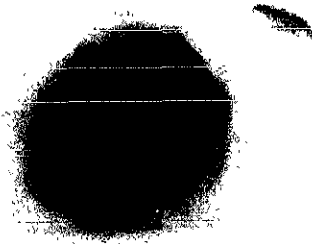
Fot. 19 Huevo de *Ascaris lumbricoides* en etapa fecunda, aislado de una muestra de agua cruda. Teñido con Eosina "Y".



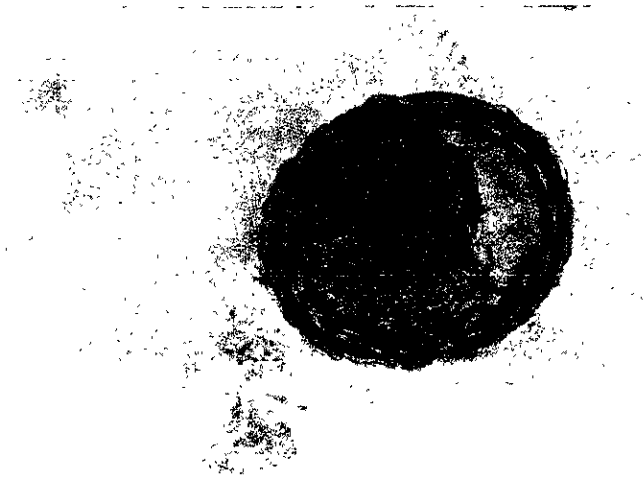
Fot. 20 Huevo de *Ascaris lumbricoides* no fecundado, aislado de una muestra del efl. del Biodisco. Teñido con Hematoxilina.



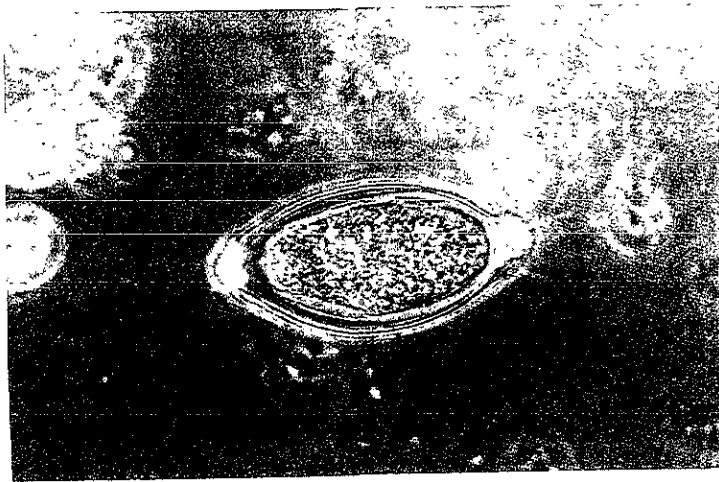
Fot. 21 Huevo de *Ascaris lumbricoides* no fecundado, aislado de una muestra de agua cruda. Teñido con Safranina.



Fot. 22 Huevo de *Ascaris lumbricoides* no fecundado, aislado de una muestra del efl. del filtro rociador. Teñido con Azul de Metileno.



Fot. 23 Huevo de *Ascaris lumbricoides* en etapa fecunda, aislado de una muestra de agua cruda. Teñido con Azul Tripán.



Fot. 24 Huevo de *Trichuris trichiura* en etapa fecunda, aislado de una muestra de agua cruda. Teñido con Azul Tripán.