

DESEMPENHO DE TÉCNICAS DE COLORAÇÃO E FIXAÇÃO PARA O *Tritrichomonas foetus* (RIEDMULLER, 1928) (PROTOZOA: TRICHOMONADIDA)

Performance of staining and fixation techniques to *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928)(Protozoa: Trichomonadida)

FOLHADELLA I.M.¹, FONSECA A.H.², JESUS V.L.T.³ & PEREIRA M.J.S.²

(1)Discente do Curso de Graduação em Medicina Veterinária - Bolsista CNPq - Pibic isabellafolhadella@hotmail.com;

(2)Professor adjunto/Parasitologia Animal/IV/UFRJ - fonseca@ufrj.br e m.salim@ufrj.br.; (3)Professora Assistente/DRAA/IZ/UFRJ.

SUMMARY: The staining/fixing techniques, used to study *Tritrichomonas foetus* morphology, had been evaluated. One hundred glasses containing a culture of this protozoa had been prepared and one drop of this culture was joined with two bovine inactive serum drops. This material was separated in groups of ten glasses and each group had been submitted to different fixing and staining techniques association. One group had been fixed by the Schaudinn and stained by iron hematoxilin. The others groups represented a combination of fixing techniques (formaldehyde, methanol and the stove in 37° c) and staining techniques (Giemsa, laveran and hemacolor). Each technique association had been evaluated by observation of one hundred specimens, being each one considered: bad (visible characteristics were less than 33%), intermediate (visible characteristics were between 33% and 66%) and good (visible characteristics were more than 66%). All the associations were good in relation to nucleus visualization, except the iron hematoxilin/ Schaudinn one, which had been considered bad. The following associations were good in relation to costa visualization: hemacolor/metanol and Giemsa/methanol; the good ones to shape visualization (piriform, fusiform and ovoid) were all them, in exception of Laveran/formaldehyde association, that was intermediate. The best visualization of the waving membrane, terminal protuberance and previous and subsequent scourges, was considered intermediate. All the techniques were bad for axostyle visualization. The association effects of fixing and staining techniques were verified in this research and it was also been that if a specific organelle is being the aim of the study, the better results can be obtained with a specific association of fixing and staining techniques.

KEY-WORDS: staining, fixation, *Tritrichomonas foetus*, Protozoa, Trichomonadida.

INTRODUÇÃO

O protozoário *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) (Protozoa: Trichomonadida), agente etiológico da trichomonose genital bovina, é associado à redução da produtividade dos rebanhos acometidos, com determinação de aborto, vaginite, endometrite, piometra, infertilidade, morte embrionária inicial, maceração fetal e redução na produção de carne e leite (ANDERSON et al., 1994; TAYLOR et al., 1994; WEIG-DONG XU et al., 1998; FELLEISEN, 1999; LÓPEZ et al., 2000; OIE, 2001).

A trichomonose bovina é uma doença venérea de ampla distribuição mundial que teve maior impacto econômico an-

tes do advento da inseminação artificial, mas, ainda é considerada uma enfermidade importante onde o uso desta técnica não é adotado (OIE, 2001). No Brasil, a doença foi diagnosticada pela primeira vez por DI PRIMO et al. (1947) citado por ROEHE (1948). Na Região Sudeste do Brasil a doença é persistente nos rebanhos (JESUS et al., 1997; FOLHADELLA et al., 2001).

Várias pesquisas vêm sendo realizadas na caracterização gênica dos trichomonádídeos. O *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843), parasito do tubo digestivo e cavidade nasal de suínos, e o *T. foetus* foram considerados, após análise das seqüências das unidades gênicas, como sendo provavelmente cepas ou variantes de uma mesma espécie (FELLEISEN et al., 1998). No entanto, na rotina laboratorial o diagnóstico,

ainda, é feito pelo isolamento do parasito em meio de cultura e visualização microscópica, sendo necessária distinção morfológica dos outros protozoários que podem ser encontrados no trato urogenital de bovinos, provavelmente devido a condições de higiene precária (TAYLOR et al., 1994).

Morfológicamente o *T. foetus* caracteriza-se por possuir formato piriforme, fusiforme ou ovóide; três flagelos anteriores livres e um quarto que se dirige até a parte posterior e é associado à membrana ondulante, que se une na sua margem interna à costa; o axóstilo que se estende do pólo anterior ao posterior, dá rigidez à célula e projeta-se formando o espinho terminal. Próximo ao pólo anterior localiza-se o núcleo e o blefaroplasto; número variado de vacúolos podem ser encontrados no citoplasma (ORTEGA-MORA et al., 1996).

Em Trichomonadida, a visualização das organelas ao microscópio óptico requer a confecção de lâminas, fixação e coloração, cujas técnicas de preparação tiveram efetividade diferentes quando usadas por diferentes autores. No estudo de aspectos morfológicos do Trichomonadida *Tetratrichomonas didelphidis* (Hegner & Ratcliffe, 1927), TASCA et al. (2001) constataram melhor desempenho da coloração de Giemsa em relação a hematoxilina férrica. Porém, MASON et al. (1976) obtiveram pior desempenho do Giemsa em relação a outras técnicas para o diagnóstico do Trichomonadida *Trichomonas vaginalis*. Estudando o *Trichomonas gallinae*, ARAÚJO (1981) constatou que as características morfológicas deste Trichomonadida eram parcialmente perdidas após a centrifugação e coloração com Laveran.

O objetivo desse estudo foi avaliar comparativamente o desempenho das técnicas de fixação por formol a 10%, metanol PA e calor a $37\pm 2^\circ\text{C}$, com as colorações por hemacolor, Giemsa e Laveran, e da técnica de fixação por Schaudinn com coloração por hematoxilina férrica para a observação das características morfológicas dos *T. foetus* presentes

rpm por 10 minutos. A fixação pelo calor foi realizada por exposição dos esfregaços à estufa a $37\pm 2^\circ\text{C}$ por 4h e a fixação pelo metanol por imersão individual de cada lâmina, contendo o esfregaço ainda úmido, por um período de três segundos. Todos os esfregaços fixados foram mantidos em estufa a temperatura de $37\pm 2^\circ\text{C}$ por 24h, antes de serem corados. Para cada um desses fixadores foram preparados 30 esfregaços, com utilização de 10 lâminas de cada técnica de fixação para cada uma das técnicas de coloração.

Procedeu-se a coloração por hemacolor imergindo cada lâmina, individualmente, durante 5 segundos no corante I e 10 segundos no corante II. Após ser retirada do corante II, foi lavada com água destilada e deixada secando em temperatura ambiente. Para a coloração por Giemsa utilizou-se a técnica segundo REY (1991). Para a coloração de Laveran, imergiram-se os esfregaços em uma solução de álcool etílico a 95% (98ml) e tintura de iodo a 10% (2ml) durante 15 minutos, em seguida no álcool etílico a 95% por 10 minutos, e corados por 45 minutos em uma solução de Giemsa (45 gotas), água destilada (15 gotas) e soro sanguíneo inativado (1ml), lavando-se em seguida com água destilada.

A fixação por Schaudinn foi realizada centrifugando-se 3ml da cultura a 3000 rpm por 10 minutos e, em 1ml do sedimento acrescentado 3ml de Schaudinn. A preparação de 10 esfregaços em lamínulas foi procedida com a cultura fixada por Schaudinn e corada pela hematoxilina férrica, seguindo a descrição de REY (1991) para a pesquisa de protozoários em fezes.

A avaliação do desempenho das técnicas de coloração/fixação foi realizada pela visualização em microscópio óptico, com o uso de ocular de 10x e objetiva de 100x, das seguintes características morfológicas: núcleo, costa, membrana ondulante, espinho terminal, axóstilo, forma do corpo (piriforme, fusiforme ou ovóide), blefaroplasto e flagelos. Para cada combinação de técnicas de coloração/fixação foram observados 10 espécimes, em cada uma das 10 lâminas.

A combinação de técnicas foi classificada como: ruim quando menos de 33% das características estavam visíveis, regular quando mais de 33% e menos de 66%, e boa quando mais de 66% das características estavam visíveis.

A técnica estatística do χ^2 foi utilizada para avaliar a magnitude dos desvios ocorridos entre as proporções de características visualizadas nas combinações de técnicas de coloração/fixação, para uma estrutura considerada, bem como para o conjunto das características morfológicas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados estão sumarizados na tabela 1, que relaciona o total de características morfológicas eviden-

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos laboratórios do Departamento de Parasitologia Animal/Instituto de Veterinária/UFRJ e de Patologia da Reprodução, Projeto Saúde Animal, Convênio Embrapa/UFRJ.

O protozoário foi obtido de uma cultura da cepa k (Itaguaí-47) mantida em laboratório. Os esfregaços em gota espessa foram preparados em lâminas, utilizando-se uma gota (20ml) da cultura ou de sedimento da cultura, fixado, misturada a duas gotas de soro bovino inativado.

A fixação por formol a 10% foi feita em tubo para centrifuga adicionando-se 1ml da cultura em 3ml de formol, que após homogeneização manual foi submetido à centrifugação a 3000

Tabela 1: Número de características morfológicas do *Tritrichomonas foetus* observadas em cem espécimes, segundo combinações de técnicas de coloração/fixação.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	COMBINAÇÕES CORANTE/FIXADOR									
	H/E	L/E	G/E	H/F	L/F	G/F	H/M	L/M	G/M	HF/S
Núcleo	98	94	89	99	96	99	100	99	99	20
Costa	52	54	61	79	39	37	81	68	75	10
Blefaroplasto	43	61	57	65	32	15	81	62	75	0
Membrana ondulante	38	38	56	57	23	9	65	52	62	0
Espinho terminal	30	44	46	62	44	52	32	20	34	3
Axóstilo	28	24	17	54	19	17	49	28	45	0
Formato*	80	84	76	75	63	73	85	78	85	97
Flagelo anterior	21	32	37	66	29	9	63	22	39	0
Flagelo posterior	22	31	32	52	23	15	51	24	30	0
Total	412	462	471	609	368	326	607	453	544	130

H = hemacolor, G = Giemsa, L = Laveran, HF = hematoxilina férrica, S = Schaudinn, E = estufa, M = metanol e F = formol 10%.

* formas piriforme, fusiforme e ovóide.

ciadas, em cem espécimes para cada uma das combinações de técnica de coloração/fixação.

Todas as técnicas de coloração/fixação foram boas para a visualização do núcleo, com exceção da hematoxilina férrica/Schaudinn. Em decorrência do baixo desempenho para a visualização das demais características analisadas, a técnica hematoxilina férrica/Schaudinn só foi avaliada para a característica formato, para a qual se obteve melhor desempenho com diferença significativa ($p \leq 0,006$) em relação às demais associações. A visualização da costa foi boa nas seguintes técnicas: hemacolor/metanol com 81%, hemacolor/formol com 79%, Giemsa/metanol com 75% e Laveran/metanol com 68%, sendo que diferença significativa ($p=0,03$) ocorreu apenas entre as combinações hemacolor/metanol e Laveran/metanol. Para a característica blefaroplasto, a associação hemacolor/metanol (81%) foi similar ($p=0,30$) à associação Giemsa/metanol com 75% desta estrutura visível. No entanto, para a visualização do axóstilo foram consideradas regular as combinações: hemacolor/formol, hemacolor/metanol e Giemsa/metanol, com 54%, 49% e 45% respectivamente. Nenhuma das combinações corante/fixador foi boa para a visualização da membrana ondulante, espinho terminal e flagelos.

Considerando o conjunto das características avaliadas, a fixação por formol proporcionou melhor desempenho para a coloração por hemacolor, em relação ao Laveran e ao Giemsa, e também quando se compara Laveran ao Giemsa ($p < 0,003$), portanto, para este fixador as melhores opções de coloração foram o hemacolor, seguido do Laveran.

A fixação pelo calor teve seu melhor desempenho ($p=0,06$) entre os contrastes hemacolor/Giemsa, com vantagem para o

Giemsa. O Laveran não diferiu significativamente do hemacolor ($p=0,51$) e do Giemsa ($p=0,64$).

Para a fixação pelo metanol os contrastes das colorações por Giemsa/hemacolor ($p=0,39$) e Laveran/Giemsa ($p=0,48$) não diferiram significativamente, ao contrário do contraste hemacolor/Laveran ($p < 0,001$) em que o melhor desempenho do hemacolor foi evidente.

O melhor desempenho da coloração por Giemsa foi quando fixado por metanol, diferindo significativamente do formol ($p < 0,001$), porém com pequena diferença quando da fixação por calor ($p=0,06$), sendo o calor a segunda melhor fixação, para a coloração com o Giemsa, superando a fixação por formol ($p < 0,001$).

Os resultados da coloração por hemacolor foram similares ($p=0,11$) para a fixação por formol e metanol, porém, estes fixadores foram significativamente melhores ($p < 0,001$) em relação a fixação por calor.

Quando usada a coloração pelo Laveran a fixação pelo calor foi melhor do que a fixação com o metanol ($p=0,04$), mas esta superou o formol ($p < 0,001$), mas não houve diferença significativa ($p=0,29$) entre a fixação pelo calor e formol como seria de se esperar. Esta aparente contradição é determinada pela distribuição das proporções das características morfológicas evidenciadas pelas associações fixador/corante. Portanto, na escolha de uma técnica devem ser consideradas as características objeto de estudo, pois apesar da superioridade de uma técnica em relação à outra em números absolutos ou sua equivalência proporcional, se um determinado grupo de caracteres forem os alvos, estes devem ser avaliados em separados.

TASCA et al. (2001) obtiveram melhores resultados com

a coloração por Giemsa em relação a hematoxilina férrica na coloração de *T. didelphidis*, obtidos de cultivo. Em estudo da morfologia de trichomonádídeos do tubo digestivo do homem e de vários animais, WENRICH (1944) também obteve melhores resultados com o corante Giemsa para parasitos de cultivos e com Hematoxilina férrica para os parasitos de amostras fecais.

Em esfregaços preparados com o conteúdo cérvico/vaginal de novilhas infectadas experimentalmente com *T. foetus* NASCIMENTO et al. (1999) obtiveram resultados satisfatórios com as técnicas de Papanicolaou e Giemsa, mas os melhores resultados foram com a coloração pelo panótico. Entretanto, MASON et al. (1976) obtiveram melhores resultados na coloração do *Trichomonas vaginalis* Donné, 1837, em preparados com material vaginal, com a coloração por Papanicolaou em relação ao Giemsa.

Na descrição da espécie *Trichomonas felis* Da Cunha e Muniz, 1922, em gato doméstico, os autores descreveram as características morfológicas em preparados com hematoxilina férrica obtidas de protozoários cultivados, e relataram o insucesso da coloração de material obtido à necrópsia, entretanto, não fazem menção ao uso de outra técnica de coloração.

Conforme pode ser constatado pela análise da literatura, há divergências nos resultados obtidos pelos autores que estudaram diversos trichomonádídeos. A preparação e coloração de material biológico exigem trabalho laborioso de adequação das técnicas. Em alguns casos, bons resultados foram alcançados em diferentes laboratórios, com determinada técnica, mas não foram em outros.

No presente estudo, constatou-se que as técnicas de fixação e coloração atuam em conjunto, e que se uma organela específica está sendo alvo do estudo, melhores resultados podem ser obtidos com uma associação fixador/corante específica. No entanto, outras variáveis devem ser consideradas, tais como as transformações morfológicas decorrentes do processo de cultivo, como a formação de pseudocisto com internalização dos flagelos e membrana ondulante, observado por GRANGER et al. (2000).

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica.

SUMÁRIO

Avaliaram-se técnicas de coloração e fixação usadas no estudo morfológico de *Tritrichomonas foetus*. Cem lâminas contendo uma gota de cultura do protozoário e dois de soro

bovino inativado foram preparadas. O material foi separado em grupos de dez lâminas e cada um submetido à observação com diferente associação fixador/corante. Um grupo foi fixado pelo Schaudinn e corado pela hematoxilina férrica. Os outros grupos, representaram uma combinação de técnicas de fixação (formol, metanol e estufa a $37\pm 2^\circ\text{C}$) e de coloração (Giemsa, Laveran e hemacolor). Cada associação de técnicas foi avaliada pela observação de cem espécimes, sendo cada uma considerada ruim (menos de 33% das características eram visíveis), regular (de 33% a 66%) e boa (mais de 66%). À exceção da técnica de hematoxilina férrica/Schaudinn, que foi ruim, as demais foram boas para a visualização do núcleo. Foram boas para a visualização da costa as combinações: hemacolor/metanol, hemacolor/formol, Giemsa/metanol e Laveran/metanol. Para visualização do blefaroplasto, hemacolor/metanol e Giemsa/metanol foram boas. Para o formato (piriforme, fusiforme ou ovóide), apenas a combinação Laveran/formol foi regular, as demais foram boas. No entanto, para visualização da membrana ondulante, espinho terminal, flagelos anteriores e posterior a melhor avaliação foi regular. Todas as técnicas foram ruins para a visualização do axóstilo. No presente estudo constatou-se a associação dos efeitos das técnicas de fixação e coloração e que se uma organela específica está sendo alvo do estudo, melhores resultados podem ser obtidos com uma determinada associação fixador/corante.

PALAVRAS CHAVE: Coloração, fixação, *Tritrichomonas foetus*, Protozoa, Trichomonadida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, M.L., BARR, B.C. & CONRAD, P.A. (1994). Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 10(3):439-61
- ARAÚJO, L.M.G. (1981). *Estudo da ocorrência e patologia da Trichomonas gallinae (RIVOLTA, 1878) em Columba livia no estado do Rio de Janeiro*. Tese de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 59p.
- FELLEISEN, R.S. (1999). Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas*. *Microbes Infect.* 1(10):807-16.
- FELLEISEN, R.S.J., LAMBELET, N. BACHMANN, P. NICOLET, J., MÜLLER, N. & GOTTSTEIN, B. (1998). Detection of *Trichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *J. Clin. Microbiol.* 36(2):513-519.
- FOLHADELLA, D.S., PEREIRA, M.J.S., JESUS, V.L.T. &

- ALVES, P.A.M. (2001). Características da distribuição da tricomonose genital bovina em rebanhos leiteiros de Rio das Flores, Rio de Janeiro, 2000-2001. In: XI JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRRJ. *Anais... Seropédica*, 11(1):513-519.
- GRANGER, B.L., WARWOOD, S.J., BENCHIMOL, M. & SOUZA, W. (2000). Transient invagination of flagella by *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol. Res.* 86:699-709.
- JESUS, V.L.T., ANDRADE, V.L.B., ALBUQUERQUE, F.T. TRÉS, J.E. & JACOB, J.C.F. (1997). A incidência das doenças da reprodução no Estado do Rio de Janeiro. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. *Anais...* Gramado, 238p.
- LÓPEZ, L.B., BRAGA, M.B.M., LÓPEZ J.O., ARROYO, R. & SILVA FILHO, F.C. (2000). Strategies by which some pathogenic trichomonads integrate diverse signals in the decision-making process. *An. Acad. Bras. Ci.* 72(2):173-186.
- MASON, P.R., HEATHER SUPER & FRIPP, P.J. (1976). Comparison of four techniques for the routine diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *J. Clin. Pathol.* 29:154-157.
- NASCIMENTO, J.M.R., GAMBARINI, M.L. & MESQUITA, A.L. (1999). Identificação do *Tritrichomonas foetus* em esfregaço do conteúdo cervico-vaginal para exame citológico. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 23(3):414-416.
- OIE (2001). OFFICE INTERNACIONAL DES EPIZOOTIES. Trichomonosis. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00050.htm. [Acessado em 19/06/2001]
- ORTEGA-MORA, L.M., PEREIRA-BUENO, J. & ROJO-VASQUEZ, F.A. (1996). Trichomonosis genital bovina (I). *Rev. Vet.* 13(1):7-13.
- REY, L. (1991). *Parasitologia*. 2.ed., Guanabara Kogan:Rio de Janeiro, 731p.
- ROEHE, R.(1948). Tricomoniase bovina. *Bol. Diret. Prod. Anim.* 3(6):21-26.
- TASCA, T., DE CARLI, G.A., GLOCK, L. & JECKELNETO, E.A. (2001). Morphologic aspects of *Tetratrichomonas didelphidis* isolated from opossums *Didelphis marsupialis* and *Lutreolina crassicaudata*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96(2):265-271.
- TAYLOR, M.A., MARSHALL, R.N. & STACK, M. (1994). Morphological differentiation of *Tritrichomonas foetus* from other protozoa of the bovine reproductive tract. *Br. Vet. J.* 150(1):73-80.
- WENRICH, D.H. (1944). Morphology of the intestinal trichomonad flagellates in man and of similar forms in monkeys, cats, dogs, and rats. *J. Morphol.* 74:189-211.
- WEIG-DONG-XU, ZHAO-RONG LUN & GAJADHAR, A. (1998). Chromosome number of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis*. *Vet. Parasitol.* 78:247-251.