



# **Técnicas de laboratorio en** **Parasitología: Nematodos**

## **RECOGIDA, ENVÍO Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS EN PARASITOLOGÍA**

El tipo de muestra que se debe recoger depende del agente parasitario que se busque, y podrá ser: heces, sangre, orina u otros fluidos, vísceras, cadáveres enteros, etc. En cualquier caso la toma de muestras ha de realizarse rigurosamente para evitar resultados erróneos.

Las **HECES** deben recogerse del recto del animal para evitar posibles contaminaciones con nematodos de vida libre. Si esto no es posible, se hará de las capas superiores, evitando el contacto con el suelo. En animales pequeños, la muestra fecal se extrae mediante un hisopo o con el propio termómetro. La extracción de las heces conviene hacerla a primera hora de la mañana y se deben tomar de 50 a 100 g en grandes animales (vacuno, équidos, etc.), 5-10 g en animales de tamaño intermedio (porcino, pequeños rumiantes, etc.) y la mayor cantidad posible en animales pequeños. Cuando se desea conocer el estado general de un rebaño debe recogerse heces de, al menos, el 10% de la población; se juntan todas esas muestras y se mezclan profusamente.

Mención especial merece la recogida de las muestras para el diagnóstico de oxiuros, pues además de evaluar su presencia en las heces, podemos recurrir a la técnica de Graham, basado en colocar una cinta adhesiva transparente en la región perianal, donde quedan pegados los huevos si están presentes. Esa cinta se pega a continuación sobre un portaobjetos y se observa directamente al microscopio.

La muestra debe trasladarse lo antes posibles al laboratorio de análisis y mantenerse refrigerada. Se recogerá en un bote hermético o en una bolsa de plástico perfectamente cerrada, siempre en ambiente húmedo y perfectamente etiquetado (identificación del animal, granja, cercado, datos del propietario, fecha y hora de recogida, etc.). Si es posible debe adjuntarse una breve anamnesis del objeto de estudio.

La **SANGRE** debe enviarse con anticoagulante, refrigerada, en tubos perfectamente identificados y, como en el caso de las heces, acompañados de la anamnesis del caso. Alternativamente, se pueden enviar frotis sanguíneos previamente fijados con metanol.

Las muestras de **ORINA** se recogen de la forma más limpia posible (mediante sonda, punción, etc.) en tubos, placas o frascos herméticos, enviándose en las mismas condiciones descritas para la sangre.

Las **VÍSCERAS** y los **CADÁVERES** se remitirán para su estudio en bolsas cerradas y rotuladas, junto con la anamnesis, refrigerados y en el menor tiempo posible.

El frío suele ser el mejor **MÉTODO DE CONSERVACIÓN** de las muestras siempre y cuando éstas lleguen a su destino en manos de 24 horas. En caso de requerir hielo, éste nunca debe contactar con el material objeto de estudio. Si el procesado de las muestras no va a realizarse en menos de 24 horas está

indicada la utilización de algún tipo de conservante. Podemos recurrir al formol, generalmente a una concentración del 5-10%, pero debemos tener en cuenta que no permite tinciones posteriores ni ninguna técnica laboratorial que requiera que el parásito esté vivo (migración larvaria, coprocultivos, etc.). Para la conservación de ejemplares adultos es muy frecuente recurrir al alcohol al 70%, que prácticamente no conlleva efectos negativos. La azida sódica es muy tóxica, pero conserva muy bien los huevos y las larvas de los nematodos.

## **MANEJO DEL MICROSCOPIO**

El microscopio óptico es una herramienta fundamental en el laboratorio de parasitología. Consta de dos partes:

➤ Parte mecánica:

- Estativo: formado por la base y el brazo donde se unen el resto de los componentes
- Platina: placa móvil y con coordenadas de situación, donde colocamos la preparación a observar sujeta mediante dos pinzas
- Tubo: pieza donde encontramos el revolver giratorio con los objetivos y los oculares

➤ Parte óptica:

- Iluminación: los microscopios llevan en la parte inferior una bombilla y un fusible que impida las graves consecuencias de las variaciones bruscas en la tensión eléctrica. Puede regularse mediante un potenciómetro, un condensador y un diafragma para limitar la amplitud de los rayos
- Ampliación: conseguida gracias a la conjunción de los efectos de oculares y objetivos. Los primeros son dos lentes a modo de lupa que aumentan el tamaño de los objetos, generalmente 10 veces (10x). Los objetivos son un sistema de lentes que van colocados en el revolver; los más empleados son los de 4x, 10x, 40x y 100x (objetivo de inmersión).

El aumento total al que vemos las imágenes resulta de la multiplicación del que proporciona el objetivo por el correspondiente a los oculares. No puede hacerse tan grande como se desee, pues es inversamente proporcional al poder de resolución (capacidad del microscopio para

que dos puntos situados uno al lado del otro puedan verse separados), por lo que aumentando demasiado la imagen podríamos llegar a hacer indistinguible la imagen. La resolución es suficiente cuando empleamos los objetivos secos, pero disminuye muy significativamente al utilizar el objetivo de inmersión; para corregirlo se usa el aceite de inmersión.

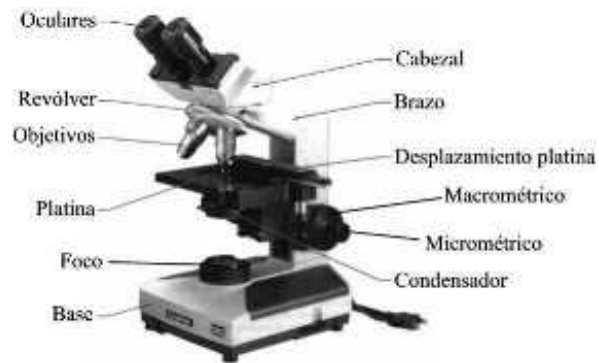


Imagen tomada de <http://claucf.blogspot.com/2009/11/objetivo-conocer-el-microscopio-su.html>

Para proceder al **ENFOQUE** de una preparación se deben seguir los siguientes pasos:

- 1.- Situar el objeto centrado en la platina y, si es posible, sujetarlo con las pinzas.
- 2.- Colocar el objetivo 4x y subir la platina con el tornillo macrométrico hasta el máximo posible
- 3.- Mirando por los oculares desplazar la platina hacia abajo hasta obtener una visión clara, que se perfecciona al máximo con el tornillo micrométrico.
- 4.- En caso de necesitar más aumento, se pueden cambiar los objetivos (10x, 40x) sin más ajustes que los que proporciona el micrométrico. Si fuera necesario llegar a los máximos aumentos (100x), es el momento de desplazar ligeramente el objetivo 40x, depositar una pequeña gota de aceite de inmersión, girar el revólver hasta colocar el objetivo de máximo aumento sobre la gota y ajustar la visión con el micrométrico.

Es importante saber que un exceso de aceite dificulta la visión, por lo que resulta imprescindible que la gota depositada sea pequeña. Además, la presencia de aceite en cualquier otro objetivo que no sea el de inmersión impide la visión; por ello, si hemos de volver a emplear cualquier objetivo seco, será necesario limpiar perfectamente la preparación con xilol. Además, terminado el estudio de la preparación, los objetivos también deben limpiarse minuciosamente con una mezcla de alcohol-éter a partes iguales.

## **MÉTODOS DE MEDIDA Y RECUENTO PARASITARIOS**

Para poder realizar MEDICIONES (necesarias para muchas identificaciones parasitarias) con un microscopio se debe proceder inicialmente a su CALIBRADO. Para ello se emplean dos accesorios del microscopio:

- 1.- Ocular micrométrico: se trata de un ocular convencional en el que el vidrio lleva grabada una escala con 100 divisiones.
- 2.- Portaobjetos micrométrico: es un portaobjetos en el que se ha grabado 1 mm dividido en 100 partes iguales, por lo que cada división mide 10  $\mu\text{m}$ .

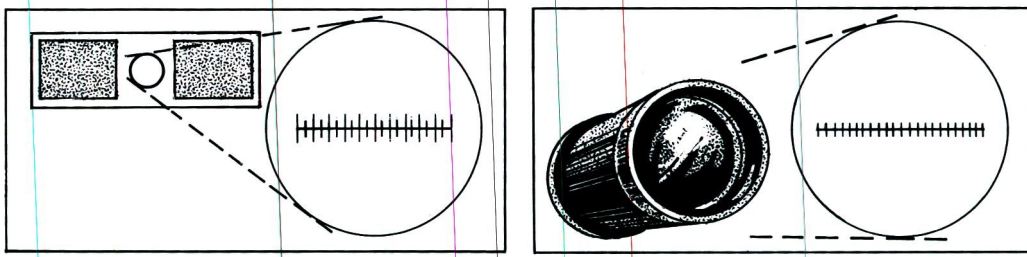


Imagen tomada de D. Thienpont y col. Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico (1977)

Para calibrar el microscopio se debe realizar el siguiente proceso con cada uno de los objetivos:

- 1.- Situar el portaobjetos micrométrico sobre la platina, sujetarlo con las pinzas y enfocararlo con el primer objetivo a calibrar.
- 2.- Hacer coincidir exactamente el 0 de la escala del portaobjetos con el 0 de la escala del ocular micrométrico. Localizar una división del ocular que coincida EXACTAMENTE con otra del portaobjetos: en el ejemplo adjunto (objetivo 40x) se trataría de la división 21 del portaobjetos con la división 56 del ocular.
- 3.- Calcular el factor de corrección del objetivo: cada división de este ocular micrométrico, empleando este objetivo 40x en este microscopio en concreto

corresponde a 
$$\frac{21(\text{división del portaobjetos}) \times 10 \mu\text{m} (\text{medida de cada división del ocular})}{56 (\text{división del ocular})} = 3,75 \mu\text{m}$$

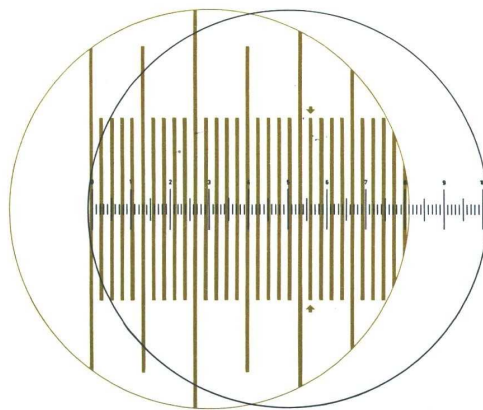


Imagen tomada de D. Thienpont y col. Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico (1977)

Para realizar la **MEDIDA** de una estructura concreta o de un verme de deberán contar las divisiones del ocular micrométrico que ocupa y multiplicarlo por el factor correspondiente al objetivo con el que estamos mirando en ese momento.

En numerosas ocasiones resulta conveniente **CUANTIFICAR LA CARGA PARASITARIA**, es decir, conocer el número de nematodos que alberga un hospedador. Ésto solamente puede conocerse con certeza

tras realizar la necropsia y aislar los parásitos adultos, sin embargo, podemos disponer de una aproximación a la carga parasitaria real determinando el número de huevos o larvas eliminados en las heces de los animales. Para ello, se emplearán técnicas diferentes según la forma parasitaria que necesitemos contar, reflejando el resultado siempre en número de formas parasitarias por gramo de heces. Aunque sean métodos rutinariamente empleados, no podemos olvidar que presentan ciertas limitaciones:

#### A) Factores que limitan la seguridad de los recuentos

- Se ha demostrado la existencia de una fluctuación diaria, bastante regular en algunas especies, en la emisión de huevos y larvas por parte de las hembras de los nematodos, lo que debemos tener en cuenta a la hora de la recogida de muestras.
- Las formas parasitarias no se encuentran uniformemente repartidas en las heces, lo que condiciona un cierto error de muestreo.
- La cantidad de heces eliminadas puede afectar al número de formas parasitarias por unidad de peso. Aunque se han propuesto diferentes sistemas para corregir el grado de humedad de las heces, lo único que se puede hacer para obtener medidas correctas es cuantificar la cantidad de formas parasitarias eliminadas en las heces recogidas durante un periodo de 24 horas, una vez mezcladas todas las muestras perfectamente.

#### B) Factores que limitan el significado de los recuentos

- La resistencia propia de cada hospedador puede provocar la disminución en la eliminación de formas parasitarias por parte del parásito adulto.
- Existen otros fenómenos que condicionan el número de formas parasitarias presentes en las heces, como por ejemplo el número de hembras adultas y la presencia de vermes inmaduros (no eliminan huevos ni larvas al no tener completamente desarrollado el aparato reproductor; sin embargo las formas inmaduras de algunos parásitos son altamente patógenas).
- La resistencia de los hospedadores puede prolongar notablemente el periodo de prepatencia propio de cada caso, pudiendo existir enfermedad parasitaria sin llegar a observarse eliminación de huevos.
- Los huevos de varias especies de nematodos no se diferencian con facilidad, por lo que el recuento muchas veces incluye huevos de diferentes especies con poder patógeno y de fecundidad muy diferentes entre sí.

Por regla general, para el recuento de huevos se suele recurrir a la CÁMARA DE Mc MASTER. Dicha cámara consta de dos compartimentos independientes, abiertos lateralmente y cubiertos por un cubreobjetos fijo. Cada compartimento tiene una altura de 0,15 cm y en la parte inferior del cubreobjetos hay trazado un cuadrado de 1 cm de lado, dividido en columnas para facilitar el recuento. De esta manera, la capacidad de

cada una de las áreas rayadas es de 0,15 cc (0,3 ml es la capacidad de las dos áreas rayadas de la cámara).

La cámara se llena cuidadosamente (con la ayuda de una pipeta Pasteur) con una suspensión de una cantidad conocida de heces en una solución de flotación y se deja reposar el tiempo necesario (unos 5 minutos) para que éstas se acumulen en la parte superior de la muestra (junto a la zona rayada). Dado que conocemos la cantidad de heces analizada, el volumen de solución de flotación en el que hemos suspendido las heces y la capacidad de la zona rayada de la cámara de Mc Master donde realizamos el recuento, podemos determinar la cantidad de huevos que elimina ese animal por gramo de heces.

En el caso de que pretendamos cuantificar el número de huevos o larvas presentes en una muestra de heces sin necesidad o posibilidad (si son demasiado pesados) de hacerlos flotar en soluciones de elevada densidad específica, debemos recurrir a la CÁMARA DE FAVATTI. En este caso se trata de un portaobjetos que lleva adherido un pequeño recipiente de 2 ml de capacidad y abierto por la parte superior. El fondo del recipiente está rallado, de manera que podemos realizar el recuento de las formas parasitarias eliminadas siguiendo las columnas marcadas.

## **EXAMEN COPROLÓGICO**

Consiste en el estudio de las formas parasitarias eliminadas con las heces (huevos, larvas o adultos). Su observación se ve influida por varios factores derivados del propio parásito (sexo, número de ejemplares, edad, momento del ciclo biológico, etc.), del hospedador (estado inmunitario, medicación con determinados fármacos, alimentación recibida, etc.) y de la propia técnica de recogida o de procesamiento de la muestra. Por ello, un análisis coprológico puntual negativo no significa necesariamente la ausencia de parasitación.

El análisis coprológico puede ser macroscópico o microscópico.

- El examen **MACROSCÓPICO** comienza con la observación de ciertas características de la muestra heces: color, consistencia, presencia de mucus o estrías sanguinolentas, etc. Esta evaluación resulta orientativa de la presencia de algunos parásitos con ciertas particularidades, por ejemplo las heces sanguinolentas en las ancilostomosis. A continuación se prepara una suspensión de una pequeña cantidad de materia fecal con agua o suero salino fisiológico en una placa de Petri y se estudia a la lupa con el fin de apreciar la presencia de vermes adultos.
- El examen **MICROSCÓPICO** se debe realizar lo antes posible. Puede tratarse de análisis cualitativos (si solamente perseguimos la determinación de presencia/ausencia de formas parasitarias en la muestra) o cuantitativos (si además queremos determinar el número de formas parasitarias presentes en la misma).

Podemos hacer una segunda clasificación de estos análisis, serán:

- **DIRECTOS:** permiten reconocer si existe una elevada eliminación de formas parasitarias, pero en caso de no observar ninguna forma parasitaria no debe descartarse la posibilidad de una parasitosis dado el pequeño tamaño de la muestra analizada. Se seguirá el siguiente protocolo:
  - o Se emulsiona sobre un portaobjetos una pequeña cantidad de heces (a ser posible tomada del centro de la masa fecal) con unas gotas de solución salina templada.
  - o Se eliminan las partículas más groseras y se mezcla perfectamente hasta conseguir una capa fina
  - o Se coloca un cubreobjetos y se observa en el microscopio.
- **INDIRECTOS:** las muestras se procesan previamente para conseguir una mayor concentración de formas parasitarias en el menor volumen posible. La descripción de aquellas técnicas indirectas más frecuentemente empleadas se realiza a continuación.

## **A- TÉCNICAS COPROLÓGICAS EN CARNÍVOROS. TÉCNICA DE BAILENGER**

### **Fundamento e indicaciones de la técnica de Bailenger**

Las características propias que diferencian las heces de carnívoros y omnívoros de las heces de rumiantes derivan, evidentemente, de la alimentación recibida. En el primer caso se suelen encontrar abundantes restos de grasa que dificultan la identificación parasitaria. Su eliminación fue el objetivo inicial de los llamados métodos difásicos, derivados de la técnica descrita por Telemann en 1908 (consiste en homogeneizar las heces en una mezcla a partes iguales de éter y ácido clorhídrico, acumulándose las formas parasitarias en el sedimento gracias a la acción disolvente de los reactivos). Sin embargo, Bailenger comprobó que la concentración parasitaria deriva de varios factores, fundamentalmente de la orientación que sufren las partículas fecales en función de su equilibrio hidrófilo/lipófilo una vez puestas en contacto con dos líquidos no miscibles (la fase acuosa y la fase lipófila de la técnica). La consecuencia es que los elementos con balance hidrófilo/lipófilo positivo se localizan en la fase acuosa y se acumulan por sedimentación, mientras que si el balance es negativo, se acumulan en la proximidad del éter formando una capa en la interfase entre los dos reactivos, con suficiente actividad como para impedir su sedimentación. A ello colaboran otros factores como la capacidad de disolución de ciertos componentes fecales por parte de los reactivos o el pH, que condiciona en parte la hidrofilia de las formas parasitarias, estableciéndose en 5 el valor que mejor se adapta a todas las posibilidades.

Con la técnica de Bailenger se obtiene una buena recuperación de los huevos habituales en las heces de carnívoros y omnívoros. Con este método se estudia una pequeña cantidad de muestra, por lo que se recomienda observar varias preparaciones (5-6, al menos) antes de emitir un diagnóstico negativo.



### **Protocolo de la técnica de Baileger**

- Pesar 3-5 g de heces, macerar en un mortero con un volumen de solución tampón 10 veces superior al de la muestra (30-50 ml). La solución utilizada tiene un pH de 5, y está compuesta por:

Acetato sódico cristalizado 0,18 M    15 g.

Ácido acético                            3,6 ml.

Agua destilada hasta 1 l y ajustar a pH 5 con ácido acético.

Dejar reposar el macerado durante 10 minutos.

- Tamizar la suspensión fecal a través de un colador con doble gasa, recogiendo el líquido en un vaso de precipitados.
- Colocar 5 ml del filtrado recogido en un tubo de centrifuga de 12 ml. Completar hasta un volumen de 10 ml con éter de petróleo o éter etílico, que quedará en la zona superior del tubo por ser poco denso.
- Mezclar, agitando enérgicamente, e inmediatamente introducir el tubo en la centrifuga, a 1500-2000 rpm durante 5 minutos.
- El tubo, una vez centrifugado presenta una serie de bandas:
  - 1- Zona superior del tubo, transparente, corresponde con los restos del éter, incluida la grasa extraída por él.
  - 2- Zona media, presenta un halo oscuro donde se acumulan detritus de naturaleza lipofílica de mayor tamaño.
  - 3- Zona amplia, verdosa, que contiene los restos del tampón y las sustancias que se han disuelto en él.
  - 4- Fondo del tubo, donde se encuentran los huevos.
- El sobrenadante se elimina y se estudia este sedimento colocando una gota del mismo y otra de agua destilada sobre un cubreobjetos y observar al microscopio.

### **B-TÉCNICAS COPROLÓGICAS DE CONCENTRACIÓN PARASITARIA POR FLOTACIÓN**

#### **Fundamento e indicaciones**

Se basa en lograr la concentración de los huevos de los parásitos por flotación en un líquido de mayor densidad específica que ellos. La densidad específica de estas formas parasitarias oscila entre 1,05 y 1,10. Se deben utilizar soluciones de suficiente densidad específica, aunque no excesivamente elevada para evitar que se deformen los huevos y que floten otras partículas sólidas presentes en las heces, por ejemplo:

- Solución azucarada de Sheather ( $\delta=1,27$ )
  - Sacarosa.....500 g
  - Fenol.....6,5 g
  - Agua dest.....320 ml

- Solución salina saturada ( $\delta=1,12$  a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\delta=1,19$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )
- Solución de Faust ( $\delta=1,18$  /  $\delta=1,2$ )
  - Sulfato de zinc.....330 g / 400 g
  - Agua destilada.....670 ml / 600 ml
- Otras posibilidades:
  - Solución saturada de sulfato magnésico ( $\delta=1,28$ )
  - Solución de nitrato sódico ( $\delta=1,36$ )

Es la técnica cualitativa más frecuentemente empleada en cualquier laboratorio de Parasitología ya que permite observar la mayoría de los huevos y larvas de nematodos.

### **Protocolo**

#### **A.- Preparación y lavado de la muestra**

A.1- Pesar una pequeña cantidad de heces (unos 3-5 g) de una muestra perfectamente homogénea.

A.2- Depositar las heces en un mortero y disgregarlas con ayuda de una pequeña cantidad de agua destilada. Añadir agua hasta alcanzar un volumen aproximado de 10 veces la cantidad inicial de heces.

A.3- Filtrar a través de un colador con una gasa doble a un vaso de precipitados y llenar con el líquido recogido tantos tubos de centrifuga como sean necesarios.

A.4- Centrifugar a 1500-2000 rpm durante 3-5 minutos y eliminar el líquido sobrenadante.

#### **B.- Concentración de las formas parasitarias por flotación**

B.1- Agitar el sedimento obtenido en los tubos centrifugados con la ayuda de una pequeña cantidad de la solución de flotación escogida. Una vez bien agitado el sedimento, llenar con la misma solución de flotación los tubos hasta el borde formando un menisco convexo.

B.2- Colocar sobre el menisco un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas de aire o la acumulación de partículas fecales groseras en la superficie del fluido.

B.3- Dejar reposar unos 20-40 minutos, de manera que se acumulen en la superficie del vidrio todas las formas parasitarias presentes en la muestra.

B.4- Recoger el cubreobjetos verticalmente y colocarlo con la superficie mojada sobre un portaobjetos para proceder a su observación al microscopio.

Una variante del método consiste en llenar los tubos sin llegar a formar menisco y, una vez transcurrido el tiempo de reposo, tomar una pequeña cantidad de muestra de la superficie del líquido utilizando el fondo de una pipeta Pasteur o el extremo de un asa de platino, colocarla entre porta y cubre y observar al microscopio en las mismas condiciones. Con esta variante no es posible asegurar la recogida de todas las formas parasitarias presentes en la muestra.

Alternativamente, y si se dispone de la centrífuga adecuada, la suspensión se puede centrifugar a 1500 rpm durante 3 minutos.

Si se desea cuantificar la muestra, se completa el apartado A del protocolo y, a continuación:

#### B.- Concentración y recuento de formas parasitarias por flotación

B.1- Agitar el sedimento obtenido en el fondo del tubo centrifugado con la ayuda de una pequeña cantidad de la solución de flotación escogida.

B.2- Una vez bien agitado el sedimento, añadir la cantidad necesaria de la misma solución de flotación para llegar a la marca realizada en el tubo en el punto A.3.

B.3- Mezclar con suavidad el líquido a analizar, cargar una pipeta Pasteur y llenar los dos compartimentos de una cámara de McMaster, dejando flotar la muestra en la cámara durante 5 minutos antes de observarla al microscopio.

B.4- El número de huevos por gramo se determina gracias a que conocemos el número de gramos de heces que analizamos y la capacidad de la cámara de McMaster.

### C- TÉCNICA DE MIGRACIÓN LARVARIA (BAERMANN)

#### Fundamento e indicaciones

Se trata de un método de enriquecimiento específico para las larvas de primer estadio de nematodos broncopulmonares, larvas de tercer estadio de nematodos gastrointestinales y nematodos del suelo (no patógenos). Se basa en el hidrotropismo de las larvas vivas, que abandonan las materias fecales si existe agua alrededor y se concentran por sedimentación. En este caso es particularmente importante que las heces que se vayan a analizar se extraigan directamente del recto para que no exista confusión con los nematodos de vida libre.

#### Protocolo

1.- Se pesan 5-10 g de heces en el caso de pequeños rumiantes y 10-20 g en el caso de vacuno y se preparan fragmentos cuadrados de gasa donde se colocan la muestra, doblándose las esquinas para formar un saco cerrado.

2.- Los paquetes de gasa son depositados sobre una malla metálica e introducidos en el aparato de Baermann, que consiste en un embudo situado en posición vertical sujeto por una barra, en él se coloca, en el extremo más estrecho, un tubo de goma cerrado mediante una pinza de Hauffmann.

3.- Se cubre la muestra con agua templada y se deja durante 6-12 h (una noche).

4.- Transcurrido ese tiempo, se abre la pinza y se recogen los primeros 10 ml de líquido en tubos de centrífuga.

5.- Los tubos se centrifugan a 1500-2000 rpm durante 5 minutos y las larvas quedan en el fondo del tubo.

6.- Se elimina el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur para no remover el fondo del tubo, dejando únicamente 1 ml.

7.- Se mezcla perfectamente el sedimento con el líquido restante y se pueden llevar a cabo dos tipos de análisis:

- a) **Cuantitativo:** Para ello toda la muestra se sitúa en una cámara de Favatti y se cuentan las larvas que aparecen en ellas, realizando los cálculos correspondientes para conocer la carga presente por gramo de heces.
- b) **Cualitativo:** Se coloca una gota de la muestra entre porta y cubreobjetos y se estudia la presencia de larvas en el microscopio. En este caso es necesario la observación de 6-9 preparaciones de cada muestra.

En ocasiones se recomienda añadir a la suspensión de larvas que se coloca sobre el porta una gota de solución yodurada, con ello mueren las larvas y es más sencillo estudiar la morfología de los vermes que aparezcan.

## **TINCIONES DE SANGRE**

La detección de formas parasitarias en sangre se pueden abordar de dos formas: análisis en fresco o visualización de tinciones

**ANÁLISIS EN FRESCO:** Puede realizarse de manera directa, observando una gota de sangre entre porta y cubreobjetos, o tras la concentración de la muestra si esperamos una escasa concentración de parásitos. Como métodos de concentración podemos recurrir a la centrifugación (1500 rpm durante 5-10 min) seguida de la visualización del sedimento, la filtración (tras hemolización con agua destilada) empleando un diámetro de poro de 2 ó 3  $\mu\text{m}$  y estudiando el propio filtro al microscopio, o la concentración por gota gruesa. Este último sistema se realiza colocando una gota de sangre sobre un portaobjetos y extendiéndola hasta cubrir una superficie doble de la original. Con ello se consigue desfibrinar la sangre y, con ello, obtener una visión más clara. Finalmente, la preparación se deja secar (al aire o en una estufa a 37°C) y se estudia al microscopio.

**COLORACIONES:** Se emplean, principalmente para la detección e identificación de microfilarias sanguíneas de los perros (géneros *Dirofilaria* y *Dipetalonema*).

a) Inicialmente debemos hacer referencia al estudio de la sangre mediante la **Técnica de Knott**, un método rápido y sencillo frecuentemente empleada para la concentración de microfilarias.

- Mezclar 1 ml. de sangre con 9 ml. de formalina al 2% en un tubo de vidrio.
- Centrifugar la mezcla durante 8 minutos a 1500 r.p.m.
- Eliminar el sobrenadante, añadir al sedimento azul de metileno al 0,1% y examinar el sedimento al microscopio.

b) Una vez detectadas, sería el momento de utilizar el **Método de la Fosfatasa Ácida** para discriminar el género y especie de que se trate.

Reactivos:

- Reactivo I

Tampón acetato veronal de Michaelis o solución de Glicina-NaOH 50 mM  
pH=10

- Reactivo II (guardar a 4 °C unas semanas)

Naphtol AS-TR-fosfato	0.05 g
N,N-dimetilformamida	5 ml

- Reactivo III (disolver el agua calentándolo, añadir HCl y enfriar. Guardar a 4°C)

Pararosanilina	1 g
Agua destilada	20 ml
HCl	5 ml

- Reactivo IV

NaNO <sub>2</sub>	4 g
Agua destilada	100 ml

- Reactivo V (verde de metilo 1%)

Solución A	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28.396 g
	Agua destilada	1000 ml

Solución B	Ácido cítrico.H <sub>2</sub> O	21.011 g
	Agua destilada	1000 ml

Solución de trabajo	Solución A	77.1 ml
	Solución B	122.9 ml
	Verde de metilo	2 g

Justo antes de su utilización se debe preparar el siguiente sustrato:

Reactivo I	20 ml
Agua destilada	50 ml
Reactivo II	4 ml
Reactivo III	3.2 ml
Reactivo IV	3.2 ml
Ajustar a pH 5 con NaOH 0.1N	

Protocolo de realización:

- Incubar las muestras con el sustrato durante 1 h a 37 °C
- Lavar con agua destilada
- Teñir con el Reactivo V durante 2-3 min
- Deshidratar con alcohol etílico 95°
- Lavar con xileno y montar

## **ESTUDIO DE ORINA Y SECRECIONES Y EXUDADOS**

Para la determinación de parásitos en orina, es necesario centrifugar la muestra recogida y observar el sedimento, directamente o una vez teñido. Se realizan

técnicas de coloración como pueden ser la de Giemsa o May Grundwald-Giemsa, basadas en eosina y azul de metileno.

#### Coloración de May Grundwald-Giemsa

- 1.- Fijar las preparaciones con metanol 100% y dejar secas sin aclarar.
- 2.- Cubrir las muestras con el colorante de May-Grundwald, manteniendo el producto durante 3 minutos.
- 3.-Lavar perfectamente las preparaciones con agua.
- 4.- Añadir el colorante de Giemsa al 50%, dejándolo actuar durante 12 minutos. Esta solución se debe preparar en el momento de su utilización.
- 5.- Lavar perfectamente los portaobjetos teñidos, dejar secar al aire, montar con DPX y observar al microscopio.

La comercialización de “kits” de tinción rápida facilita las coloraciones. Suelen ser modificaciones de técnicas clásicas que acortan el tiempo de ejecución y simplifican la realización de la técnica. Incluyen los reactivos (fijador y colorantes) preparados para su uso, se reparten en vasos individuales, y se introduce sucesivamente en ellos la preparación a estudiar durante el tiempo indicado en las instrucciones. El número de inmersiones de cada muestra en los colorantes debe ser ajustado a las condiciones particulares del laboratorio y de las muestras, pero casi nunca es inferior a tres inmersiones de un segundo de duración.

Por su parte, para la recogida de exudados (ocular, nasal, saliva, etc.) se utiliza un hisopo con el que, a continuación, se realizan las extensiones correspondientes sobre un portaobjetos. Como en el caso anterior, suele ser necesaria la tinción de las preparaciones antes de proceder a su estudio microscópico.

## **ESTUDIO DE TEJIDO MUSCULAR**

### **A) Triquineloscopia**

Es la metodología adecuada para evaluar la presencia de *Trichinella* spp en animales procedentes de matanzas domiciliarias y de cacerías.

Se trata del estudio de fibras musculares para detectar la presencia de L1 de *Trichinella* sp. La zona de elección para tomar las muestras es pilares de diafragma, en su defecto diafragma, maseteros, lengua o incluso musculatura abdominal. Se corta una muestra muscular del tamaño de una avellana, de donde se preparan, siempre en el sentido de la fibra, 14 fragmentos del tamaño de un grano de avena. El estudio debe realizar sobre 28 fragmentos en total, que se sitúan entre dos placas compresoras y se observan a 50-80-100 aumentos.

### **B) Digestión Artificial para el Estudio de *Trichinella* spp**

Es la técnica empleada para la detección de *Trichinella* spp en los mataderos. Consiste en analizar conjuntamente 1 g de musculatura extraída de 100 cerdos (100 g en total). Se extraerá el doble de muestra en caso de cerdas de cría y verracos. Si la muestra no es recogida de pilares de diafragma debe analizarse doble cantidad de músculo. En el caso de que alguno de los grupos resultara positivo ha de repetirse la digestión, pero en este caso tomando 20 g de muestra

y agrupando las muestras de 5 animales (se prepararán 20 lotes de 100 g cada uno).

Solución de digestión:

Agua caliente a 46-48 °C	2 l
Pepsina de 2000 U7g FIP (1:10000 NF)	10 g
Ác. Clorhídrico (25%)	16 ml

Protocolo de realización:

- Se pesan 100 g de tejido muscular y se pican minuciosamente.
- Se mezcla con el líquido de digestión y se incuba a 44-46 °C, en agitación a 175 rpm aproximadamente, durante 30-60 min.
- Se filtra la mezcla a través de un tamiz de 180 micras e incubar a temperatura ambiente durante 30 min antes de centrifugar una muestra de 40 ml.
- Eliminar los 30 ml superiores con cuidado y recoger el líquido restante en una placa de Petri donde se pueden visualizar las L1 de *Trichinella* spp. usando un estereomicroscopio (aumento de 15-20 veces).

## **ESTUDIO DE VÍSCERAS**

Se recurre a este sistema para localizar nematodos adultos.

- Parásitos de abomaso y estómago: se abre por la curvatura mayor y se observa macroscópicamente la mucosa. A continuación se deja la víscera en una bandeja con agua caliente durante unos 10-20 minutos (facilita el desprendimiento de los vermes), se raspa la mucosa para separar los vermes que pudieran estar anclados en la misma, se tamiza el líquido resultante y se observa en placa de Petri con la ayuda de un estereomicroscopio.

En caso de que busquemos larvas inhibidas en la mucosa (fases larvianas en hipobiosis) un raspado mecánico de la mucosa no es suficiente. En estas situaciones se recomienda hacer una digestión peptídica de la mucosa digestiva (similar a la descrita anteriormente).

- Parásitos de intestino delgado: se corta en fragmentos que se abren longitudinalmente; a continuación se procede como en el caso anterior.
- Parásitos de pulmón: se comienza abriendo la traquea, siguiendo por bronquios grandes y luego sus ramificaciones hasta llegar a la zona apical del pulmón. Además se realizan raspados del parénquima pulmonar y de la luz bronquial, que se estudian al microscopio entre cubre y portaobjetos e, incluso, se puede realizar la técnica de Baermann utilizando fragmentos de tejido pulmonar.
- Parásitos de corazón: se abren las diferentes cámaras cardíacas y la arteria pulmonar y se observa su interior.
- Además de todos ellos, podemos localizar los parásitos cavitarios o presentes en las serosas observando con detenimiento los órganos exteriormente, así como el peritoneo, omentos y la cavidad abdominal. Igualmente, puede ser necesaria la realización de biopsias de piel y tejido subcutáneo para detectar la presencia de algunos nematodos (por ejemplo *Onchocerca* spp).

## **ESPECÍMENES PARASITARIOS**

Los nematodos se pueden estudiar en fresco, simplemente montándolos con una gota de agua, o bien tras una fase inicial de aclaración con lactofenol.

Reactivo:

- Fenol                      20 ml
- Ác. Láctico              20 ml
- Glicerina                40 ml
- Agua                      20 ml
- Se puede añadir azul de algodón hasta una concentración final de 0.05%

En este caso no se trata de preparaciones permanentes, sino de colocar sobre un portaobjetos el nematodo y una gota del reactivo, situar encima un cubreobjetos y dejar que la preparación se aclare durante 24 horas antes de su observación.