

Los métodos de Abelardo Gallego y Giemsa en Helmintología

POR

NICANOR ALMARZA HERRANZ

Veterinario del Instituto Provincial de Higiene de Badajoz. Diplomado por la Junta para Ampliación de Estudios e Investigaciones Científicas, en los Institutos de Veterinaria Experimental de la U. R. S. S. y de Helmintología de Moscú.

En técnica helmintológica, como es sobradamente conocido, solamente se recurre a la tinción de los ejemplares cuando se trata de anillos de cestodos o de los pequeños trematodos, y para esto se emplea casi exclusivamente la coloración por el carmín, con el subsiguiente paso a través de los alcoholes, para su deshidratación y el montaje en bálsamo del Canadá, previa aclamamiento del preparado con xilol.

También se ha utilizado el carmín asociado al ácido láctico puro que colora y aclara la mismo tiempo.

A nuestro modo de ver, estos métodos tienen la gran desventaja de dar una coloración uniforme, no poseer ninguna selectividad y por tanto hacer difícil la diferenciación de los órganos internos del parásito, ya que todos aparecen del mismo color, sin más que la variación de intensidad, por lo cual no dan contraste y resulta difícil y aburrida su utilización.

Tan es así, que en todas las técnicas se recomienda llevar muy lejos la coloración, *hasta que los testículos aparezcan en color rojo intenso a fin de tener la seguridad de que han sido teñidos todos los órganos*. Esta falta de gradación del color y, sobre todo, la carencia de metacromasia, nos pareció tan grave defecto en estos métodos que, desde el primer momento, dirigimos nuestros esfuerzos a lograr un método que permitiera llenar esta laguna y al propio tiempo fuera más fácil y hacedero que el del carmín, y por añadidura más rápido y económico, aunque esto no sea un requisito tan fundamental.

Para la consecución de estos propósitos aparecían, a nuestro entender, dos caminos fun-

damentales: uno, el seguido por el profesor Abelardo Gallego; otro, el empleo de los derivados del método de coloración de Romanowsky.

El profesor Gallego, admirando la metacromasia que se obtiene con el azul de metileno, principalmente con los azules viejos y la tionina, se lamentaba de que estos colorantes derivados de la rosanilina, que tan buenos servicios prestaban y prestan a la técnica bacteriológica, no pudieran ser utilizados en histología, ya que por su gran solubilidad en los alcoholes, son arrastrados por éstos durante el proceso de la deshidratación del preparado, con lo cual éste queda desteñido; y que aun sometidas a un tratamiento específico, las preparaciones obtenidas, no se conservan mucho tiempo.

Además, parece ser, que el profesor Gallego tenía cierta dificultad en la visión del color rojo, daltonismo, circunstancia que también influyó en la orientación que siguió hasta descubrir sus métodos de coloración a base de la fuchina fenicada y el formol, tanto para la coloración histológica, como también para la tinción del *Mycobacterium tuberculosis*, modificación del método de Könrich, así en los esputos, como en los tejidos.

Por más que no sea nuestro propósito seguir paso a paso el proceso que permitió a Gallego llegar a sus procedimientos de coloración, hemos creído conveniente explicar esto, siquiera sea someramente, a fin de hacernos una idea de la génesis de los mismos, ya que nos lleva de la mano a la justificación de nuestra predilección por ellos en este caso.

Los colores de anilina derivados del trifenil-

metano, pueden cambiar de color por la transformación de la rosanilina en pararosanilina, siendo las sales de la primera, rojas y las de la segunda, azules. Y así tenemos que el triclorhidrato de trifenilmetano, fuchina básica es un colorante rojo, el llamado clorhidrato de rosanilina, mientras que los clorhidratos de pararosanilina son colorantes azules. Esto parece ser lo conseguido por el profesor Gallego haciendo actuar sobre la fuchina, clorhidrato de rosanilina, el formol, cuyo radical metilo se unirá a la primera dando lugar a una violeta, aunque no se pueda determinar porque la reacción en el

tejido es muy compleja y hasta la fecha no se ha estudiado, este proceso, al menos que nosotros sepamos. Por otra parte, en la reacción es de tener también en cuenta el ácido fénico, si bien, nosotros creemos, que éste más actúa como mordiente que como verdadero reactivo.

Así pues, tratando los cortes teñidos por la fuchina fenicada diluida, con el formol en solución, consiguió Gallego transformar la rosanilina en pararosanilina, y por tanto cambiar el color de rojo en azul.

Pero lo más interesante de este método, es que la coloración obtenida por la transfor-

mación de la fuchina en violeta, da una gran metacromasia y lo que es todavía más interesante, se obtiene por este proceder una coloración fija, un color insoluble en alcohol y que por ende permite su empleo en la técnica histológica que exige para la deshidratación el paso por la serie de alcoholes, sin que en este tiempo desaparezca la coloración, cual ocurre con el empleo de los colores de anilina, (azul de metileno, tionina) tan ricos en gama cromática.

Además, las preparaciones logradas por este método son bastante resistentes a la acción del tiempo, lo que permite conservar prolongadamente el material de estudio.

El método fundamental de Gallego o Fuchina-Formol (fuchina acética-formol acético) y el método de coloración de las fibras elásticas y de la mucina, solos o con tinción complementaria del fondo con la solución de eosina o la de picro-indigo-carmin, son las que hemos empleado.

Método fundamental. Fuchina-formol.— Hemos operado siempre con nuestros platynosomas y con *Dicrocoelium lanceatum*, los



Platynosoma.—Método de A. Gallego

cuales se conservaban en el líquido de Barbagallo (formalina comercial, 5-5 c. c.; cloruro de sodio, 0.75 gramos y agua destilada, 100 c. c.), con lo cual considerábamos realizado el primer tiempo de fijación en formol al 10 %.

Los parásitos se trasladan a un pocillo que contiene la solución acuosa de fuchina fenicada de Ziehl (agua destilada, 10 c. c.; fuchina de Ziehl, X gotas), donde permanecen por lo menos 10-15 minutos, hasta que aparezcan bien teñidos los diferentes órganos, lo cual se controla al microscopio.

Lavado abundante en agua.

Virofijación en la solución de formol al 1 por 100, hasta que los cortes adquieran un color violeta, (agua destilada, 10 c. c.; formol, II gotas).

Lavado en agua, deshidratación en alcohol de 95° y absoluto.

Aclaramiento en xilol fenicado al 5 por 100, o en esencia de trementina fenicada al 2 por 100, o en otra esencia aclarante.

Montaje en bálsamo del Canadá.



Platynosoma s. p.—Método de Giemsa.

Como se trata de parásitos completos y no de cortes es conveniente después de la inclusión ejercer una presión suave pero intensa sobre el cubre a fin de conseguir la mayor finura posible de la preparación y por lo tanto mayor transparencia.

Para utilizar la eosina o el picro-indigo-carmin en solución, se emplea en la tinción la fuchina acética (fuchina fenicada de Ziehl, X gotas; ácido acético, 1 gota; agua destilada, 10 c. c.) y la virofijación en formol acético (agua destilada, 10 c. c.; formol, 11 gotas; ácido acético, 1 gota); después de lo cual se lava y tñe en solución de eosina al 1 por 100 durante unos segundos.

Lavado en agua, deshidratación, aclaramiento y montaje como el método fundamental.

Se puede sustituir la eosina por la solución de picro-indigo-carmin (solución acuosa al 1 por 100 de carmin de indigo, 1 parte, y solución acuosa saturada de ácido pícrico, 2 partes), que actúa durante un minuto, para la coloración de fondo complementaria.

El método de coloración de las fibras elásticas y de la mucina tiene por fundamento la sensibilización por el formol-nítrico-férrico, coloración por una solución más concentrada de fuchina fenicada y virofijación en la primera de las soluciones.

Los parásitos sacados del líquido de Barbagallo se llevan a la sensibilización en el formol-nítrico-férrico (agua destilada 10 c. c.; formol, 11 gotas; ácido nítrico, 1 gota; percloruro de hierro líquido diluido en agua al 10 por 100, 1 gota); donde se tienen de uno a dos minutos.

La coloración se efectúa directamente de la sensibilización, es decir, sin lavar, en solución de fuchina al 7'5 por 100 (agua destilada, 10 c. c.; fuchina fenicada de Ziehl, XV gotas; ácido acético, 1 gota), durante diez a quince minutos, controlando la coloración al microscopio como se dijo en el método fundamental, después de lo cual se lava y se hace la virofijación en el formol-nítrico-férrico citado, donde se tienen el tiempo necesario para que adquieran un color violeta.

Lavado en agua, deshidratación, aclaramiento y montaje en bálsamo como en el método fundamental.

También se puede dar una coloración comple-

mentaria por la eosina o el picro-indigo-carmin, como para el método de la fuchina acética, con lo que se consiguen dos variantes del método.

Como en nuestros ensayos hemos obtenido mejores resultados con los métodos propios, es decir, sin emplear coloración complementaria por las soluciones de eosina o de picro-indigo-carmin, a estos nos referiremos exclusivamente.

El cuerpo del parásito queda teñido en un violeta claro, que permite por su transparencia ver en el interior los diferentes órganos, a cuya coloración hace fondo, sobre el cual resaltan bien las distintas formaciones.

Las ventosas bucal y ventral aparecen en un color violeta-rojizo más acusado en los bordes y más claro en el fondo de las mismas. Este color es más o menos diferenciado del rojo, según el punto a que se haya llevado la virofijación por el formol o el formol-nítrico-férrico.

Los testículos aparecen de un color rojo intenso, rojo-sangre, formados por un tejido vesicular esponjoso.

El ovario es de un color rojo algo más claro que el de los testículos, de los cuales se diferencia también por tener una estructura más compacta.

El cuerpo de Mehlis aparece de un color rojo-violeta muy claro, que se diferencia mal, resalta poco sobre el fondo violeta-claro del plasma, por lo cual se hace difícil encontrarle.

Las asas dobles del ciego se nos presentan como sombreadas de violeta oscuro, por tener mucho más intensamente teñidas sus paredes laterales que las superior e inferior, por lo cual aparecen como dos trazos violeta, más teñido el lado exterior.

Las glándulas formadoras de la materia nutricia del huevo o vitelarias, quedan teñidas de un color violeta muy oscuro, resaltando admirablemente sobre el fondo violeta claro del parénquima.

Las circunvoluciones uterinas se nos presentan, por este método, de una coloración muy variada que, empezando por un color canela claro, pasa por el moreno, para terminar en un color casi negro, en las asas más próximas a la abertura genital, pareciendo que la intensidad de la coloración está bajo la dependencia del estado de maduración del huevo. También es de tener en cuenta que dichas asas uterinas tienen colo-

ración propia, que les da el color natural del huevo.

Con la coloración complementaria por el picro-índigo-carmin, las circunvoluciones uterinas aparecen en un color verde que va desde el verde claro hasta el verde prado oscuro.

El parénquima es verdoso; ciegos violeta, conteniendo en su interior, frecuentemente, formaciones que se tiñen en color violeta oscuro, probablemente residuos de materiales nutritivos. Las ventosas bucal y ventral, los testículos, el ovario y las glándulas vitelógenas, están coloreadas en violeta oscuro o rojo violeta, si la virufijación fué deficiente.

En consecuencia, los métodos del profesor A. Gallego, a base de la fuchina fenicada y el formol, dan unos resultados excelentes en la coloración de los pequeños trematodos de la oveja, y es de desear se extienda su aplicación para el estudio de estos parásitos.

Dichos métodos no han sufrido modificación por nuestra parte, a no ser que se considere como tal la prolongación del tiempo de actuación de los reactivos, única diferencia que se puede observar con las técnicas descritas por el profesor Gallego, debido a que se trata de preparaciones que tienen un grosor mucho mayor del que suelen tener los cortes histológicos con que solía operar el sabio profesor.

Métodos derivados del Romanowsky.

Los métodos derivados del Romanowsky, Giemsa, etc., tienen la gran ventaja de diferenciar las células y tejidos por sus afinidades tinctoriales hacia los colorantes básicos—azur—o por los ácidos—eosina—, cualidad que nosotros tratábamos de utilizar en nuestro favor en la técnica de la coloración helmintológica. Para ello nos hemos servido del colorante de Romanowsky-Giemsa, del comercio, diluido a razón de una gota por cada centímetro cúbico de agua destilada, previo lavado abundante para hacer desaparecer todo vestigio de formol que lleva el líquido de Barbagallo, haciendo actuar el colorante 24 horas en caja de Petri y tratando los parásitos por el xilol-acetona, en la forma que es usual en la histología para montar los cortes tratados por el Giemsa.

La utilización de estos métodos presenta bastante dificultad, ya que no es fácil obtener la

coloración deseada por motivo de tener el parásito un espesor excesivo. A pesar de ello, hemos logrado tinciones que nos demuestra ser este método uno excelente para la tinción de los pequeños trematodos, por dar un buen contraste y por ende buena diferenciación en las estructuras internas del parásito.

En las coloraciones bien logradas, los resultados son plenamente satisfactorios. Ya al ojo desnudo y por transparencia se pueden distinguir, resaltando sobre el fondo rosáceo del parénquima, las ventosas de color violáceo, los testículos, el ovario y el cuerpo de Mehlis en azul oscuro, así como las circunvoluciones uterinas que muestran al principio una coloración verdosa para terminar en canela oscuro.

Al microscopio y a pequeños aumentos, aparecen los testículos en color azul oscuro, con estructura esponjosa, bordes bien delimitados y resaltando sobre el tono rosáceo del parénquima. El ovario se nos presenta también de color azul, pero con una estructura compacta, claramente diferenciable de los testículos, los cuales pueden ser también algo violáceos.

Lo más característico de este método es la tinción tan excelente que da al cuerpo de Mehlis y que por ser, como en testés y ovario, en color azul, le hace destacarse muy bien del fondo parenquimatoso, en tanto que con las otras coloraciones se hace difícil su tinción; mejor dicho, no dan una tan resaltante tinción y por tanto es difícil su determinación.

Las ventosas bucal y ventral, faringe, esófago, bolsa del cirrus, sacos cecales del intestino, toman un color violeta azulado, tirando más al azul en el saco del cirrus y más al violeta en las asas cecales.

Las circunvoluciones uterinas aparecen en sus vueltas primarias teñidas en diferentes tonalidades del verde y en las últimas con el pigmento propio de los huevos del canela claro al canela oscuro y hasta casi negro.

El tratamiento ulterior de las preparaciones por la acetona, acetona-xilol, xilol, nos ha permitido obtener preparaciones que en la actualidad se conservan excelentemente a pesar de tener más de dos años.

No obstante, creemos necesario un estudio ulterior de este método, así como de otros de los similares, Kardos-Pappenheim, por ejemplo, y

otros, a fin de lograr plenamente estas coloraciones para la técnica helmintológica en la cual han de prestar tan excelentes servicios, como los están rindiendo en protozoología por ejemplo.

En resumen, podemos concluir este trabajo diciendo, que, como consecuencia de nuestras experiencias para la tinción de los trematodos, creemos haber obtenido notables ventajas por la utilización de los métodos del profesor A. Gallego, a base de la fuchina y el formol, empleados en soluciones y con la técnica citada y detallada anteriormente, que no es otra que la preconizada por su autor sin más que alargar el tiempo de permanencia en los reactivos colorante y virofijador y en el sensibilizante, cuando este actúa, en gracia a tratarse de parásitos completos y por tanto que su espesor supera con mucho al de los cortes microtómicos para los cuales fué utilizada la coloración por Gallego.

Así mismo, hemos obtenido excelentes pre-

paraciones con el método de Romanowsky-Giemsa, con el cual la diferenciación del cuerpo de Mehlis se consigue fácilmente y además dando un notable contraste con el fondo.

Tanto en uno como en otro método se logran preparaciones que se conservan mucho tiempo, podemos decir casi indefinidamente, ya que nuestras preparaciones están igual que el primer día.

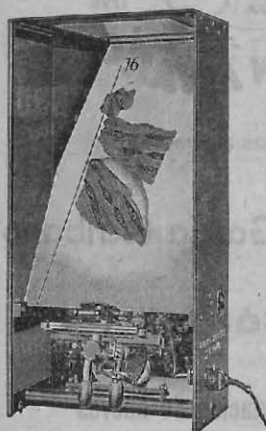
Ambos métodos permiten una mayor diferenciación en las preparaciones de los diferentes órganos, por lo cual entendemos están llamados a prestar grandes servicios para el estudio de estos parásitos y de sus estructuras internas, al propio tiempo que facilita conocimiento de las mismas, para los que empiecen a iniciarse en esta clase de estudios.

Por todo ello, terminamos recomendando una amplia difusión de estos métodos en la preparación de helmintos, singularmente, en lo que se refiere a cestodos (anillos de) y trematodos.

ZEISS

TRIQUINOSCOPIO con Bombilla incandescente

Para exámenes en serie



Carl Zeiss, Jena.

Gran iluminación de la imagen proyectada—No hace falta oscurecer completamente el local—Ocupa poquísimo sitio, ya que el triquinoscopio y la pantalla de proyección están juntos en una caja—Manejo y observación facilísimos—Gastos insignificantes.

Microscopios Winkel-Zeiss para triquinas

De primera calidad. Óptica excelente con gran campo visual.

Folletos y presupuestos gratis por la representación general para España:

Dr. Niemeyer.-Plaza de Canalejas, 3.-MADRID



GRANJA "FLORENCIA"

AGUILAR DE LA FRONTERA

Especiali-
zada
en
Conejos
"Gigantes
de
España"



Una sola
Raza
Pura sangre
"Gigante
de
España"
DIEZ años
de
selección

Concurso Provincial.-Mayo 1934

Copa de Campeonato. • La más alta recompensa en gigantes pardos. • Primer premio en gigantes blancos

Viuda de Fernando López

Cereales - Salvados

▼
**Casa especial en piensos para el
ganado**

▼
Servicio a domicilio

Precios reducidos - Peso exacto

Teléfono 21-10

Gutiérrez de los Ríos, 34 (Esquina a Regina)

CÓRDOBA



Jesús María, núm. 1

Serafín García Escribano

Córdoba

Importación de huevos

de todos los países

El Primer Premio Nacional

**en Conejos gigantes de Es-
paña leonados lo tiene la**

GRANJA AZAHARA



**PRIMEROS
PREMIOS
Y
COPAS
DE CAMPEONATO
EN
CUANTOS
CONCURSOS
SE HA PRESENTADO**

**VENTA
DE
REPRODUCTORES
GARANTIZADOS**

Visite esta Granja:

Huerta Chiquilla

(Marrubial)

**Correspondencia:
Carbonell y Morand, 6 (Productos Agro). - CÓRDOBA**

LA UNIVERSAL

**Almacenes de drogas
al por mayor y al detall**

Farmacia

Droguería

Perfumería

José Caballero Cabrera

**Desinfectantes para ganaderías - Zotal - Zoo-fenol
Sanitas - Fenol - Especialidades para Veterinaria**

**Conde de Cárdenas, 21. Teléf. 11-30
(antes Letrados)**

CÓRDOBA