

# Técnicas helmintológicas

**Dr. Rosario Antonio Tramontano** <sup>(1)</sup>

**Br. Teresa Sayanes** <sup>(2)</sup>

## PLATHELMINTOS

Haremos aquí la descripción de distintos procedimientos utilizados en nuestra mesa de labor en el Dpto. de Parasitología a efectos de la manipulación y técnica para el montaje y conservación de diversos ejemplares.

Es escasa la literatura al respecto y en mucho, las conclusiones que aquí se vierten son el fruto de experiencias personales.

Nuestra finalidad es orientar en lo posible a quienes tengan el deseo o la necesidad de realizar trabajos de la índole que hemos de tratar.

Primeramente hemos de describir las técnicas utilizadas para la conservación y montaje de gusanos chatos (Tenias). Al respecto entendemos correcto aclarar que los procedimientos utilizados para con los distintos ejemplares varían muy poco, por lo que hemos de tomar como tipo de descripción los métodos empleados con uno de los plathelminos más frecuentes en nuestros perros, cual es el *Dipylidium caninum*.

### A) **Recolección del material:**

- 1) Por deshelminización mediante medicación.
- 2) Recolección en autopsias.
- 3) Expulsión natural de anillos por parte del hospedero.

### B) **Lavado:**

Debe procederse previamente al lavado del o parte del parásito y se puede hacer de la siguiente manera: Introducción del mismo en agua tibia, renovando ésta cuando se entienda necesario. Conviene siempre antes de dar por terminada esta operación, controlar el material con una lupa; a veces partículas pequeñísimas que escapan a simple vista, pueden estar adheridas; es importante eliminarlas, dado que, pueden posteriormente entorpecer o afeor la vista de la preparación.

### C) **Fijación:**

Sucede al tiempo de lavado. Se emplean diversos fijadores. Uno de los que más nos conviene es el líquido fijador de RAILLET y HENRY, que al contener formol (fijador) y ácido acético (aclarante) cumple dos

---

(1) Ayudante Técnico (interino) del Dpto. de Parasitología. Profesor Adjunto (interino) de Enfermedades Parasitarias.

(2) Ayudante Honoraria del Dpto. de Parasitología.

finalidades. Otro fijador correcto es el alcohol a 50°. Tiene el alcohol la ventaja de no deformar el material.

**Tiempo de fijación:** La experiencia nos ha demostrado que para el ulterior montaje, es suficiente el mantenimiento en líquido fijador unas 24 horas, que pueden extenderse hasta unas 72 horas; mantener la pieza más tiempo en fijador no parece conveniente pues la preparación pierde nitidez. Se nos ocurre interesante acotar que nos ha sido prácticamente imposible aclarar convenientemente anillos de Tenias conservados mucho tiempo en formol puro o al 10% por lo que aconsejamos realizar trabajos de este tipo con material fresco en lo posible.

Si nos proponemos proceder al montaje de anillos de Tenias no debemos pasar por alto de manera alguna, una etapa sumamente importante que es el adecuado achatamiento de esos anillos. Aquí sobreviene una alternativa interesante; el achatamiento puede preceder a la fijación o bien sucederle; cualquiera de los dos caminos son viables; sin embargo nos permitimos aconsejar el segundo. La razón consiste en que el achatamiento es una operación sumamente delicada y la previa fijación le da al anillo cierta consistencia, que ayuda al operador a no fracasar en su intento. El procedimiento clásico por otra parte, consiste en colocar un trozo de estróbila, o simplemente un anillo entre dos porta-objetos; luego presionar discretamente, observando a trasluz el esbozo de la organización interior del parásito, para más tarde proceder al atado con hilo en cada uno de los extremos. Hemos obtenido óptimos resultados colocando el material en un compresor de vidrio, munido de dos tornillos o mariposas (por ej. el compresor que se utiliza en triquinoscopía) la compresión es más regular y más susceptible de ser controlada.

En esas condiciones puede mantenerse el material por algunos días en un medio líquido (agua con adición de algún fijador). Jamás debe dejarse en un medio seco en virtud de que así se corre el riesgo de que al despegar las láminas de vidrio se rompa la preparación.

Ahora bien, es indispensable para la ulterior observación de un anillo de Tenia, el pasaje por otra etapa que es la:

#### D) **Aclaración:**

Al respecto, habíamos señalado la importancia de la presencia de ácido acético en el fijador de Raillet y Henry; sin embargo hemos procedido en algunas preparaciones, a completar esa aclaración con muy buenos resultados. A tal efecto y para el parásito que estamos tratando es óptimo el resultado que brindan estos dos aclarantes: 1) Lacto-fenol de Amann y 2) Esencia de Orégano. Acaso para los Cestodes en general hemos preferido el primero, sin subestimar por cierto las propiedades del ácido acético al 10% que para el caso de los Plathelminths da muy buenos resultados.

**Tiempo de aclaración:** Hay aquí pequeñas variantes con respecto a distintos Cestodes; en general puede brindar una aclaración correcta la introducción en lacto-fenol del material tratado (o bien en esencia de orégano o ácido acético al 10%) durante un tiempo variable según el ejemplar a tratar. Tiempo que oscila entre los 5 minutos y los 60. En todo caso es conveniente controlar la pieza mediante observación con la lupa. Hay casos de preparaciones muy espesas que han obligado a la actuación del aclarante durante 24 horas. La experiencia juega aquí un papel preponderante.

Una vez aclarado convenientemente estamos en condiciones de pasar a otra etapa fundamental que es la:

**E) Deshidratación:**

A esos efectos se emplean alcoholes de distinta graduación. Puede procederse al pasaje por alcoholes a 50°, 60°, 70°, 80° y 96° y absoluto, haciendo actuar cada alcohol 24 horas (método clásico).

Sin embargo, nosotros hemos obtenido preparaciones magníficamente deshidratadas, sumergiendo el material en alcohol a 50° durante 2 horas como mínimo, procediendo de inmediato a la coloración. Claro está, que como veremos más adelante en el capítulo **coloración** esta deshidratación a priori es completado con la acción de otros alcoholes con posterioridad a la coloración.

Se hace necesario recalcar la enorme importancia de la correcta deshidratación. Podemos decir que el éxito de la preparación radica en un gran porcentaje en la efectividad y eficacia de ese procedimiento.

Obtenida la deshidratación, en lo que llamaremos en su primera etapa o fase, estamos entonces en condiciones de proceder a la coloración. Previamente digamos a modo de comentario que principalmente en el caso de los Cestodes y Trematodes es muy importante la coloración, que permite la nítida diferenciación de los distintos órganos que toman los colorantes de diversas maneras, aún cuando también es posible la observación prescindiendo de los elementos tintoriales.

**F) Coloración:**

Hay dos tipos de coloración, clásicas por otra parte, que brindan muy buenos resultados para el caso de los Cestodes y Trematodes.

1º) Coloración a base de Carmin alcohólico clorhídrico.

2º) Coloración a base de Eosina-Hematoxilina.

En ambos casos hemos procedido en forma muy similar con respecto a la coloración de cortes histológicos. La técnica empleada es la siguiente:

**a) Coloración por el Carmin alcohólico clorhídrico.**

1º) Realizada la etapa de deshidratación previa, por ej. con alcohol a 50° o bien por el sucesivo pasaje de alcoholes de distinta graduación, se introduce el elemento a teñir en el colorante, o bien, (es la técnica empleada por nosotros) se vierte con una pipeta o directamente con

el frasco un poco de colorante sobre la preparación hasta cubrirla toda.

2º) **Tiempo de actuación del colorante.** Esta etapa es delicada, pues el tiempo no es el mismo para todos los elementos a teñir; depende del espesor de la preparación; debemos tomar en cuenta que la coloración insuficiente nos priva la correcta observación de ciertos elementos anatómicos; lo mismo sucede con la sobrecoloración aún cuando en este último caso, puede tratarse la pieza sobrecoloreada mediante alcohol clorhídrico; aún así, los resultados parecen no ser los mismos. Digamos entonces que de acuerdo a los trabajos realizados por nosotros, el tiempo varía entre los tres minutos y los veinte; es un poco el caso del tiempo de aclaración; la práctica nos dice cuando una pieza está suficientemente coloreada.

3º) **Diferenciación.**

Esta etapa que sucede a la anterior, consiste en el tratamiento de la preparación por alcohol a 70º, el cual se hará gotear mediante frasco gotero; este tiempo debe ser realizado rápidamente.

4º) **Deshidratación.**

Ahora entramos en una etapa fundamental para el buen éxito de la preparación; la que llamaríamos deshidratación complementaria.

Para este tiempo procedemos de la manera siguiente:

- a) Hacemos gotear alcohol a 96º y cubrimos totalmente la preparación. Esta operación la repetimos por lo menos tres veces.
- b) Eliminado el alcohol a 96º, hacemos lo propio con alcohol absoluto.

Ahora bien, ¿cómo sabemos si la pieza está bien deshidratada? La respuesta, la brinda la próxima etapa que es la:

5º) **Diafanización.**

Para esta operación utilizamos el Xilol, el cual tiene la propiedad de diafanizar y a la vez limpiar la preparación; confirmando lo aseverado anteriormente, digamos que si al verter el xilol se producen opacidades, como especies de nubecillas, la deshidratación no ha sido correcta; entonces procede eliminar el xilol y repetir la etapa anterior mediante actuación del alcohol a 96º y absoluto. Si luego el xilol se mantiene límpido, hemos obtenido probablemente el éxito buscado y entonces sí, ya estamos en condiciones de proceder al montaje de la pieza microparasitológica.

6º) **Montaje.**

Puede realizarse entre porta y cubre con bálsamo del Canadá o bien con gelatina.

**Ventajas y desventajas:**

Evidentemente el montaje con bálsamo del Canadá es el aconsejable por cuanto permite una estabilidad y conservación de la preparación por muchísimo tiempo es la ventaja, pero es peligroso y hay que tomar severas precauciones para evitar el factor humedad.

En cambio utilizando la gelatina, se evita por completo la humedad, pero presenta el inconveniente que no se fija bien, y la más mínima maniobra torpe puede destruir la preparación.

**El factor humedad**

Es sumamente frecuente, que las preparaciones queden con humedad (deshidratación incorrecta y/o medio en el cual se trabaja — es importante al respecto el grado higrométrico). Hemos tratado de obviar este último problema evitando el montaje de piezas en días muy húmedos, o en su defecto, al proceder a la operación lo hemos hecho con la proximidad de una estufa eléctrica; pero como comprenderá el lector, esto último resulta de mucho sacrificio para el operador. Se nos ha ocurrido entonces, que este inconveniente podría sortearse fácilmente con la ayuda de un aparato de muy fácil construcción. Se trataría de una caja de madera con techo de vidrio, lo suficientemente amplia, como para permitir al operador manipular sin dificultad; al fondo de la caja una lámpara eléctrica potente aseguraría el calor suficiente y combatiría en grado sumo la humedad del medio. No está demás aclarar que la conveniencia en el uso de este arnés está principalmente indicada en la etapa postrera de la operación, es decir en el pasaje por el xilol y el montaje correspondiente.

b) **Coloración por Eosina-Hematoxilina**

Hemos procedido con una técnica similar a la utilizada para los cortes histológicos.

1º) El primer tiempo corresponde a la hidratación de la pieza, mediante el lavado suave con agua corriente.

2º) Hidratado el parásito, estamos en condiciones de hacer actuar la hematoxilina. Por otra parte, ésta debe actuar durante uno a tres minutos según los casos.

3º) Corresponde luego tirar el colorante y cubrir con agua de la canilla, hasta obtener un viraje de la coloración al tono violáceo.

4º) De inmediato lavamos suavemente con agua de la canilla y cubrimos el elemento a teñir con una solución de eosina al 1%. La acción de la eosina no debe sobrepasar del ½ minuto al minuto.

5º) **Diferenciación.** — Igual que en el procedimiento anterior la diferenciación debe ser rápida y se obtiene haciendo gotear alcohol a 70º sobre la preparación.

6º) **Deshidratación.** — Exactamente igual que para la coloración con carmín, es decir cubriendo con alcohol a 96º y repitiendo la operación unas tres veces; luego lo mismo con alcohol absoluto hasta obtener una deshidratación correcta. Luego, diafanización por Xilol.

7º) **Montaje con bálsamo del Canadá o gelatina.**

De acuerdo a lo ya indicado cuando se trató la coloración por el carmín.

8º) **Secado de la preparación por la estufa.**

Se coloca las o la preparación una vez realizado el montaje en una estufa que actúe a una temperatura de unos 20 a 25° durante por lo menos 24 horas. Es conveniente comprimir el cubre y el porta mientras actúa el secado con pinzas especiales o en su defecto con pesas de plomo. Transcurrido unos días, cuando la preparación está bien seca conviene eliminar mediante objeto cortador (escalpelo, lámina de vidrio, etc.) el exceso de báculo que a veces sobrepasa el cuadrante de cubre-objeto; es a los efectos de darle más prolijidad al trabajo realizado.

### PREPARACION Y MONTAJE DE CYSTICERCUS TENUICOLLIS

En la larva de la *Tenia marginata* o hidatígena muy común en los perros, principalmente en los perros de campaña. Se trata de una larva peritoneal, que se encuentra fundamentalmente en hospederos intermedios, tales como los rumiantes y entre ellos más que nada en los lanares.

Su aspecto macroscópico recuerda a la hidátide, de ahí su nombre (el de la tenia, *T. hidatígena*) pero además se caracteriza por presentarse como una vejiga repleta de líquido con un cuello alargado (de ahí el nombre de *C. tenuicollis*). También se encuentra mucho en suinos.

Es interesante la observación microscópica de la referida larva, cuyo escólice presenta cuatro ventosas y doble corona de ganchos, elementos que en principio se encuentran invaginados. La técnica consiste precisamente en desinvaginar los citados elementos para su observación; veamos como se procede.

Una vez obtenido el o los *cysticercus*, conviene primeramente hacerle una ligera limpieza. Luego estamos en condiciones de evaginarlos; para esto, recortamos la vesícula y extraemos el escólice invaginado; posteriormente le colocamos entre 2 porta-objetos y hacemos una presión discreta hasta obtener la evaginación completa.

### DISTINTOS ASPECTOS DE LA OPERACION

1º) **Fijación.** — Se logra como en el caso de los anillos de *Tenia* con el líquido fijador de Raillet y Henry. Naturalmente que esta fijación se logra con el *Cysticercus* comprimido entre los dos porta-objetos. Este tiempo puede tener una duración de varios días.

Nada impide completar la doble etapa de fijación y aclaración mediante el procedimiento enunciado; no obstante se puede, en casos de merecer duda la aclaración obtenida, sumergir la preparación por algunos minutos en lacto-fenol.

2º) **Deshidratación.** — Una vez fijado y aclarado el material correspondiente, puede dejarse en libertad adherido a una sola lámina para una actuación más directa del alcohol o alcoholes a emplear. Nos hemos

valido del alcohol a 50° haciéndole actuar 24 horas; en épocas de excesiva humedad hemos completado la deshidratación con alcoholes de mayor graduación hasta obtener una deshidratación correcta. Ya entonces estamos en condiciones de pasar a la:

3º) **Coloración.** — Hemos obtenido preparaciones aceptables con el empleo de Eosina (haciéndole actuar de ½ a 1 minuto); también mediante el uso del carmín. Las técnicas de coloración son las mismas expuestas anteriormente. Lo mismo con respecto a diafanización y montaje.

### PREPARACION Y MONTAJE DE ESCOLEX DE DIPYLIDIUM CANINUM

La técnica utilizada es semejante a las que hemos descrito anteriormente. Es importante recalcar que el éxito radica mucho en el tiempo de fijación. Habíamos dicho anteriormente y con respecto a los anillos de Tenia que era fundamental trabajar con material fresco; aquí sucede lo mismo, máxime que en este caso no procede el achatamiento de la pieza. Diré rápidamente el procedimiento empleado: hemos realizado dos técnicas iguales, pero en un caso se hizo actuar como aclarante el ácido acético del Raillet y Henry mientras que en el otro se completó la aclaración con lacto-fenol.

Obtenido el material y fijado en Raillet y Henry unas 36 horas fue sometido de inmediato a la deshidratación con alcohol a 50° el cual se hizo actuar 30 minutos; luego se procedió de inmediato a la coloración con Carmín clorhídrico alcohólico en algunos escólices mientras que otros se colorearon con Eosina; es el primer caso y el resultado fue satisfactorio. En el segundo caso luego de la fijación-aclaración se completó ésta con lacto-fenol durante diez minutos y luego se coloreó la pieza; en ambos casos fue dable una observación correcta, más en el segundo caso (actuación del lacto-fenol) las ventosas del escólice se presentaron mucho más nítidas, no notándose diferencias con respecto a las coronas de ganchos.

En nuestra diaria labor hemos realizado el montaje de numerosas variedades de escólices, técnicas que no describimos por cuanto son las mismas que acabamos de describir para el escólex de Dipylidium caninum.

## TREMATODES

### PREPARACION Y MONTAJE DE FASCIOLA HEPATICA

Es dentro de los Trematodes, el representante más frecuente, sobre todo en ovinos y bovinos.

Es un tanto difícil obtener preparaciones que permitan observar con nitidez la organización interna de este parásito.

Nosotros hemos obtenido algunas piezas que pueden considerarse correctas por cuanto permiten por lo menos la observación de órganos genitales y digestivos.

Se desprende de lo dicho que la primordial dificultad está precisamente en la aclaración correcta; la gran duva posee una espesa capa cuticular que dificulta la diafanización de la pieza.

Los aclarantes que hemos utilizado en los casos descritos anteriormente son para la Fasciola, de una eficacia relativa. En cambio, estamos en condiciones de asegurar de acuerdo a experiencias personales, que brinda muy buenos resultados el uso de la creosota. Evidentemente la creosota es una sustancia cáustica cuyo uso inadecuado en estos casos puede incluso determinar la desfiguración del parásito; esto último lo hemos experimentado convenientemente; la conclusión es que no puede dejarse actuar a la creosota más de 24 horas. La técnica utilizada es en términos concretos la siguiente:

- 1º) Obtenidos los parásitos, se lavan convenientemente.
- 2º) Se introducen en la creosota hasta un máximo de 24 horas.
- 3º) Se procede luego al achatamiento de la pieza con la misma técnica utilizada para el caso de los Cestodes.
- 4º) Una vez achatados se introducen en un líquido fijador, Raillet y Henry o Formol 10% o bien alcohol etc. Obsérvese que en este caso recién se procede a la fijación en una cuarta etapa la cual debe tener un mínimo de 24 horas.
- 5º) Luego de fijados los parásitos se procede al pasaje por alcoholes a efectos de la deshidratación.

6º) Una vez deshidratados pueden someterse a la coloración; hemos utilizado al efecto, indistintamente la Eosina-Hematoxilina y el Carmín Alcohólico clorhídrico de acuerdo a las técnicas descritas anteriormente.

Estas técnicas de aclaración y coloración permiten la correcta observación de órganos tales como el esófago, ciegos y sobre todo las ventosas oral y ventral; por otra parte permite observar muy bien los órganos genitales, tales como ovario, útero, glándulas vitelógenas, viteloductos, testículos, etc. Vale decir que de un parásito que al estado natural se presenta muy opaco, notándose sí, el borde más marcado, representado por la vitelógena, se obtiene una pieza clarificada que permite a simple trasluz la apreciación de órganos importantes.

## N E M A T O D E S

Es sabido, que los Nematodes presentan infinidad de variantes en su morfología, que solamente pueden apreciarse mediante la observación

microscópica; para esto, se hace necesaria la utilización de técnicas de aclaración y montaje que entramos a detallar.

Antes, debemos decir algo con respecto al procedimiento de la tinción, para el caso de los parásitos que estamos tratando; así como se hace casi indispensable teñir parásitos pertenecientes a los Cestodos y Trematodos, a efectos de la apreciación de determinados órganos, en el caso de los Nematodos puede prescindirse muchas veces de la coloración, por cuanto los elementos a observar, previa aclaración correcta, suelen aparecer con nitidez a los ojos del observador.

La experiencia, la práctica, hace que la observación macroscópica de algunos ejemplares permita el diagnóstico de los mismos, fundamentalmente cuando se conoce la fuente de origen del parásito. Pero en realidad, el verdadero diagnóstico lo da la observación microscópica, por lo cual toma verdadera importancia el conocer los métodos correctos para obtener un buen montaje. He aquí un ejemplo de diagnóstico diferencial: son muy semejantes en su aspecto la *Ostertagia* y la *Cooperia* (parásitos de los rumiantes) pero naturalmente hay diferencias morfológicas; en este caso en la bolsa causal del macho; más concretamente en las costillas 1 y 2; en la primera, es decir la *Ostertagia*, esas costillas convergen, mientras que en la *Cooperia* divergen; vale decir que en casos como éste, solamente una detenida observación microscópica permite la individualización de la especie.

### Fijación de los pequeños nematodos

Pueden utilizarse distintos fijadores. Elegimos entre otros, el formal al 10%, el alcohol a 50% y el líquido de Raillet y Henry; ya sabemos que este último es fijador y aclarante, motivo por el cual le utilizamos con mucha frecuencia aún cuando no existe inconveniente alguno para completar la aclaración con lacto-fenol o bien esencia de orégano.

### Tiempo de fijación

En general bastan 24 horas para la correcta fijación. Previo a esta operación es muy importante el prolijo lavado de la pieza parasitológica; es muy frecuente que se adhieran partículas de naturaleza diversa, principalmente trozos de mucosa, sobre todo en aquellos nematodos que poseen cápsula bucal.

Luego de fijados los ejemplares, podemos pasar a la deshidratación de los mismos. El procedimiento es similar a los enunciados anteriormente, pudiéndose hacer el pasaje en serie por los distintos alcoholes

graduados de 50° al absoluto, manteniendo la pieza 24 horas en cada uno de ellos.

Una vez deshidratado corresponde el pasaje por xilol y de inmediato el montaje del parásito, con balsamo o bien con gelatina cuidando como corresponde que no aparezca el factor humedad adoptando las mismas precauciones indicadas para los Cestodes y Trematodes.

Es difícil a veces obtener buenas preparaciones en algunos aspectos morfológicos. No ofrecen mayor dificultad de observación las cápsulas bucales; comúnmente se aprecia bien la estructura de las mismas con sus correspondientes dientes y/o denticulas; tampoco ofrecen dificultad a la observación los órganos digestivos (esófago, intestino, etc.) lo mismo cabe para los órganos genitales de la hembra; corrientemente se aprecian bien los huevos, vulva, etc.; en cambio el problema principal radica en la bolsa caudal de los machos; no siempre es dable apreciar en forma satisfactoria las costillas y su correcta disposición y número (factores de importancia diagnóstica), no así las espículas que frecuentemente aparecen nítidas. Hay otros detalles anatómicos como el gubernaculum (también elemento diagnóstico) que ofrece dificultades. En nuestra diaria labor hemos tratado de obviar en lo posible estos inconvenientes; probablemente lo hemos logrado en algunos casos.

#### **Consideraciones finales**

Tal en síntesis, es en nuestro concepto el tratamiento correcto de las piezas parasitológicas que hemos descrito; creemos que siguiendo las normas aquí enunciadas pueden obtenerse preparaciones correctas; no obstante, estimamos que es fundamental realizar estas operaciones reiteradamente para ver colmados por el éxito estos trabajos, por cuanto ya lo hemos dicho, la experiencia juega en estos casos un papel realmente importante.

No sería justo finalizar este trabajo, sin antes manifestar la importancia, que para la realización del mismo, tuvo para los autores la orientación que en todo momento nos brindara el Sr. Jefe del Depto. de Parasitología Dr. Manuel Rodríguez González, como asimismo la colaboración prestada por los ayudantes Sres. Ruben Mari, Mario Nesti y Carlos Rodríguez.

#### **NOTA:**

Era intención de los autores publicar este trabajo con las correspondientes fotografías en colores de las láminas obtenidas de acuerdo a las técnicas aquí descritas. Esto no fue posible debido al alto costo de las mismas.

No obstante quienes demuestren interés en conocerlas, pueden acudir a esos efectos al Dpto. de Parasitología.

### BIBLIOGRAFIA

- 1) LANGERON, M. — *Precis de Microscopie*. — Masson et Cie. Paris, 1925.
- 2) ROMEIS, B. — *Guía-Formulario de Técnica Histológica*, 1928.
- 3) CORTLEZZI, E. — *Parasitología Animal y Técnica Helmintológica*, 1938.
- 4) MONNING, H. O. — *Helmintología y Entomología Veterinaria*, 1947.
- 5) CRAIG, FRANKLIN CARLES y FAUST, CARROLL ERNEST. — *Parasitología Clínica*, 1951.