

## CAPÍTULO 12

# TECNICAS DE LABORATORIO

Para la identificación de las diversas formas parasitarias, es necesario procesar debidamente el material infectado utilizando adecuadamente las técnicas que se incluyen en el diagnóstico de certeza o de laboratorio, éste comprende el examen macroscópico (con pequeños aumentos) y el examen microscópico. Ambos se describen a continuación:

**Examen macroscópico.** Es la parte inicial del diagnóstico, incluye las observaciones a simple vista, con lupa y estereoscopio.

**Examen microscópico.** Se logra mediante preparaciones directas, permanentes y métodos de enriquecimiento; éstos se describen enseguida.

a) Preparaciones directas. Incluye microscopia con contraste de fases, fluorescencia, campo claro u oscuro examinándose el material en fresco o con tinciones vitales.

b) Preparaciones permanentes. El diagnóstico con este método se aplica en improntas de vísceras, gota gruesa, frotis de heces o directamente preparando protozoarios, helmintos o bacterias. Este se realiza utilizando básicamente microscopia de campo claro.

c) Métodos de enriquecimiento. Estos pueden ser mecánicos (soluciones de alta o baja densidad para heces fecales) o biológicos (Coprocultivos, higotropismo, fototropismo, xenocultivos ya sea por reproducción, concentración o mediante cultivos de sangre, heces, exudados, etc.).

En cuanto se obtenga el ejemplar con sospechas de infección parasitaria debe examinarse visualmente (examen macroscópico) piel, aletas, branquias y boca en búsqueda de quistes, coloración anormal, hemorragias externas, secreción excesiva de mucus o pústulas de las cuales se toma una muestra y se observa bajo el microscopio compuesto (examen microscópico directo).

Enseguida se disecta separando con cuidado cada uno de los órganos y branquias, los cuales son examinados macroscópicamente, incluyendo la cavidad celómica.

La identificación definitiva se realiza con la ayuda de técnicas de fijación, tinción y transparentación para lograr las preparaciones permanentes, las cuales se mencionan enseguida.

### *Microsporidios y coccidios*

1. Preparar frotis en portaobjetos de los quistes, tomando en cuenta que su localización en el pez es importante para su clasificación.

2. Fijar con alcohol sublimado.
3. Teñir con Hematoxilina férrica.

Otra manera

1. Dejar secar el frotis.
2. Fijar con Metanol Absoluto.
3. Teñir con el colorante de Giemsa.

*Myxosporidios*

De los quistes localizados en piel y agallas.

1. Comprimir entre portaobjetos y cubreobjetos para examinar tamaño y forma del quiste y cápsulas polares (se recomienda usar un poco de lugol). Examinar el material en fresco con un microscopio.
2. Fijar otros frotis en alcohol.
3. Teñir con azul de metileno. Determinar el tiempo de tinción mediante pruebas.
4. Lavar con agua.
5. Deshidratar gradualmente en alcohol etílico 70%, 80%, 90% y 100% 3 min. en c/u.
6. Transparentar en Xilol por 3-5 min.
7. Montar en Resina Sintética o Bálsamo de Canadá.

Las cápsulas polares se tiñen de azul oscuro y las esporas aparecen sobre un azul claro.

Las vacuólas yodofílicas se tiñen de café, si el frotis se realiza sobre una gota de Lugol.

Si se desea puede fijar el material, con o sin una muestra de tejido, en formol al 10% o alcohol 70%.

También puede teñirse con Giemsa o Hematoxilina.

*Ciliados*

1. Fijar el frotis de tejido o branquias en alcohol sublimado, procurando eliminar los restos de tejido.
2. Teñir con hematoxilina De la Field o de Heidenhain. Determinar el tiempo de tinción.
3. Lavar con agua destilada hasta que adquiera un color azul.

4. Si la preparación está sobreteñida, decolorar con alumbre férrico y lavar con agua destilada.
5. Deshidratar en Etanol 70%, 80%, 90% y 100 % 3 min. en cada uno.
6. Transparentar en Xilol 3.5 min.
7. Montar en Resina Sintética o Bálsamo de Canadá.

Impregnación con Plata, es útil para determinar la infraciliatura de los ciliados e identificarlos para lo cual:

1. El frotis se seca rápidamente al aire.
2. Introducir en una solución de nitrato de plata al 12% durante 5-10 min.
3. Lavar con agua destilada o irradiar con luz u. v. por 5-10 min. o exponerlos a la luz solar por varias horas.
4. Examinar la preparación al microscopio cuando tiene un color oscuro.

*Tremátodos Monogéneos*

Estos se identifican examinando los ganchos marginales y anclas del opistohaptor y el aparato reproductor

1. Colocar el tremátodo entre porta y cubreobjeto.
2. Fijar con una mezcla de glicerina alcohol.
3. Dejar evaporar el alcohol.
4. Conservar al parásito entre porta y cubreobjeto, eliminar las burbujas de aire, agregando gotas de glicerina, en el borde del cubreobjetos.
5. Limpiar el portaobjetos alrededor del cubreobjetos.
6. Sellar con laca, esmalte para uñas, o asfalto, manteniendo la preparación en posición horizontal.

*Tremátodos digéneos, céstodos y acantocéfalos*

Los tremátodos vivos se introducen en un tubo de ensaye con agua o solución salina al 0.6% y se agitan, para ayudar a su relajamiento. Luego se comprime entre portaobjetos si son muy pequeñas entre portaobjetos y cubreobjetos. Se colocan en una caja de petri y se agrega alcohol al 70%, formol al 10% o AFA por media hora o 1 hora mínimo.

Los céstodos adultos se trabajan de manera similar procurando obtener el escólex. Para fijar los acantocéfalos estos deben tener la proboscide fuera del tronco, esto se logra colocándolos en agua destilada. Céstodos y acantocéfalos se fijan y se tiñen de manera similar que los tremátodos digéneos.

Procedimiento de fijación:

1. Fijarlos entre portaobjetos y cubreobjetos, dependiendo del tamaño. Introducir entre las dos laminillas AFA o formol al 10% durante 2 hrs.
2. Lavar durante varias horas en etanol 70% o si se desea pueden preservarlos en esta misma solución por tiempo indefinido.

La tinción se realiza con carmín alumbre o carmín bórax.

Tinción con Carmín Alumbre.

1. Colocar en agua por 20 min. o más en cajas petri.
2. Introducir el colorante por 5 min. a 1 hora, según el tamaño.
3. Lavar en agua destilada.
4. Transferir a etanol 70, 80, 90 y 100% para deshidratar, durante 3-5 min. en c/u.
5. Transparentar en xilol o salicilato de metilo, colocandó el ejemplar entre dos laminillas por 30 min. a 5 horas.
6. Montar en resina sintética.

Tinción con Carmín Bórax

1. Del etanol 70% transferir al colorante durante varias horas en cajas de petri.
2. Si se sobretiñe, introducirlos en etanol acidulado (99 ml. de etanol 70% y 1 ml. de ácido clorhídrico Q.P.) se observa el estereoscopio para sacarlos al momento en que ya se hayan diferenciado las estructuras.
3. Lavar en etanol 70%.
4. Deshidratar en etanol, transparentar en salicilato de metilo y montar, igual que en la técnica anterior.

#### Nemátodos

1. Lavar en solución salina al 0.6%.
2. Introducirlos en agua caliente (hervir) sacarlos inmediatamente después de que se extiendan.
3. Fijar en Formol 5-10% o en AFA durante varias horas.
4. Preservar en alcohol al 70%.

Transparentación en glicerina.

1. Del Etanol 70%, donde pueden preservarse durante varias horas o días, se transfieren sucesivamente a la glicerina al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%

dejándolo en cada una un tiempo de 30 min a 2 horas a 40° C, según su tamaño.

2. Montar en glicerina gelatina, sellando la preparación semipermanente con negro de asfalto o esmalte de uñas.

Transparentación en Lactofenol.

1. Del Etanol al 70% transferir a lactofenol durante varias horas.
2. Examinar entonces, si se desea, colocándolos entre un portaobjetos y un cubreobjetos con gotas de Lactofenol.

La preparación semipermanente puede obtenerse de manera similar a la anterior.

#### Sanguijuelas

1. Fijar en formol 5%. En esta solución conservan su pigmentación pero pueden preservarse en etanol 70%.
2. Examinar con una lupa o con estereoscopio.

#### Crustáceos

1. Fijar igual que las sanguijuelas.
2. Transparentar en glicerina (igual que los nemátodos).
3. Montar en glicerina gelatina.

#### REACTIVOS

#### FIJADORES

1) Alcohol sublimado	Etanol absoluto	70 ml.
	Agua destilada	30 ml.

Para usarse: Calentar hasta que aparezcan vapores de alcohol a 60°C, colocar la laminilla boca abajo, en una cubeta o caja petri y bañar la laminilla con la solución. Dejarla en contacto con los vapores por 15-20 min.

- 2) AFA (Alcohol, Formol, Acido acético).

Formol 37-40%	10 ml.
Etanol 95%	25 ml.
Glicerina	10 ml.
Agua Destilada	50 ml.
*Acido acético	5 ml.

\* Agregar antes de usarse

3) Metanol.

Utilizar de preferencia el alcohol libre de acetona. Se sumergen las laminillas de 3 a 5 min.

4) Formol 10%

Formol comercial (37-40%)	10 ml.
Agua destilada	90 ml.

COLORANTES

5) Hematoxilina (solución madre).

Hematoxilina en cristales	10 gr.
Etanol 95%	90 ml.

Preparación de la solución de trabajo.

Hematoxilina (solución madre)	10 ml.
Agua destilada	90 ml.

Se disuelve la hematoxilina en una pequeña cantidad de alcohol, luego se agrega el resto. Dejar madurar 6 semanas

6) Azul de metileno.

Azul de metileno (polvo)	3.5 gr.
Agua destilada	100 ml.

Añadir el colorante y agitar cuidadosamente. Dejar reposar unas horas. Filtrar y conservar en fresco con tapón de rosca.

7) Alumbre carmín.

Alumbre de potasio	30 gr.
Carmín de cochinillos	30 gr.
Agua destilada	400 ml.

Disolver el alumbre de potasio en agua destilada, luego agregar el colorante, agitar y filtrar.

8) Carmín Bórax.

Carmín	1.5 gr.
Borax	2 gr.
Agua destilada	50 ml.
Etanol 70%	50 ml.

Disolver el colorante en etanol 70%, por separado disolver el Bórax en el agua destilada, agitando. Mezclar ambas soluciones y filtrar.

9) Colorante de Giemsa (solución madre).

Colorante en polvo	3.8 gr.
Glicerol	125 gr.
Metanol (libre de acetona)	373 gr.

Disolver el colorante en la glicerina aproximadamente a 60° durante una hora. Dejar enfriar. Filtrar y agregar el metanol, agitando cuidadosamente. Guardar en frasco obscuro.

La solución de trabajo se prepara de la siguiente manera:

Solución madre del colorante de Giemsa	2 ml.
Agua destilada	8 ml.

Para teñir, fijar laminillas con metanol 3 min; introducir la laminilla a la solución de trabajo durante 30-45 min.; posteriormente en una solución buffer pH 7 o 7.2 o en agua de la llave con unas gotas de colorante. Finalmente lavar la laminilla con el chorro de agua para eliminar partículas.

10) Lugol

Yodo	5 gr.
Yodo de Potasio	10 gr.
Agua destilada	100 ml.

Guardar en frasco obscuro

Mordientes

11) Alumbre férrico amoniacal al 4%

Alumbre férrico amoniacal	4 gr.
Agua destilada	100 ml.

12) Alumbre férrico amoniacal 0.25%

Alumbre férrico amoniacal	0.25 gr.
Agua destilada	100 ml.

Transportadores

13) Glicerina alcohol (para monogéneos)

Glicerina	25 ml.
Alcohol etílico	75 ml.