



Material
Didáctico
para Estudiantes

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS: TÉCNICAS DE PARASITOLOGÍA Y MICOLOGÍA

FQByF

Facultad de Química , Bioquímica y Farmacia



Universidad Nacional
de San Luis

SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

Guías de Trabajos Prácticos: TÉCNICAS DE PARASITOLOGÍA Y MICOLOGÍA Tecnatura Universitaria en Laboratorios Biológicos

Alicia Viviana LAPIERRE
Luis Ernesto GONZÁLEZ CRISTÓFANO
Germán Darío RONCHI
Ricardo Ariel FLORIDIA

FACULTAD DE
QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2020

Decana

Dra. Mercedes Edith CAMPDERRÓS

Vice Decana

Dra. Lucía Beatriz FUENTES

Secretaria académica

Dra. Estela Isabel GASULL

Comisión de la Serie Didáctica

Coordinadora

Dra. María Cristina ALMANDOZ

Integrantes

Departamento de Bioquímica
y Ciencias Biológicas

Dra. Susana I. SÁNCHEZ

Dra. Verónica P. FILIPPA

Departamento de Farmacia

Dr. Luis A. DEL VITTO

Dra. Alejandra O. MARIA

Departamento de Química

Dra. Yamina A. DÁVILA

Dra. María de los Ángeles ÁLVAREZ

SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N° 269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudios dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acorde al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL (<http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mda.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

PRESENTACIÓN DEL CURSO TÉCNICAS DE PARASITOLOGÍA Y MICOLOGÍA

La presente guía de Trabajos Prácticos está dirigida a los alumnos del Curso: Técnicas de Parasitología y Micología de la carrera Tecnicatura Universitaria en Laboratorios Biológicos (TULB), esta asignatura es obligatoria y es parte del ciclo de formación profesional según el Plan de estudios 15/12.

Este curso se dicta para alumnos de tercer año de la carrera y brinda a los futuros técnicos las herramientas y destrezas necesarias con las que logrará una adecuada formación en procedimientos prácticos de laboratorio. Durante el curso los alumnos concurren por semana a un trabajo teórico-práctico de 4 horas de duración, con un crédito horario total de 60 horas cuatrimestrales durante las 15 semanas que dura dicho periodo.

Los contenidos del presente curso responden al perfil del profesional que se encuadra dentro del plan de estudios de la carrera y proveen al estudiante la comprensión de los principios fundamentales para la obtención y procesamiento de muestras biológicas como así también la importancia de su realización con fines de diagnóstico médico, la familiaridad con las técnicas y el manejo adecuado de los equipos que se utilizan en el laboratorio.

Esta asignatura provee contenidos teóricos mínimos necesarios para poder realizar los trabajos prácticos y adquirir destrezas necesarias en la práctica de técnicas para el diagnóstico de enfermedades parasitarias y micóticas, teniendo presente las normas de bioseguridad que se requieren para trabajar en las ciencias de la salud.

En la asignatura se trata de enriquecer la formación del futuro Técnico Universitario en Laboratorios Biológicos, haciéndolo no solo un efector de técnicas, sino un profesional formado y preparado para formar parte del equipo de salud, dándole las herramientas que lo distinguan como un posible referente del mencionado grupo.

La actual edición de esta guía presenta una organización temática, en la que se incluyen siete trabajos prácticos con las técnicas más usadas en el diagnóstico de estas patologías. Se incluyen referencias bibliográficas que contienen información de Parasitología y de Micología Médica, con el fin de orientar al estudiante.

Como condición para el cursado, las correlativas de la presente asignatura son:

Materia	Para	Condición
BIOLOGIA GENERAL Y CELULAR	Cursar	Aprobada
MATEMATICA I	Cursar	Aprobada
QUIMICA GENERAL I	Cursar	Aprobada
TALLER: INTRODUCCIÓN AL ROL PROFESIONAL	Cursar	Aprobada
BIOSEGURIDAD Y GESTIÓN AMBIENTAL	Cursar	Aprobada
MATEMATICA II	Cursar	Aprobada
QUIMICA GENERAL II	Cursar	Aprobada
FISICA	Cursar	Aprobada
ANATOMIA HUMANA	Cursar	Regular
BIOLOGIA GENERAL Y CELULAR	Rendir	Aprobada
MATEMATICA I	Rendir	Aprobada
TALLER: INTRODUCCIÓN AL ROL PROFESIONAL	Rendir	Aprobada
BIOSEGURIDAD Y GESTIÓN AMBIENTAL	Rendir	Aprobada
MATEMATICA II	Rendir	Aprobada
QUIMICA GENERAL II	Rendir	Aprobada
FISICA	Rendir	Aprobada
ANATOMIA HUMANA	Rendir	Aprobada
QUIMICA GENERAL I	Rendir	Aprobada

El equipo docente de la asignatura que trabajó en la elaboración de la presente GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS, está constituido por los siguientes docentes:

- Profesor Responsable: Dra. ALICIA VIVIANA LAPIERRE
- Profesor Co-Responsable: Esp. LUIS ERNESTO GONZÁLEZ CRISTÓFANO
- Jefe de Trabajos Prácticos: Esp. GERMÁN DARÍO RONCHI
- Jefe de Trabajos Prácticos: Mg. RICARDO ARIEL FLORIDIA

INDICE

	Página
INSTRUCTIVO PARA ALUMNOS: HÁBITOS PERSONALES Y PRÁCTICAS OPERATIVAS SEGURAS EN LABORATORIO	IV
TP 1: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	1
TP 2: EXAMEN PARASITOLÓGICO DE MATERIA FECAL	4
TP 3: PARASITOSIS HEMÁTICAS Y TISULARES	14
TP 4: COLORACIONES	32
TP 5: ESTERILIZACIÓN	46
TP 6: PREPARACIÓN DE MATERIALES, MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y COLORANTES UTILIZADOS EN MICOLOGÍA	56
TP 7: TÉCNICAS DE SIEMBRA Y AISLAMIENTO	61

INSTRUCTIVO PARA ALUMNOS. HÁBITOS PERSONALES Y PRÁCTICAS OPERATIVAS SEGURAS EN LABORATORIO

Los laboratorios son ámbitos de trabajo con riesgo potencial para las personas, por ello se requiere especialmente una actitud seria y responsable y una adecuada preparación previa al momento de ingreso.

Con el objetivo de cuidar la seguridad personal, las instalaciones, equipos y permitir el mayor aprovechamiento de las prácticas de laboratorio, se indican a continuación una serie de acciones.

A.-Normas de conducta del alumno en el laboratorio

1.- En todos los casos los alumnos deben demostrar sus conocimientos de las actividades a realizar, de la teoría que las sustenta, de los riesgos y medidas de seguridad, tanto previo a la práctica de laboratorio como durante el transcurso de toda la realización de la práctica experimental.

2.- Se recomienda trabajar con orden y método, manteniendo las mesadas libres de elementos innecesarios. Los artículos personales, deben dejarse en un lugar habilitado a tal fin.

3.- No está permitido ingresar ni consumir alimentos ni bebidas en el laboratorio.

4.- No está permitido fumar en el laboratorio.

5.- Las alumnas/os que posean cabellos largos deben usarlo recogido durante las actividades prácticas.

6.- No se debe pipetear ni probar sustancias con la boca, para tal fin se debe usar propipetas.

7.- No se deben oler las placas con cultivos.

8.- Es obligatorio el uso del guardapolvo y guantes de látex en el laboratorio.

9.- No está permitido descartar ningún tipo de sustancia líquida o sólida sin consultar previamente al encargado del trabajo práctico.

10.- Ante un accidente, lastimadura, quemadura, rotura de material, etc. avisar inmediatamente al docente a cargo (no ocultar) y no tomar ninguna acción sin consultar. Se sancionará el ocultamiento del hecho.

11.-En caso de emergencia en primer lugar guardar la calma y luego atender en todo momento las instrucciones del jefe de trabajos prácticos quien indicará cómo proceder.

12.- Lavarse las manos después de finalizar el trabajo práctico y luego de toda operación donde hubo contacto con material irritante, cáustico, tóxico o patógeno.

- 13.-Conectar equipos a la red eléctrica previa autorización.
- 14.- Al finalizar el trabajo práctico dejar todo el material ordenado, mesadas limpias, mecheros cerrados, microscopios ópticos apagados, limpios y cubiertos.
- 15.-Esperar el consentimiento del encargado del trabajo práctico para retirarse del laboratorio.
- 16.-Las puertas y ventanas deben permanecer cerradas a fin de evitar corrientes de aire cuando se realicen cultivos.

B.-Normas de procedimiento generales en el laboratorio

- 1.- Al usar material de vidrio comprobar su perfecto estado (no usar material sucio, con roturas o rajaduras).
- 2.- Cuando se calienta un material de vidrio (por ej. al preparar medios o esterilizar) diferenciarlo perfectamente del material frío, dado que presentan ambos el mismo aspecto.
- 3.-Se deben seguir las normas de calentamiento cuando se utiliza fuego directo de muestras de tubos de ensayo, vasos etc., para evitar proyecciones sobre uno mismo u otra persona. Evitando de esta forma posibles accidentes y quemaduras.
- 4.-Los productos inflamables (alcohol, éter) no deben estar cerca de fuentes de calor. Si se necesita calentar recipientes con estos productos se hará en baño termostatzado.
- 5.-Si se trabaja con sustancias que emiten vapores tóxicos se debe trabajar bajo campana de extracción o en su defecto en lugares con buena ventilación.
- 6.- Comprobar cuidadosamente los rótulos de los envases antes de utilizarlos, de la misma manera contribuir al mantenimiento de las etiquetas en buen estado.
- 7.-No volver al frasco de origen los sobrantes de los reactivos utilizados, a menos que sea justificado por el responsable del laboratorio.
- 8.- No dejar envases abiertos.

C.-Normas de desecho de residuos en el laboratorio

- a.- Pueden desecharse por la cañería los residuos hidrosolubles, dejando correr el agua en volúmenes muy superior al desechado. No tirar productos biodegradables.
- b.- No pueden desecharse por la cañería mezclas o compuestos insolubles que puedan producir bloqueo de las cañerías ni sustancias químicas de alta toxicidad.
- c.- Los residuos patógenos potenciales se deben desechar en bolsas rojas colocadas en recipientes provistos para tal fin.

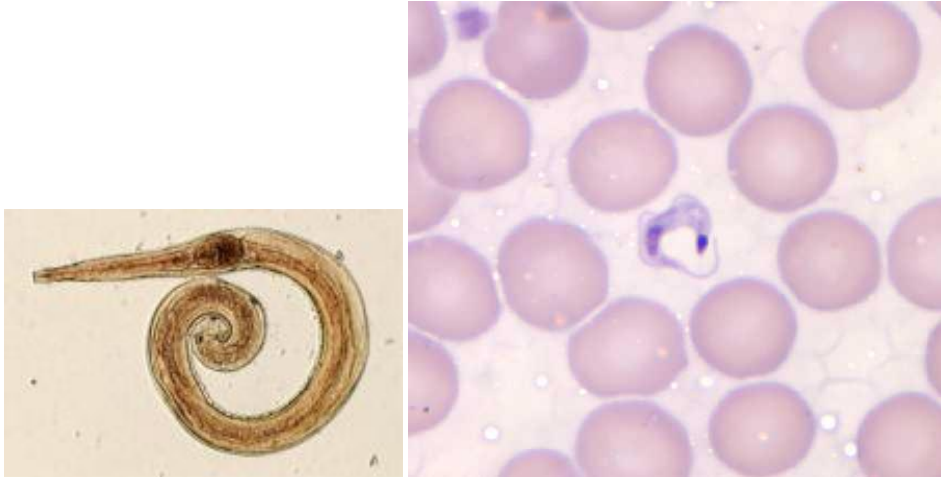
La seguridad se aprende, es un tema siempre actual para todas las personas y especialmente para aquellas que trabajan o se desempeñan en un laboratorio. Los accidentes ocurren mayormente por el mal comportamiento de las personas debido a la falta de conocimiento y/o a la falta de medidas.

Los principios de bioseguridad se pueden resumir en:

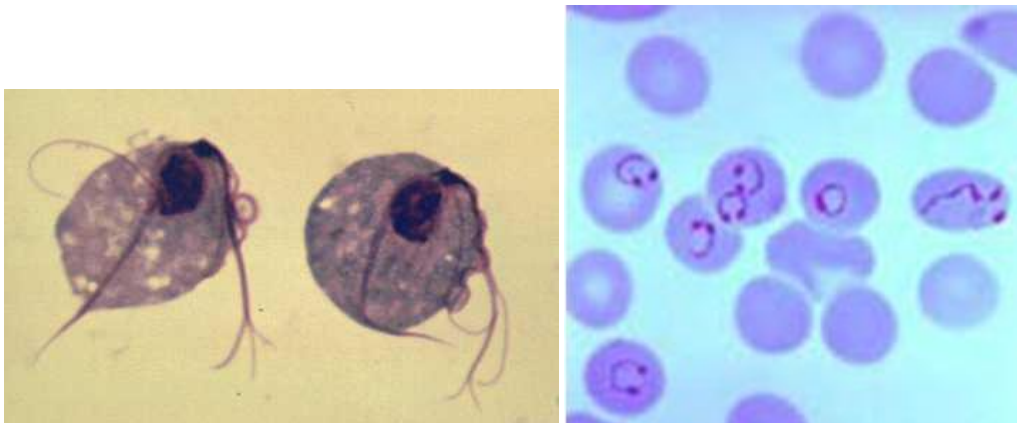
A) Universalidad: Todo el personal debe seguir las precauciones estándares rutinariamente para prevenir la exposición de la piel y de las membranas mucosas, en todas las situaciones que puedan dar origen a accidentes, estando o no previsto el contacto con sangre o cualquier otro fluido corporal. Estas precauciones, deben ser aplicadas para TODAS las MUESTRAS, independientemente de presentar o no patologías.

B) Uso de barreras: Comprende el concepto de evitar la exposición directa a sangre y otros fluidos orgánicos potencialmente contaminantes, mediante la utilización de materiales adecuados que se interpongan al contacto de los mismos. La utilización de barreras (ej. guantes) no evitan los accidentes de exposición a estos fluidos, pero disminuyen las consecuencias de dicho accidente.

C) Medios de eliminación de material contaminado: Comprende el conjunto de dispositivos y procedimientos adecuados a través de los cuales los materiales utilizados son depositados y eliminados sin riesgo.



Parasitología



TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N.º 1: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Objetivo del trabajo práctico:

- Preparar correctamente las soluciones a utilizar y los recipientes para exámenes coproparasitológicos.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A) Solución conservadora o solución formolada al 5 %

Esta solución se utiliza para conservar las muestras de materia fecal, cuando éstas no pueden observarse inmediatamente.

Composición:

Cloruro de Sodio	8,5–9 g
Formol 40%	50 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Sigla c.s.p.: cantidad suficiente para.

Preparación: Pesar 8,5-9 g de cloruro de sodio, colocar en un matraz de 1000 ml, adicionar 50 ml de formol al 40% y completar hasta el enrase con agua destilada.

A) Soluciones para métodos de concentración

-Solución de Carles-Barthelemy:

Esta solución se utiliza en el procedimiento de enriquecimiento por sedimentación para la búsqueda de quistes de protozoarios y huevos de helmintos. Densidad de la solución: 1,047. Densidad de los quistes y huevos de parásitos: 1,050-1,150.

Composición:

Líquido A:

Solución fisiológica	900 ml
Formol	100 ml

Líquido B:

Ácido cítrico	120 g
Formol	20 ml
Agua destilada c.s.p.	860 ml

Preparación: Pesar 120 g de ácido cítrico, colocar en un matraz de 1000 ml, adicionar 20 ml de formol y 860 ml de agua destilada.

-Solución de Faust:

Esta solución se utiliza en el método de enriquecimiento por flotación para la búsqueda de quistes de protozoarios y huevos de helmintos. Densidad de la solución: 1,180. Densidad de los quistes y huevos de parásitos: 1,050-1,150.

Composición:

Solución de ZnSO_4 al 33 %

Preparación: Pesar 330 g de ZnSO_4 , colocar en un matraz de 1000 ml y enrasar a 1000 ml con agua destilada.

PREPARACIÓN DE RECIPIENTES

A) Para exámenes coproparasitológicos seriados:

Materiales:

- Frascos de boca ancha con tapa a rosca (con o sin cuchara).
- Solución formolada al 5 %.
- Rótulos.

Preparación:

- Rotular los frascos.
- Adicionar solución formolada hasta la mitad del frasco aproximadamente.
- Cerrar y guardar hasta su utilización.

B) Para examen directo o en fresco:

Materiales:

- Frascos de boca ancha con tapa a rosca.
- Solución fisiológica.

Preparación:

- Rotular los frascos.

- Adicionar solución fisiológica hasta la mitad del frasco aproximadamente.
- Cerrar y guardar hasta su utilización.

C) Para recolección de muestras de zona perianal:

-Hisopado o escobillado perianal:

Materiales:

- 5 o 6 hisopos o gasas (10x10 cm).
- Frascos de boca ancha con tapa a rosca.
- Solución formolada al 5%.

-Test de Graham o Garaguso o método de la cinta transparente:

Materiales:

- 5 o 6 portaobjetos con cinta transparente engomada (tipo "Scotch") de 2 cm de ancho y colocada a lo largo de los mismos.
- Baja lenguas de madera o cuchara de plástico.

BIBLIOGRAFÍA

- Becerril Flores, MA. (2014). Parasitología médica, McGraw Hill/Interamericana Editores, 4.a Edición, México DF.
- Costamagna S, Visciarellin E. (2008). Parasitosis regionales. 2nd ed. Buenos Aires: Editorial de la Universidad del Sur.
- XI Curso de metodología en el Diagnóstico de Enteroparásitos. Departamento de Parasitología INEI-ANLIS Carlos Malbrán (2012).
- Ash, LR; Orihel, TC (2011). Atlas de parasitología humana, Ed. Médica Panamericana, 5.a edición, Buenos Aires.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N.º 2: EXAMEN PARASITOLOGICO DE MATERIA FECAL

Objetivos del trabajo práctico:

- Realizar correctamente la toma de muestra para lograr un adecuado diagnóstico parasitológico.
- Conocer las diferentes soluciones conservadoras-fijadoras, su utilidad y su preparación.
- Aplicar las principales técnicas de laboratorio para el diagnóstico de parasitosis intestinales.
- Aplicar las medidas de bioseguridad en la manipulación de materiales infecciosos.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Las parasitosis intestinales se pueden clasificar teniendo en cuenta que tipo de organismo les da origen. Pueden estar originadas por PROTOZOOS (amebiosis, giardiosis y otros) o por HELMINTOS (enterobiosis, ascariasis, entre los más frecuentes.).

De acuerdo a esto es que existen actualmente distintas técnicas para realizar un diagnóstico certero y saber cuál es el parásito responsable del cuadro que posee el paciente.

Para realizar un buen diagnóstico los procedimientos y técnicas de laboratorio utilizadas deben abarcar la detección de posibles infecciones mixtas por helmintos y protozoarios.

• Toma de muestra

Para la realización del estudio de las parasitosis intestinales se deben recolectar heces para el examen macroscópico y microscópico. El recipiente debe ser de boca ancha, no necesariamente estéril y con tapa que cierre herméticamente para evitar el derrame de la muestra.

• Tipos de Muestra

La muestra puede ser fresca o encontrarse en soluciones conservadoras. Si es fresca, deberá observarse, dentro de los 30 min.: si se trata de heces diarreicas, dentro de los 60 min.: si son heces cremosas y si son formes dentro de las 24 hs.

Para la visualización de trofozoítos el material debe ser examinado en forma inmediata ya que pueden destruirse o deformarse; no sucede lo mismo con quistes y huevos ya que estos se conservan intactos y pueden visualizarse días u horas después de su recolección.

- **Soluciones conservadoras**

Para la preservación de las muestras que no van a ser procesadas de forma inmediata las soluciones conservadoras-fijadoras que pueden utilizarse son:

Formalina: (formol al 5% para heces compactas, al 10% para heces pastosas y al 15% para heces líquidas). Preserva la morfología de quistes, huevos y larvas.

PVA (alcohol polivinílico): fija trofozoítos, quistes y es el mejor sustrato para la aplicación de la coloración tricrómica de Wheatley para identificación y tipificación de amebas.

SAF (solución acética formolada): fija trofozoítos, quistes, huevos y larvas. En preparados húmedos se observa con buenos detalles la cromatina de trofozoítos de amebas.

MIF (merthiolate, iodo, formol): tiene la ventaja de no solo fijar como el anterior, sino que tiñe simultáneamente grandes cantidades de heces en una dilución 1/3 (una parte de heces/dos partes de conservante). El término merthiolate indica la presencia de tiomersal en la solución.

PAF (fenol, alcohol, formol): La sugerencia es recolectar la muestra ya sea única o seriada en soluciones fijadoras que conserven la morfología de todas las estructuras parasitarias incluidos los trofozoítos. Actualmente el más usado es la formalina.

- **Frecuencia de la recolección**

Muestra única: Puede ser fresca o preservada (generalmente en pacientes hospitalizados).

Muestra seriada: El paciente debe recoger aproximadamente media cucharada de heces líquidas o una cantidad del tamaño de un grano de uva de heces firmes de cada deposición obtenida en forma espontánea, durante 6-7 días, mezclándola bien con la solución conservadora.

Una ventaja de esta técnica de recolección “seriada” es que facilita el diagnóstico por ser la muestra más representativa y evita las “fases negativas” de las parasitosis (períodos en los que el parásito no es eliminado por la materia fecal del hospedador).

Se debe evitar tomar la muestra del inodoro para no contaminar con orina u otras formas parasitarias, se interrogará al paciente si está tomando alguna medicación (bismuto, anti diarreicos no absorbibles, aceites minerales) o si ha ingerido alguna sustancia para la realización de radiografías como sulfato de bario ya que éstas interfieren en la detección de protozoos intestinales.

Recordar que un buen diagnóstico de laboratorio comienza con una buena muestra y una buena muestra comienza con una buena explicación y una buena explicación termina cuando nos hemos asegurado que el paciente nos comprendió.

1.-DIAGNÓSTICO DE PROTOZOOS INTESTINALES

El diagnóstico de protozoarios intestinales plantea mayores dificultades que el de helmintos intestinales ya que se trata de elementos más pequeños que pueden pasar inadvertidos ante ojos menos entrenados.

Sabemos que existen dos tipos de estadios que presentan diferencias:

- **Trofozoítos:** formas vegetativas, son elementos activos y móviles, muy frágiles al medio ambiente y responsables de la patogenicidad del parásito. Suelen ser eliminados en heces diarreicas. Se identifican en heces frescas y observación inmediata.
- **Quistes:** formas de resistencia, son inmóviles e infectantes, constituyen los elementos de diseminación. Su reconocimiento es más difícil y se conservan bien en cualquier solución conservadora.

TÉCNICAS DE LABORATORIO

- **Examen directo:** gota de material entre portaobjeto y cubreobjeto, observación directa con o sin contraste.
- **Métodos de enriquecimiento:** Se utilizan para la recuperación de quistes de protozoarios que pueden estar en escaso número y por lo tanto es difícil de observarlos en el examen directo. Se trata entonces de reunir estos en un volumen menor, facilitando de esta manera su hallazgo.

Existen tres métodos de separación:

Sedimentación

Flotación

Flotación – Centrifugación

Sedimentación

- **Sedimentación simple:** método lento que concentra poco.
- **Sedimentación por centrifugación:** Útil para aumentar la concentración de quistes de protozoarios.

De estos métodos, realizaremos en el laboratorio el de CARLES BARTHELEMY, que utiliza para diluir las heces una solución isotónica formolada (solución A), con el objeto de fijar y preservar los elementos parasitarios; luego de una centrifugación se recupera el sedimento y se lo trata con una solución cítrica formolada (solución B) de densidad 1.047 para que los quistes de protozoarios y si existieran huevos de helmintos que poseen una densidad de 1,050-1,150 se vayan al fondo del tubo, separándose de otros componentes.

La técnica también agrega unos mililitros de éter que se utiliza para extraer (solubilizar) grasas, restos fecaloides y vegetales que pueda poseer la muestra. Como son muy livianos se ubican en la superficie y forman un tapón el cual se desecha luego de la centrifugación.

Existen otros métodos que utilizan otras soluciones como son:

- Método de TELEMANN- modificado que utiliza solución de formol-sal (densidad 1,010).
- Método de RICHTIE que también utiliza una solución con una densidad de 1,010.

Flotación

Estas técnicas utilizan medios líquidos de suspensión más pesados que los quistes y larvas, de esta manera los quistes de protozoarios y huevos de helmintos si existieran suben a la superficie y pueden ser recogidos para su posterior visualización. Las soluciones utilizadas tienen una densidad que varía entre 1,180 a 1,210; teniendo en cuenta siempre que los quistes y huevos tienen una densidad de 1,050 a 1,150. Principalmente se emplean soluciones de azúcar, cloruro de sodio, cloruro de calcio y sulfato de zinc.

Flotación – centrifugación

Similar al de flotación ya mencionado, tiene la ventaja de abreviar el tiempo de flotación con la centrifugación.

Método de Faust:

Emplea una solución de sulfato de zinc al 33% que posee una densidad de 1,180 y una baja presión osmótica. Una alícuota de la muestra en primer término se suspende en agua, se cuela a través de una gasa, se recoge en un tubo y se centrifuga desechando el

sobrenadante y volviendo a agregar agua hasta que el líquido salga claro. Luego es tratada con el líquido de flotación, se mezcla bien y nuevamente se centrifuga; la película superficial se recoge con un ansa bacteriológica, se observa entre portaobjeto y cubreobjeto con o sin lugol. Los quistes de protozoarios se detectan sin deformaciones, en cambio los trofozoítos son destruidos. Los grandes huevos de trematodes, algunos huevos de *Taenia sp.* y huevos de *Áscaris lumbricoides* infértiles no se concentran por este método; para detectar estas infecciones, se recomienda emplear una técnica de sedimentación.

El éxito depende fundamentalmente de la densidad del sulfato de zinc y de la pronta observación de las muestras, ya que el contacto prolongado con el sulfato de zinc deforma las formas parasitarias y por otro lado si no se procede a la inmediata observación del concentrado los parásitos sedimentan nuevamente.

2.-DIAGNÓSTICO DE HELMINTIOSIS INTESTINALES

En la helmintiosis intestinal, el EXAMEN MACROSCÓPICO tiene gran importancia, ya que podemos observar a simple vista parásitos o restos de ellos tales como: *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, segmentos de tenias y otros. Para recoger los parásitos hallados macroscópicamente, se deslíen las materias fecales en solución fisiológica dentro de un recipiente de tamaño adecuado, se dejan sedimentar durante un rato y se vuelca el sobrenadante que tiene en suspensión elementos más ligeros. Esta operación se realiza varias veces hasta que el líquido salga claro. Así podremos reunir todos los parásitos que han sido eliminados. Como seguramente están sucios, se los limpia colocándolos en pequeños tubos llenos hasta la tercera parte con solución fisiológica, que se tapan y agitan vigorosamente.

En la práctica clínica, para la realización de un EXAMEN MICROSCÓPICO la investigación de helmintos la podemos realizar orientando nuestra búsqueda a la presencia de huevos en la región perianal o bien a la presencia de huevos en las heces.

En la enterobiosis por ejemplo, encontramos huevos en la región perianal, debido a que las hembras que son las encargadas de la ovipostura, ponen los mismos en el mucus anal luego de realizar migraciones hasta ese sitio. Por esta razón es que los huevos no aparecen en las heces como en otras helmintiosis. Para el diagnóstico de estas parasitosis se recurre a un procedimiento especial para poder visualizar estos huevos.

Estos procedimientos son:

- **Método de Graham modificado por Garaguso o método de la cinta engomada:** que consiste en utilizar una cinta adhesiva de celulosa que se adhiere a un portaobjeto luego

de la toma de muestra en la región perianal. Luego se observa al microscopio óptico. Este procedimiento se realiza en forma seriada durante 3 a 5 días. Hay que indicarle al paciente que debe realizar esta operación por la mañana, antes de defecar y previo a la higiene diaria, para obtener así mejores resultados.

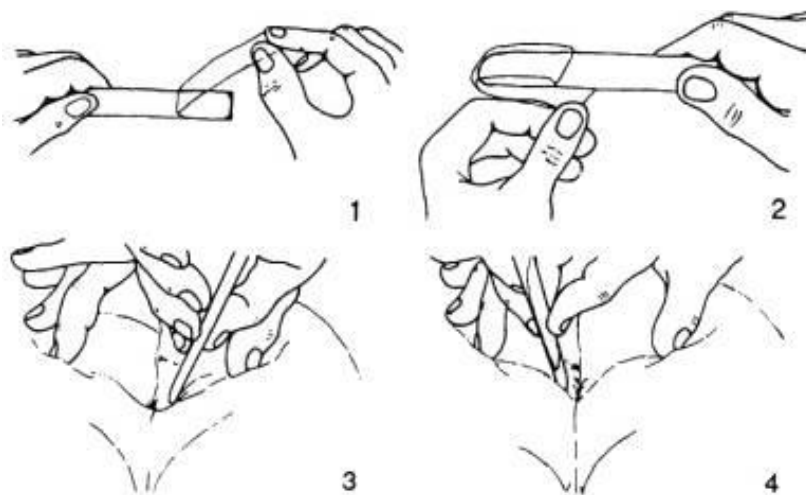


Figura 1: Procedimiento Test de Graham

<http://www.clinicarotger.es/doc/atelab/doc07.htm>

• **Hisopado o escobillado perianal:** se realiza dándole al paciente las mismas indicaciones que en el caso anterior. La diferencia en este método consiste en proveerle al paciente unas tiras de gasa y un frasco con formalina. El paciente deberá pasar las gasas o hisopos humedecidos con un poco de agua, por la región perianal y las pondrá en el frasco con la solución conservadora. Así nos traerá el frasco con las gasas/hisopos, que nosotros procederemos a centrifugar y luego observar entre portaobjeto y cubreobjeto la presencia de huevos de *Enterobius vermicularis*, si existieran.

Estas técnicas son muy simples y muy útiles para la detección de esta parasitosis, pero también sirven para la investigación de huevos de *Taenia sp.*, ya que estas no liberan los huevos en las heces, sino que se evacúan al exterior cuando los proglótidos enteros del parásito se rompen al forzar activamente el esfínter anal.

Para revelar la presencia de huevos de helmintos en las heces se utilizan las técnicas de enriquecimiento que estudiamos en el diagnóstico de protozoos como es el método de sedimentación de Carles Barthelemy, de flotación de Willis (que utiliza solución saturada de cloruro de sodio con una densidad de 1.200) o el Método de Teleman entre otros.

Los helmintos eliminan una cantidad de huevos proporcional al número de parásitos, por esto se puede realizar el recuento de huevos utilizando diferentes métodos, como por ejemplo el frotis grueso o método de Kato-Katz, que consiste en colocar una muestra de heces en un portaobjeto limpio, se tapa con un cubreobjetos de vidrio de 22 x 30 mm., se invierte

sobre un papel absorbente y se presiona para diseminar regularmente las heces y eliminar el exceso. Se deja secar a temperatura ambiente una hora. Al secarse la película el contenido se aclara. Los huevos se cuentan utilizando el objetivo de 10x recorriendo toda la preparación.

Este procedimiento se realiza en forma seriada durante tres días, realizando cinco determinaciones por cada día y sacando la media, luego de contabilizar el número de huevos. Es útil en el caso de gusanos adultos de *Áscaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y las Uncinarias (*Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*).

Para la investigación de larvas de Uncinarias se utiliza el coprocultivo de Harada-Mori que permite la diferenciación de especies de Uncinarias entre *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*, cuyos huevos son idénticos. Consiste en la realización de un cultivo en el cual a los quince días las larvas están bien diferenciadas.

MATERIALES Y MÉTODOS - ACTIVIDADES A DESARROLLAR:

Para la obtención de las muestras:

- Frascos o recipientes plásticos de boca ancha de diferente tamaño: 250-300 ml y 50-100ml.
- Solución de formol al 10 %
- Solución fisiológica.
- Gasas cortadas de 10 cm x 10 cm.
- Papel para envolver.
- Rótulos.
- Planilla de registro.

Para el procesamiento de las muestras:

- Pinzas.
- Espátulas.
- Colador.
- Cajas de Petri.
- Tubos de centrífuga.
- Gradillas
- Embudos
- Varilla de vidrio.
- Pipetas Pasteur.
- Ansa de parasitología.
- Centrífuga.

- Soluciones para las técnicas de concentración.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Personal capacitado para procesar muestras.

Para la observación microscópica:

• Microscopio óptico binocular, con ocular 10 X con regla micrométrica para medición de elementos parasitarios. Los objetivos utilizados son 10 X y 40 X.

- Lugol.

-Método de Carles Barthelemy

Reactivos:

- Líquido A

Solución Fisiológica	900 ml
Formol	100 ml

- Líquido B

Ácido cítrico	120 g
Formol	20 ml
Agua destilada	860 ml
Densidad	1,047

- Éter sulfúrico

Técnica:

1- Se diluye la materia fecal en Líquido A convenientemente, hasta que el material tenga la suficiente fluidez que permita una fácil colación a través de gasa doble.

2- Esta suspensión de materia fecal se debe filtrar a través de gasa doblada, recogiendo el filtrado en un tubo. Se necesitan 8 ml aproximadamente.

3- Centrifugar de 2 a 3 min. a 2000 rpm.

4- Después de la centrifugación se vuelca el sobrenadante y el sedimento se disuelve en líquido B en el mismo tubo por agitación suave o con ayuda de una varilla de vidrio. No se debe llenar el tubo con el líquido B, sino dejar un espacio que permita adicionar de 2 a 3 ml. de éter sulfúrico. Una vez agregado este, se agita fuertemente, tapando el tubo con tapón hasta obtener una suspensión homogénea. Luego de agitar se deja reposar hasta que la capa etérea vuelva a ocupar la parte superior.

- 5- Se centrifuga de nuevo el tubo por un lapso de un minuto a 1.000 rpm.
- 6- Con una varilla (de vidrio o de otro material) se rompe el anillo formado en la capa de éter (por si algún quiste, huevo etc., hubiera quedado retenido) pero evitando que se mezcle con el sedimento que está en el fondo del tubo.
- 7- Se centrifuga nuevamente a 1.000 rpm. un minuto y medio.
- 8- Se vuelca todo el líquido sobrenadante. A veces el anillo formado en la capa de éter no permite volcar el sobrenadante por ser muy abundante y adherente. En este caso se procede a romperlo nuevamente con precaución y se procede a volcar el líquido.
- 9- Se agita el sedimento. Se toma un poco del mismo y se coloca una gota pequeña sobre un portaobjeto. Puede adicionársele primero una gota de Lugol u otro colorante. Cubrir con un cubreobjetos.
- 10- Se procede a la observación al microscopio óptico con objetivos de 10 x y 40 x.

-Método de Telemann:

Técnica:

- 1.- Homogeneizar las heces en solución fisiológica formulada.
- 2.- Colar a través de un embudo con gasa doble en tubo de centrifuga.
- 3.- Agregar aproximadamente 2 ml de éter.
- 4.- Centrifugar a 1000- 1500 rpm. durante 3 a 5 minutos.
- 5.- Eliminar con un golpe seco el sobrenadante.
- 6.- Tomar una pequeña cantidad de sedimento y colocar en portaobjeto.
- 7.- Colocar cubreobjetos. Si es necesario se agrega colorante de fondo (Lugol).

-Método de Faust

Reactivo: Solución de sulfato de zinc al 33 % (densidad 1,180)

Técnica:

- 1- Mezclar una parte de materia fecal con diez partes de agua destilada.
- 2- Colar esta suspensión a través de una capa de gasa recibiendo el líquido en un tubo.
- 3- Centrifugar durante 30-40 segundos a 2.000 rpm.
- 4- Volcar el líquido sobrenadante.
- 5- El sedimento que queda se disuelve nuevamente en agua destilada.
- 6- Se centrifuga igual que en el punto 3- repitiendo hasta que el sobrenadante quede límpido.
- 7- Se vuelca por última vez el sobrenadante y al sedimento se agrega 3-4 ml de la solución de sulfato de zinc al 33 %
- 8- Se disuelve bien el sedimento y se centrifuga por lo menos 2 min. a 2.000 rpm.

9- Se toma con un ansa varias gotas del material que flota, con mucho cuidado y se monta entre portaobjeto y cubreobjeto, coloreándose si se estima necesario.

Los alumnos reconocerán el material utilizado para el examen parasitológico de materia fecal, lo prepararán y luego ejecutarán dos técnicas de concentración. Posteriormente se procederá a la observación microscópica del material concentrado.

BIBLIOGRAFÍA

- Botero/ Restrepo, (2003). Parasitosis humanas - Corporación para investigaciones Biológicas
- Murray (2006). Microbiología Médica - Elsevier.
- Costamagna S, Visciarellin E. (2008). Parasitosis regionales. 2nd ed. Buenos Aires: Editorial de la Universidad del Sur.
- XI Curso de metodología en el Diagnóstico de Enteroparásitos. Departamento de Parasitología INEI-ANLIS Carlos Malbrán (2012).

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N.º 3: PARASITOSIS HEMATICAS Y TISULARES

Objetivos del trabajo práctico:

- Conocer la importancia de estas parasitosis en nuestro medio.
- Conocer las metodologías adecuadas para realizar el diagnóstico parasitológico.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Malaria o Paludismo:

Enfermedad parasitaria de enorme importancia, que últimamente ha venido en aumento por el gran número de casos que se están presentando en varios países. Pertenece al grupo de las protozoosis transmitidas por artrópodos, porque en forma natural se transmite con la picadura de la hembra del género *Anopheles* y su agente etiológico es un protozoario que carece de órganos de locomoción, *Plasmodium*, con cinco especies: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium knowlesi*.

Tripanosomiosis americana o enfermedad de Chagas

Trypanosoma cruzi, familia *Trypanosomatidae*, produce la enfermedad de Chagas, de mayor trascendencia en Latinoamérica. Requiere de un transmisor –el triatoma- que fabrica sus nidos dentro de las viviendas y es peridoméstico: sus reservorios son el armadillo, el tejón, el perro, las ratas y los roedores. Los estadios del parásito son: amastigote, estructura esférica de 2 a 3 micrómetros de diámetro, tiene núcleo, quinetooplasto, flagelo corto; epimastigote, mide 20 a 25 micrómetros, es fusiforme, con núcleo, quinetooplasto, flagelo, membrana ondulante y 25 a 27 micrómetros. Hay dos tripomastigotes: metacíclico y sanguíneo. Un mamífero parasitado contiene amastigotes que rompen la célula, quedan libres en circulación, se transforman en tripomastigotes y circulan o parasitan otra célula. Llega el triatomíneo y succiona, se lleva los tripomastigotes, en el intestino medio se transforman en epimastigotes, se reproducen por fisión binaria; en el intestino posterior se convierten en tripomastigotes metacíclicos. Cuando el triatomíneo defeca, deja el tripomastigote metacíclico, que después penetra a los macrófagos, donde se transforma en amastigote; se reproduce en la célula, la rompe, queda libre y se transforma en tripomastigote, el cual puede invadir nuevas células. Otro mecanismo de infección puede ser por contacto en conjuntiva con tripomastigotes. En el sitio de inoculación se genera un fenómeno inflamatorio, el signo de Romaña o chagoma de inoculación, y después viene la diseminación en el organismo. *Trypanosoma cruzi* produce

daño por invasión de células y muerte celular, ocasiona daños irreversibles en corazón, aparato digestivo, sistema nervioso periférico. En la fase aguda de las parasitosis, los microorganismos se replican en células epiteliales, macrófagos y fibroblastos, y se genera un proceso inflamatorio agudo. En las formas crónicas hay destrucción de células musculares y de células nerviosas, en las paredes del corazón se destruyen fibras musculares, en esófago y colon hay destrucción de fibras nerviosas. Se produce IgM en la fase aguda, más tarde IgG e IgA.

En la tripanosomosis aguda el cuadro presenta malestar general, fiebre, adenopatías, mialgias, epistaxis, escalofríos, hepatomegalia, esplenomegalia, astenia, adinamia y alteraciones electrocardiográficas. En las tripanosomosis crónicas se presentan bloqueos completos del nodo aurículo ventricular, crecimiento ventricular, crecimiento auricular, valvulopatías, cardiomegalia, alteraciones del complejo QRS, de las ondas P y T; megaesófago, megacolon, hepatomegalia y esplenomegalia.

El diagnóstico de la infección aguda por *T. cruzi* se hace demostrando la presencia del parásito por métodos parasitológicos directo. Entre estos, los métodos de concentración en una muestra de sangre son los indicados debido a la sensibilidad adecuada ante el nivel de parasitemia existente en esta fase, y a que pueden ser realizados en laboratorios de baja complejidad. Los métodos de concentración que pueden utilizarse, en orden de menor a mayor complejidad son:

- Gota fresca (baja sensibilidad)
- Micrométodo con microtubo (tubos eppendorf).
- Strout

El diagnóstico de la infección crónica por *T. cruzi* se hace mediante pruebas serológicas que detectan anticuerpos circulantes (IgG) contra el parásito. Con el fin de detectar IgG se pueden emplear los siguientes métodos diagnósticos:

- Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)
- Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)
- Hemoaglutinación Indirecta (HAI)

Es importante destacar que para diagnóstico de Chagas en fase crónica se debe utilizar el “par serológico” es decir realizar dos pruebas serológicas que testen diferentes antígenos del parásito para establecer un diagnóstico de infección por *T. cruzi* y en caso de ser discordantes recurrir a una tercera.

Para el tratamiento se usan benznidazol y nifurtimox; la prevención es por fumigación, evitar la permanencia del insecto en las casas y control de la sangre para uso transfusional.

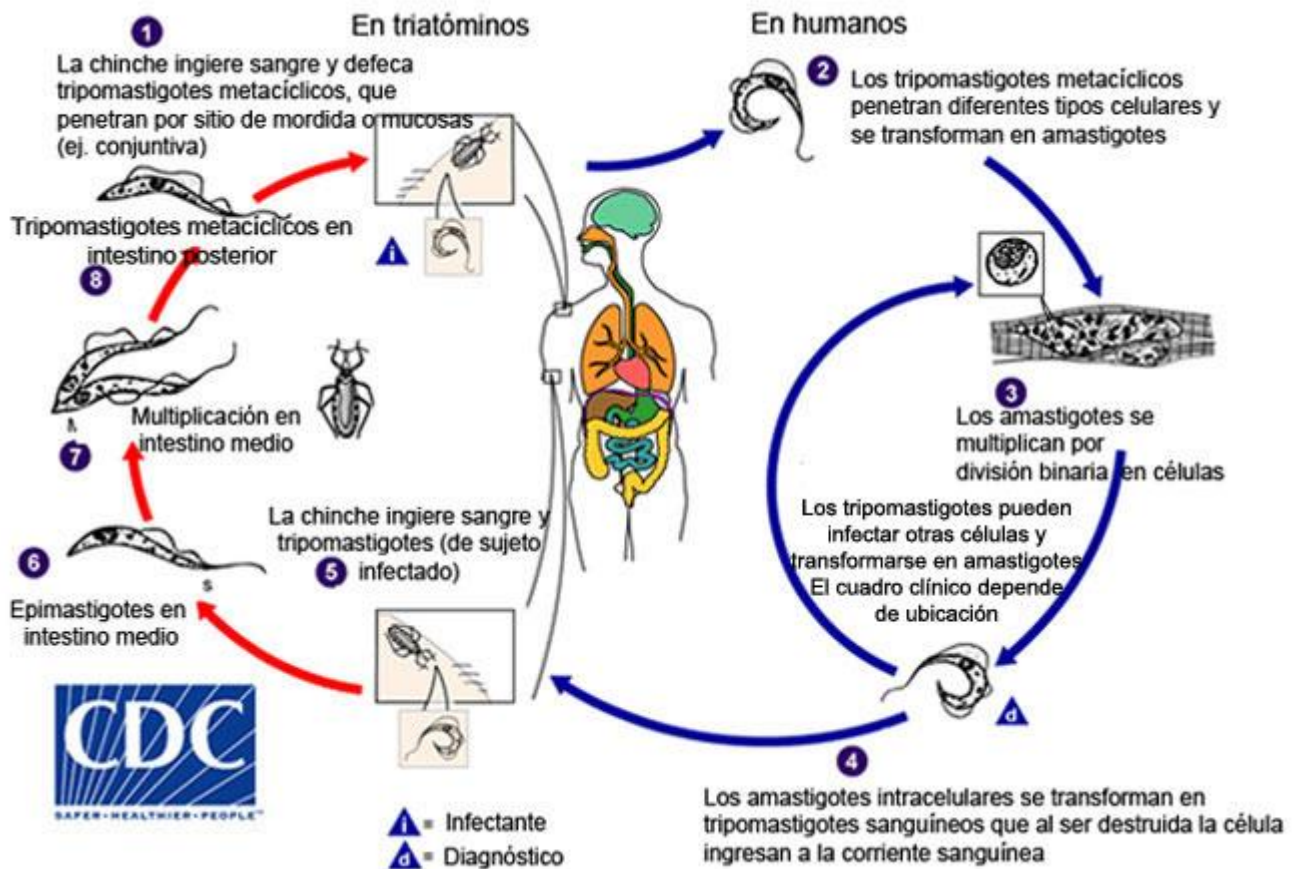


Figura 2: Ciclo evolutivo de *Tripanosomiasis americana*, CDC.

https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Ciclo-biologico-del-T-cruzi-adaptado-de-CDC-2010_fig1_323687802

Toxoplasmosis

La toxoplasmosis la podemos definir como una zoonosis de las aves y de diversas especies de mamíferos incluido el hombre producido por el protozoo *Toxoplasma gondii*. Las principales características del parásito son:

- 1) Inmóvil
- 2) Parásito intracelular obligado
- 3) Protozoo tisular o sea que invade principalmente el tejido neural y muscular
- 4) Es un coccidio por lo que su ciclo vital es complejo y el principal elemento de transmisión es el ooquiste.

Describiendo brevemente el ciclo biológico consta de un ciclo intestinal que se produce en el intestino del gato (merogonia y gametogonia, con formación de merozoítos y gametocitos

respectivamente) y en el medio ambiente (esporogonia con la formación de ooquistes) y un ciclo tisular que se produce en los tejidos del hombre, herbívoros y carnívoros con la formación de quistes y pseudoquistes repletos de bradizoítos y taquizoítos respectivamente.

Tener en cuenta los distintos nombres que toma el parásito dependiendo del ciclo en que se encuentra, pero siempre estamos hablando del mismo coccidio, el *Toxoplasma gondii*.

La toxoplasmosis es una de las parasitosis más extendidas en el mundo; prueba de ello es que en las encuestas serológicas demuestran que un alto porcentaje de la población general tiene anticuerpos circulantes específicos contra *Toxoplasma gondii*, lo que manifiesta que ya se ha tenido contacto con este parásito. *Toxoplasma gondii* es un protozoo de gran complejidad en su ciclo biológico y muy difundido en la naturaleza, siendo múltiples especies las que pueden servirle como huésped. En función de su transmisión, se le considera un protozoo transmitido por mecanismos diversos, ya que lo puede hacer a través de la placenta, la leche, el calostro, con la ingestión de carne insuficientemente cocida, por contaminación con heces de gato, contacto de mucosas y por artrópodos.

El daño que produce al huésped humano es variable, y en general, se considera severo en el neonato siendo las manifestaciones clínicas más frecuentes de la toxoplasmosis congénita la coriorretinitis, ceguera, hidrocefalia y calcificaciones intracraneales y leve o moderado en el adulto siendo en éste principalmente asintomática o con sintomatología semejante a una mononucleosis Infecciosa. En los pacientes en donde la Toxoplasmosis adquiere vital importancia por la posibilidad de trasmisión al recién nacido es la mujer embarazada. Clínicamente, la toxoplasmosis se manifiesta con diversos cuadros clínicos que pueden ser congénitos o adquiridos después del nacimiento. Los datos clínicos dependen del órgano afectado o más dañado, de tal forma que hay evidencias neurológicas, cardíacas, pulmonares, hepáticas, esplénicas, digestivas, renales, cutáneas, ganglionares y oculares.

El diagnóstico definitivo se realiza por aislamiento del microorganismo de sangre, líquidos corporales o por la demostración de quistes en cortes histológicos de tejido, feto o neonato. Esto es realmente difícil y por lo tanto para el diagnóstico se recurre a métodos indirectos (serología), utilizando como antígenos toxoplasmas enteros o producto de lisis de los mismos.

Métodos que utilizan antígenos enteros: Sabín – Feldman (Dye test), Aglutinación Directa, Aglutinación Diferencial, Inmunofluorescencia Indirecta y Pruebas de Inmuncaptura (ISAGA). Métodos que utilizan antígenos lisados: Hemaglutinación Indirecta (HAI), Enzimoimmunoensayo (ELISA), Prueba de Látex y Test de avidéz. Es importante tener en cuenta que la prueba de HAI solamente es útil para estudios epidemiológicos ya que se positiviza tardíamente y de ninguna manera debe ser usada para diagnóstico en pacientes

embarazadas. Dentro de éstos tenemos aquellos que utilizan como antígeno toxoplasmas enteros o productos de lisis de los toxoplasmas.

MATERIALES Y MÉTODOS:

A.-PRUEBAS DE LABORATORIO DE FASE AGUDA

Métodos directos

- Extendido
- Gota fresca
- Gota gruesa
- Microstrout
- Strout

- **Extendido:**

Prueba **gold standard** (del inglés: patrón oro o test de referencia) **para el diagnóstico de Malaria** -junto con la gota gruesa- y útil también para el diagnóstico de Enfermedad de Chagas y otras parasitosis hemáticas. Se realiza con sangre capilar o venosa en forma manual se utilizan 2 portaobjetos de vidrio de 75 x 25 mm limpios, bordes biselados y esquinas romas. Se coloca una gota de sangre de 2 a 3 mm de diámetro en el extremo del portaobjeto. El tamaño de la gota es importante. Demasiado grande, resulta un extendido muy largo o muy grueso. Demasiado pequeña el extendido será corto o delgado. El portaobjeto extensor se sostiene con firmeza con la mano dominante a un ángulo de 30 a 45 grados, se lleva hacia atrás hasta tocar la gota de sangre, dejando que se esparza en todo lo ancho del portaobjetos. Entonces se empuja con rapidez y suavidad hacia delante, hasta el final del portaobjetos Toda la gota debe incluirse en el extendido. Un movimiento lento produce mala distribución de los leucocitos, porque desplaza las células más grandes hacia el final y los lados del extendido.

-Características de un extendido bien preparado

- Debe cubrir de dos tercios a tres cuartas partes de la longitud del extendido.
- Tiene forma de dedo, ligeramente redondeado en el borde más fino.
- Los bordes laterales deben ser visibles.
- Extendido parejo, sin agujeros ni estrías.
- Toda la gota debe ser incluida y extendida.



Figura 3: Esquema partes de un extendido sanguíneo. Imagen propia.

Luego de realizar el extendido, se procede a la fijación con etanol, antes de realizar la tinción correspondiente. Posteriormente se deja secar para poder luego proceder a su observación.

Examen microscópico:

- El microscopio óptico debe calibrarse
- La luz debe centrarse de manera adecuada
- El condensador debe estar elevado casi por completo
- Calibrar correctamente el aumento
- Diafragma abrir una cantidad de luz cómoda para el ojo.
- Uso de filtro.
- Con el objetivo de 10 x
- Puede evaluarse la calidad del extendido, el color y la distribución de las células.
- Cantidad desproporcionada de monocitos en el borde indica mala extensión.
- Presencia de filamentos de fibrina, distribución de los eritrocitos, formación de rodillos o aglutinación.
- Con el lente de 100 x
- Se utiliza aceite de inmersión
- Un área demasiado delgada, no es aceptable.
- Un área demasiado espesa distorsiona los eritrocitos al amontonarlos uno encima de otro.
- Debe quitarse el aceite.

Gota fresca:

Prueba utilizada en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Se realiza obteniendo sangre capilar por punción digital o venosa recogida con heparina, se coloca una gota entre portaobjetos y cubreobjetos, realizando la observación en 40 X de aumento y contraste de fases si es posible.

Debe realizarse por lo menos 3 portaobjetos con 2 preparados cada uno y recorrer minuciosamente todos los campos. Tiene una sensibilidad aproximada del 50 % comparada con el Xenodiagnóstico. La identificación del parásito es clara debido al movimiento ondulante típico del parásito entre los elementos de la sangre. Se recomienda realizarla en forma seriada por lo menos una semana antes de darla como negativa, lo mismo para las demás pruebas de búsqueda del parásito.

Materiales:

- Lanceta
- Algodón
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Solución fisiológica o heparina
- Etanol
- Guantes

Procedimiento:

1 - Sujetar el dedo anular izquierdo. Nunca debe hacerse la toma de muestra en el pulgar, ni en adultos ni en niños.

2 - Limpiar la zona con algodón empapado en alcohol, frotando para eliminar la suciedad y la grasa.

3 - Con una lanceta estéril hacer la punción en la cara lateral del dedo (nunca en la yema), presionando el extremo del mismo y con golpe seco se punza hasta suficiente profundidad de la lanceta (tope de la misma) para que la sangre vierta libremente con suave presión.

4 - Presionar ligeramente el dedo y descartar la primera gota de sangre limpiando la zona con papel de filtro o pañuelo de papel. Presionar nuevamente el dedo y recoger la gota de sangre en el centro del portaobjetos.

5 - Agregar una gota de igual tamaño de solución fisiológica o si se prefiere de heparina (mediante esta solución se impide la coagulación, teniéndose más tiempo para estudiar el preparado).

6 - Mezclar las gotas usando una esquina del cubreobjetos. Cubrir con éste la preparación.

7 - Examinar todo el preparado con 10 X y 40 X.

• **Gota gruesa:**

Esta prueba se utiliza para diagnosticar enfermedad de Chagas y Malaria (para el caso de paludismo permite definir género y especie (s) infectante(s)).

Se depositan varias gotas de sangre capilar superpuestas en un portaobjeto. Las mismas se extienden en forma circular con un palillo o bien girándola sobre el dedo. Esto se hace para que los parásitos no queden atrapados en las redes de fibrina (desfibrinar). Se deja secar al aire libre.

Se hace una dilución de la solución de Giemsa (la dilución debe hacerse con buffer pH 7,2, lo mismo que el lavado final y en la proporción de una gota del colorante por 20 gotas de agua destilada), y se vuelca sobre el preparado. El tiempo de coloración debe estandarizarse para cada colorante; en general va de 15 a 30 minutos. De esta manera se hace la deshemoglobinización (lisis de hematíes) y la coloración en forma simultánea. Se lava suavemente con agua destilada. Se deja secar al aire libre o con una estufa, colocando los portaobjetos en posición inclinada para que el agua escurra con facilidad. Una vez seco, se examina al microscopio óptico.

Se observan teñidos los núcleos y granulaciones de neutrófilos, eosinófilos, basófilos. Los citoplasmas de los parásitos se colorean de azul celeste y las sustancias cromáticas de color púrpura o rojo violáceo.

Tiene como ventaja que el preparado puede guardarse para posteriores observaciones.

Materiales:

- Lanceta
- Algodón
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Etanol
- Guantes
- Colorante Giemsa

Procedimiento:

1 - Realizar una punción con lanceta, teniendo en cuenta las mismas consideraciones que para la toma de muestra anterior.

2 - En el centro de un portaobjetos, colocar una gota de sangre de mayor volumen.

3 - Sin retirar el portaobjetos de la superficie del dedo del paciente realizar movimientos circulares y en espiral agrandando el diámetro de la muestra (aprox. 2 cm) durante 3 a 5

minutos para desfibrinar. Si la cantidad de sangre no es suficiente, se puede colocar una segunda gota cerca de la primera. Debe tratarse que el dedo del paciente no toque el portaobjetos, sino que el contacto se realice entre éste y la gota de sangre.

4 - Una vez que se ha obtenido la cantidad necesaria de sangre, se limpia el dedo del paciente con algodón humedecido en alcohol.

5 - Dejar secar la gota gruesa manteniendo el preparado boca arriba.

6 - Una vez seca la muestra se procede a su identificación con lápiz de grafito.

7 - Luego se procede a la coloración con Giemsa en la proporción de una gota del colorante por 20 gotas de buffer pH 7,2, se vuelca sobre el preparado y se deja actuar por espacio de media hora.

8- Se lava, se deja secar a T° ambiente y se procede a la observación microscópica a 100 X, con aceite de inmersión.

9.- Se aconseja dejar secar perfectamente bien la muestra, para evitar que se desprenda durante la coloración.

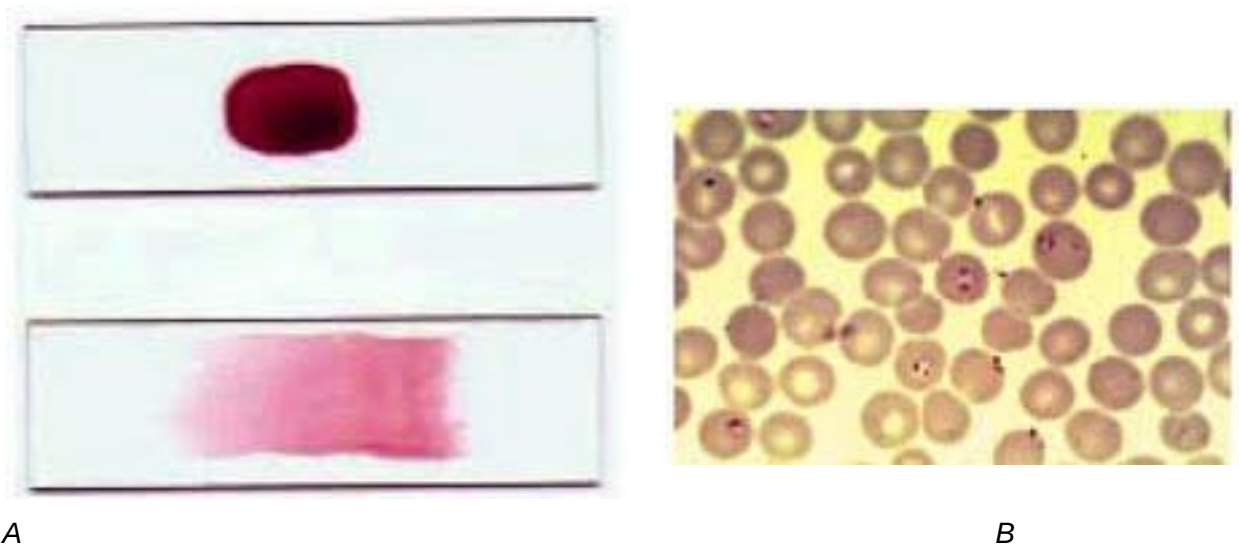


Figura 4 A: Gota gruesa y extendido.

Figura 4 B: Imagen al microscopio óptico de extendido sanguíneo.

https://www.urgenciasclinico.com/PDF/SESIONES/FIEBRE_EN_VIAJERO.pdf

• Microstrout

Es un método de concentración de parásitos, que se basa en la centrifugación controlada de sangre entera heparinizada, cuyo objetivo es que se ubiquen los parásitos entre la capa de glóbulos blancos (GB) y por encima de los rojos.

Se carga un eppendorf heparinizado con sangre del paciente. Se centrifuga a 3000 rpm. durante 2 minutos, luego de centrifugado se toma muestra de la capa de GB. Los preparados

se realizan sobre portaobjetos, depositando la capa de GB, se aplica un cubreobjetos y se examina al microscopio con un aumento de 40 X si es posible en contraste de fases, por lo menos 15 minutos antes de darlo por negativo, se buscan parásitos que se distinguen por su típico movimiento y su morfología.

Materiales:

- Tubos eppendorf heparinizados
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Lancetas
- Etanol
- Algodón
- Papel de filtro o pañuelos de papel

Procedimiento:

- 1 - Realizar una punción con lanceta de la misma forma que en los casos anteriores.
- 2 - Recoger la sangre en el tubo eppendorf.
- 3 - Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 2 minutos.
- 4 – Tomar la muestra de la interfase donde se encuentran los glóbulos blancos.
- 5 - Depositar sobre un portaobjetos la capa de leucocitos y plasma y cubrir con un cubreobjetos.
- 6 - Examinar al microscopio óptico con 40 x recorriendo íntegramente la preparación.

• Técnica de Strout

Es un método de concentración donde el suero exudado de la sangre coagulada se centrifuga selectivamente, la primera vez a muy bajas revoluciones para eliminar los glóbulos rojos (GR) que arrastra el suero y la segunda centrifugación a velocidad máxima para que sedimenten los parásitos y con el sedimento realizar los preparados para su búsqueda.

La ventaja que posee este método es que hace una gran concentración de parásitos de la sangre total y además la observación microscópica es más limpia, pues se eliminan en gran parte los GR, además de obtener suero para realizar la serología si fuese necesario. Es de fácil preparación y de mayor sensibilidad, estimada en un 95 %.

Materiales:

- Tubos de centrífuga
- Jeringa con aguja para punción venosa
- Lazo

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pipetas Pasteur
- Etanol
- Algodón

Procedimiento:

1 - Extraer 5 a 10 ml de sangre por punción venosa, sin anticoagulante, colocar en un tubo de centrifuga, dejar coagular y retirar el coágulo.

2 - Recoger el sobrenadante y centrifugar a muy bajas r.p.m. (punto que deberá ser calibrado por cada laboratorio con cada centrífuga) durante 1 a 2 minutos para separar los GR. El suero deberá observarse opalescente debido a la presencia de GR en suspensión. Si se saca el suero translúcido los parásitos se van al fondo del tubo y se corre el riesgo de un falso negativo.

3 – Trasvasar el sobrenadante y volver a centrifugar ahora con la máxima velocidad de la centrífuga, durante 5 minutos. Se busca con esto que los parásitos sedimenten junto con el resto de GR que quedaron anteriormente.

3 – Volcar el sobrenadante (suero), el cual se puede guardar para diagnóstico serológico.

4 - Realizar un preparado entre portaobjetos y cubreobjetos con el sedimento. Se observa con lentes de 10x y 40x en busca de formas móviles de parásitos.

Métodos indirectos

- Xenodiagnóstico
- Hemocultivo

Tienen mayor sensibilidad que los anteriores, pero sólo se realizan en laboratorios especializados. En la etapa indeterminada y crónica la sensibilidad es variable, oscila entre el 10 y el 90%.

Xenodiagnóstico:

Para la Enfermedad de Chagas el método consiste en el empleo de los vectores, los que se alimentan sobre los pacientes sospechosos. Luego de un cierto tiempo se examina el contenido intestinal y heces de los insectos en busca del parásito.

Hemocultivo:

Es un método de aislamiento “in vitro” de *Trypanosoma cruzi*. Es sencillo aplicable a cualquier laboratorio que maneje la bacteriología de rutina, ya que sigue sus mismos principios.

B.-PRUEBAS DE LABORATORIO DE FASE CRÓNICA

En relación al laboratorio de fase crónica de la Enfermedad de Chagas observamos que pasando la primera etapa donde hay una alta parasitemia, el sistema inmunológico del huésped comienza a responder por lo que podemos detectar anticuerpos contra el *T. cruzi*.

Dada la importancia que tiene el diagnóstico, la serología de la infección chagásica debe basarse en pruebas de alta confiabilidad.

Estas pruebas son útiles para el diagnóstico durante los estadios indeterminado y crónico y para evaluar la respuesta terapéutica.

En paludismo y leishmaniosis también se suelen utilizar pruebas serológicas para la determinación de anticuerpos específicos, aunque estas pruebas están desestimadas y no son recomendadas para ambas patologías desde los Referentes Nacionales.

En Paludismo y Leishmaniosis también se utilizan pruebas serológicas para la determinación de anticuerpos específicos.

Estas técnicas son:

- HAI – Hemaglutinación Indirecta
- IFI – Inmunofluorescencia Indirecta
- ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay

Hemaglutinación indirecta - HAI

Fundamentos:

Esta reacción se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos (Anti *T. cruzi*, Anti *T. gondii*, etc.) de producir aglutinación en presencia de glóbulos rojos (GR)sensibilizados con los correspondientes antígenos. En el suero existen anticuerpos inespecíficos (heterófilos) que son capaces de aglutinar glóbulos rojos de distintas especies. Su presencia se investiga enfrentando el suero con GR no sensibilizados. Los anticuerpos interferentes se eliminan mediante tratamiento con 2-mercaptoetanol.

Reactivos:

-Antígeno: La técnica de sensibilización de GR se basa en obtener un cultivo en medio artificial de *T. cruzi* o *T. gondii* los que se destruyen por congelamientos y descongelamientos

sucesivos o bien por métodos ultrasónicos. De esta manera se obtienen antígenos citoplasmáticos y de superficie cuyo título se debe investigar y estandarizar, para lo cual se debe disponer de un antígeno previamente titulado o patrón y sueros positivos y negativos.

-Sensibilización de los GR:

Se pueden usar GR de carnero extraídos por punción venosa en forma estéril y conservada en solución de Alsever (2,05 % de dextrosa, 0,8 % de citrato de sodio, 0,055 % de ácido cítrico y 0,42 % de cloruro de sodio) a 4°C. Estos GR son lavados y re suspendidos en buffer de fosfatos de pH 7,2 y luego tratados con una solución diluida de ácido tánico (GR tanados). Luego se ponen en contacto con el antígeno anteriormente obtenido, se incuban y se lavan.

-GR no sensibilizados:

Suspensión al 1% de eritrocitos de carnero no sensibilizados, para control de heterofilia.

-Buffer de fosfatos a pH 7,2.

-2-mercaptoetanol-2-ME al 1%:

Con cada lote de reacciones preparar una dilución 1/100 con solución fisiológica en cantidad suficiente.

-Control negativo:

Suero humano no reactivo, inactivado.

Materiales:

- Frascos
- Policubetas de 96 pocillos con fondo en U.
- Pipetas plásticas descartables
- Microdiluidores (25 µl)
- Microgoteros (25 µl)
- Tubos de ensayo y material volumétrico
- Cinta adhesiva transparente
- Papel de filtro.
- Técnica de la reacción

I- Titulación sin 2-ME

1- Con microgotero, colocar una gota de buffer de fosfatos (25 µl) en todos los pocillos a usar de la policubeta.

2- Tomar una alícuota de cada suero con microdiluidores de 25 µl (uno para cada muestra). Colocar cada microdiluidor en el primer pocillo y rotarlo al menos 10 veces para asegurar una correcta dilución de la muestra.

3- Realizar diluciones seriadas a partir del primer pocillo (dilución $\frac{1}{2}$), pasando los microdiluidores al pocillo siguiente hasta la dilución que se desea investigar rotando en cada paso.

4- Colocar en los pocillos de las diluciones $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ una gota (25 μ l) de GR no sensibilizados para control de heterofilia.

5- En el resto de los pocillos agregar una gota de GR sensibilizados.

6- Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta.

7- Dejar en reposo, a resguardo de vibraciones durante 90 minutos y leer

II- Titulación con 2-ME

1- Colocar una gota de suero en el primer pocillo empleando pipetas descartables.

2- Diluir al $\frac{1}{2}$ agregando una gota de 2-ME al 1% a los mismos pocillos usando pipeta descartable.

3- Sellar estos pocillos con cinta adhesiva y mezclar aplicado suaves golpes laterales a la policubeta.

4- Incubar 30-60 minutos a 37°C o 90 minutos a temperatura ambiente.

5- Retirar la cinta adhesiva y con microgotero de 25 μ l colocar una gota de buffer de fosfatos en los restantes pocillos hasta la dilución deseada.

6- Realizar los pasos 3 a 8 descritos en la titulación anterior.

Lectura de los resultados:

No reactivo: presencia de un sedimento en forma de botón o pequeño anillo de bordes regulares.

Reactivo: formación de una película o manto que cubre el 50% o más del fondo de los pocillos.

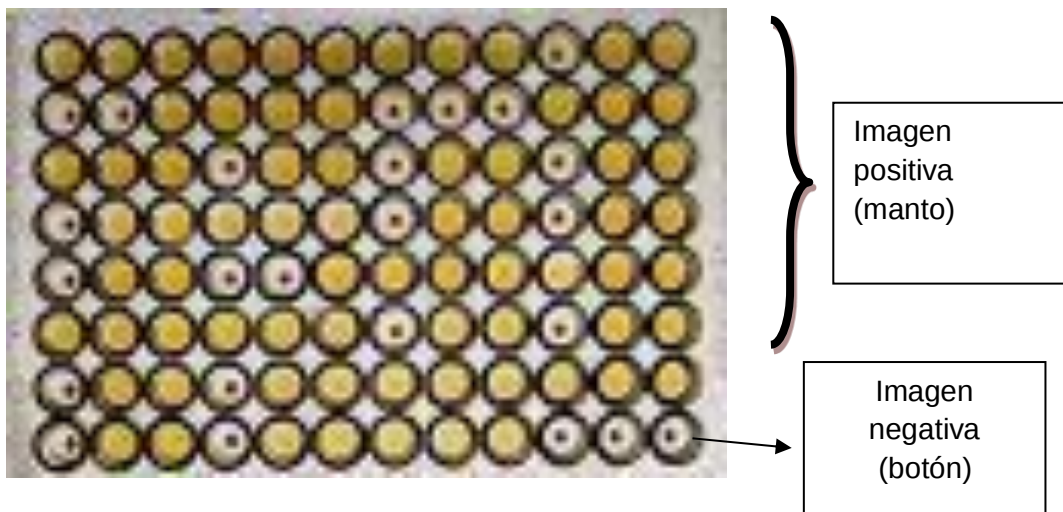


Figura 5: Placa de HAI. <https://chagasusach.wordpress.com/2011/05/09/metodos-de-diagnostico-de-la-enfermedad-de-chagas/>

Inmunofluorescencia Indirecta - IFI

Fundamento: Se ponen en contacto, en un portaobjetos, el antígeno y el suero humano a investigar. En este caso vamos a describir para *T. cruzi*, pero sabemos que modificando el antígeno fijado, la técnica es aplicable a otras determinaciones como Malaria, Leishmaniosis, Toxoplasmosis, etc. Después se evidencian los anticuerpos fijados sobre éste antígeno por medio de una globulina antihumana marcada con fluoresceína.

Reactivos:

1- Antígeno

Se utiliza *Trypanosoma cruzi* de cultivo obtenido en medio bifásico o mejor aún de medio monofásico. Se recoge el sobrenadante que contiene los parásitos después de 3 a 4 días de incubación a 27°C. Se centrifuga durante 15 minutos a 400 r.p.m. y después de decantar el sobrenadante, se resuspenden los tripanosomas en una solución de NaCl 0,15 M más 0,1 % de formol, se centrifuga nuevamente y se lava varias veces con solución de NaCl 0,15 M. Se lleva luego la suspensión a una concentración determinada de 15 a 20 tripanosomas por campo microscópico a 400 aumentos. Para ello se colocan 10 µl de la suspensión sobre un portaobjetos limpio y se cubre con un cubreobjeto 22 x 22 mm, examinando el preparado a 400 aumentos para ajustar el número de parásitos por campo al número antedicho. Con ésta suspensión se realizan las improntas en portaobjetos adecuados a tal fin en los distintos círculos, se dejan secar a temperatura ambiente y se fijan por calor en la misma forma que una preparación bacteriológica. Las improntas así obtenidas se guardan congeladas a -20 °C.



Figura 6: Improntas para IFI. Imagen Propia.

2- Globulina antihumana marcada con fluoresceína.

Se utiliza un conjugado comercial de calidad segura. El título de cada lote de conjugado debe determinarse utilizando el equipo de microscopía de fluorescencia del laboratorio antes de utilizarlo en un análisis de rutina.

Para ello, preparar las siguientes diluciones del conjugado desconocido en solución salina-buffer, incluyendo el título indicado por el proveedor.

a) 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160

b) 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400

si es necesario se pueden preparar diluciones mayores.

Cada dilución debe probarse con un suero control de título conocido. El título del conjugado que se debe elegir es la dilución anterior a la mayor dilución que da adecuada fluorescencia.

Un conjugado satisfactorio no debe colorear directa o inespecíficamente el antígeno en una dilución 3 veces menor al título hallado.

3- Solución salina buffer (SSB)

ClNa 7,65 g

Na₂HPO₄ 0,724 g

KH₂PO₄ 0,21 g

Agua destilada c.s.p. 1000 ml

El pH de esta solución es de $7,2 \pm 0,1$. Puede guardarse en frasco de polietileno.

4- Medio de montar

Se prepara mezclando una parte de solución salina-buffer de pH 8 con 9 partes de glicerina p.a.

5- Solución de Azul de Evans

Solución madre: Azul de Evans 1 g

Agua Destilada 100 ml

En el momento de usar, preparar una dilución que debe ser determinada para cada lote de solución madre, frente a sueros y antígenos de reactividad conocida (aprox. 1/500 a 1/1000)

6- Controles de coloración inespecífica

Tratar un círculo de antígeno con solución salina-buffer y realizar toda la técnica. No debe haber fluorescencia.

Técnica de la reacción

En cada partida de reacciones, deben incluirse los siguientes controles:

Control reactivo: Suero control de título conocido.

Control no reactivo: Suero control negativo.

Control de coloración inespecífica: Como se indicó.

- Sobre el portaobjetos con Antígeno se colocan 30 μ l de suero del paciente diluido 1/30 (o bien las diluciones elegidas para semicuantificar la prueba) en SSB de pH 7,2.
- Se incuban los portaobjetos en cámara húmeda a 37°C por media hora.
- Se lava con SSB durante 10 minutos, 2 veces y finalmente con agua destilada secándose con papel de filtro los bordes del portaobjetos.
- Se tratan ahora con la dilución determinada de la globulina antihumana marcada, colocando en cada círculo del antígeno 30 μ l de esta dilución.
- Se incuba, se lava y se seca igual que lo descripto anteriormente.
- Para realizar una coloración de fondo, se cubren los preparados con solución de azul de Evans diluido a la concentración apropiada durante 5 minutos y se repite el lavado y secado anterior.
- Los preparados se montan con glicerina tamponada pH 8 y se conservan en la oscuridad a 4°C hasta el momento de la lectura (no más de 2 horas).
- Lectura de las reacciones

En el caso de los sueros positivos, los tripanosomas se observan con típica fluorescencia amarillo-verdosa y los sueros negativos y los controles negativos y de coloración inespecífica, de color rojizo sin fluorescencia. Para el título de cada muestra reactiva se informa la inversa de la mayor dilución que produce fluorescencia.

ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay

Estas técnicas se basan en la posibilidad de inmovilizar el antígeno a una fase sólida, sobre la cual se permite en una primera etapa la unión del anticuerpo, reacción no evidente. En una segunda etapa de la reacción, el agregado de un segundo anticuerpo (anti-inmunoglobulina de la especie en estudio) acoplado a una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa) se pone en contacto con la dupla antígeno-anticuerpo, permitiéndose la reacción de esta cuando se agrega el sustrato correspondiente. La reacción luego de ser detenida con los reactivos adecuados, se puede leer en forma directa, aunque lo aconsejable es la lectura por los valores de densidad óptica.

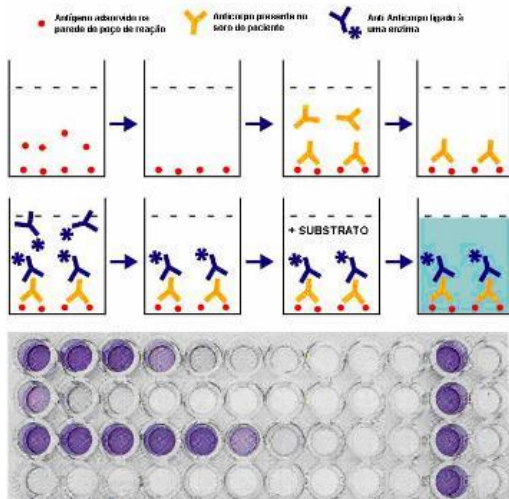


Figura 7: Esquema ELISA.

<http://mesa8labd.blogspot.com/2009/05/tecnicas-inmunologicas.html>

ACTIVIDADES A DESARROLLAR EN EL TRABAJO PRÁCTICO:

A.-Laboratorio de Fase Aguda

Se procederá a la realización de las técnicas de:

- Extendido
- Gota fresca
- Gota gruesa

Se procederá a la realización de los preparados con sangre entera provisto por el equipo docente siempre aplicando normas de Bioseguridad. Coloración May Grunwald - Giemsa de los preparados.

B.-Laboratorio de Fase Crónica

Se procederá a la realización de la técnica de HAI – HEMAGLUTINACION INDIRECTA sin 2-ME. Y ELISA. Respetando normas de bioseguridad correspondientes ya que utilizaremos muestras biológicas potencialmente infectivas.

BIBLIOGRAFÍA

- Romero Cabello (2004). Parasitología de las moléculas a la enfermedad– Mc Graw Hill
- Rodríguez Pérez (2004). Atlas de Parasitología Médica- Mc Graw Hill
- Aprendizaje de la Parasitología Basado en Problemas Flisser. Editores de Textos Mexicanos (2006).

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N.º 4: COLORACIONES

Objetivos del trabajo práctico:

- Lograr que el alumno desarrolle habilidades en el manejo de las principales técnicas de coloración.
- Reconocer la importancia que tiene la correcta utilización de los reactivos para obtener una buena coloración.
- Conocer las distintas formas de montaje de hongos y parásitos para su observación.
- Reconocer y detectar las morfologías celulares y saber diferenciar de artefactos de coloración.

INTRODUCCIÓN

Debido a que los microorganismos son pequeños y su citoplasma posee un índice de refracción cercana al del agua, se requieren generalmente tinciones biológicas para visualizarlos adecuadamente o demostrar el fino detalle de sus estructuras internas.

Las imágenes producidas por absorción en las preparaciones coloreadas, son mucho más fáciles de interpretar que las imágenes de difracción dadas por las preparaciones frescas ya que casi todos los elementos que poseen un tejido o célula tienen casi el mismo índice de refracción, lo que hace su diferenciación óptica muy difícil. De allí la necesidad de colorear los preparados para el estudio morfológico de las células.

Los métodos de tinción son de gran utilidad, pero deben usarse siempre con precaución, ya que pueden conducir a errores. Las moléculas de colorante forman en ocasiones precipitados o agregados que parecen estructuras celulares auténticas, pero que son formaciones completamente artificiales inducidas por el mismo colorante. Tales estructuras se denominan artefactos, y deben tomarse muchas precauciones para tener la seguridad de que no nos estamos equivocando al creer que un artefacto es una estructura realmente existente.

CLASIFICACIÓN DE LOS COLORANTES:

Colorantes naturales: Se extraen directamente de productos animales o vegetales, por ej.: carmín, hematoxilina, orceína y azafrán.

Colorantes artificiales: Son casi siempre empleados bajo la forma de sales. Aunque no difieren fundamentalmente de los colorantes naturales, forman un grupo aparte, puesto que su constitución química es especial. Pueden ser preparados sintéticamente.

Además, se clasifica a los colorantes artificiales según la afinidad que presentan para con el núcleo y el protoplasma en:

Básicos: Son los que tiñen estructuras ácidas como la cromatina nuclear. Son sales cuya base es coloreada y es el componente activo. Ej. azul de metileno, no es más que el clorhidrato de azul de metileno.

Ácidos: Son los que tiñen estructuras de naturaleza básica como estructuras citoplasmáticas. Son sales de sustancias ácidas y el componente activo es por ej. Eosina como el eosinato de sodio o potasio.

Neutros: Son aquellos en los cuales el ácido y la base son los componentes activos como el eosinato de azul de metileno que se utiliza en las coloraciones de sangre y algunos protozoarios.

EXAMEN DE MUESTRAS CLÍNICAS AL MICROSCOPIO ÓPTICO

Según la manipulación que efectuemos sobre la muestra a observar y según los colorantes que empleemos durante el proceso, podemos hablar de diferentes modalidades de tinción.

Examen microscópico de las muestras clínicas directo: sin tinción

No se utiliza ningún tipo de colorante. Es el montaje directo húmedo o examen en fresco: las muestras se extienden directamente sobre la superficie de un portaobjetos para su observación. El material que es demasiado espeso para permitir la diferenciación de sus elementos, puede diluirse con igual volumen de solución salina fisiológica estéril. Se deposita suavemente un cubreobjetos sobre la superficie del material.

Este tipo de preparación se emplea para detectar trofozoítos móviles de parásitos intestinales como *Giardia*, *Entamoeba*, huevos y quistes de otros parásitos, larvas y gusanos adultos, *Trichomonas*, hifas de hongos, etc.

Examen microscópico de las muestras clínicas levemente modificadas: tinción simple

Se utiliza un solo colorante, por lo que todas las estructuras celulares se tiñen con la misma tonalidad (tinta china, azul metileno de Loeffler, azul de lactofenol).

El Hidróxido de potasio al 10% (solución de KOH) permite ver elementos de hongos ya que el KOH digiere parcialmente los componentes proteicos, por ejemplo, de la célula huésped, pero no actúa sobre los polisacáridos de las paredes celulares de los hongos.

La tinta china o nigrosina permite observar células levaduriformes capsuladas (*Cryptococcus*), sobre todo en LCR. Los polisacáridos capsulares rechazan la tinta china y la cápsula aparece como un halo claro alrededor de los microorganismos. Azul de metileno de Loeffler puede agregarse a las preparaciones en fresco de heces para observar la presencia de leucocitos.

Examen microscópico de las muestras clínicas muy modificadas: tinción diferencial

Se utilizan varios colorantes combinados. Las estructuras celulares se diferencian en función de los diferentes colorantes que fijan de acuerdo con su propia constitución química. Los ejemplos clásicos serían la tinción de Gram o la de Ziehl-Neelsen.

CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE COLORACIÓN:

A.-Según tiñan de una manera difusa o en forma selectiva sobre ciertas partes

- **Difusas:** No se usan en microscopía.
- **Específicas:** Cuando se colorea solamente un elemento o grupo de elementos de un tejido.

Pueden ser:

- Directas:** Se producen por simple inmersión en el colorante.
- Indirectas:** El colorante no puede obrar directamente, siendo indispensable que el objeto que se colorea sea tratado de antemano, por otras sustancias oxidantes que lo preparen para recibir el colorante y que se llaman mordientes. La combinación que el mordiente forma con el colorante se denomina *laca*. Los mordientes son sustancias oxidantes que neutralizan el poder reductor de ciertas estructuras de los microorganismos que impiden las coloraciones ej. alumbre, tanino, yodo.

B.-De acuerdo a la manera de realizar la coloración se clasifican en:

- **Progresivas:** cuando aumenta la intensidad de la coloración a medida que aumenta el tiempo de exposición al colorante.
- **Regresivas:** sobre colorean el preparado decolorándolo luego con disolvente o diferenciador hasta conseguir el contraste adecuado.

C.-Según utilicen uno o varios colorantes, pueden ser:

- Simple:** utilizan un solo colorante
- Combinadas:** utilizan varios colorantes, ya sea sucesivamente o simultáneamente.

Las **coloraciones simples**, según tomen el mismo color de colorante o no pueden ser:

- **Normocromáticas:** toman el mismo color del colorante.
- **Metacromática:** cuando algunos elementos viran hacia un tono distinto. Esta propiedad no solo depende del colorante sino también de la sustancia a colorear.

Es necesario que el colorante colorea los distintos elementos histológicos con diferentes tonos y que algunas sustancias hagan virar a los colorantes. A estas sustancias se la llama cromotropas. Ej. Sustancias amiloideas, granulaciones de los leucocitos.

A- Coloraciones panópticas: se emplean colorantes neutros o *anfocromos*. El objeto es poner en evidencia el mayor número posible de elementos con mayor variedad de tonos. Es estas coloraciones juega un papel importante la metacromasia.

B- Coloraciones vitales. Se utilizan suspensiones de las muestras a las que se les agrega colorantes vitales que deben ser poco o nada tóxicos y se usan en soluciones muy diluidas de los mismos. Por ej. se pueden diluir los colorantes en solución fisiológica al 1 %. No deben poner en peligro la vida de la célula. Es un procedimiento intermedio entre las técnicas al estado fresco y la coloración previa fijación del material. Se utilizan para el estudio de los protozoarios. Por ejemplo, solución de lugol, eosina, azul de metileno.

También podemos hablar de tinción negativa, que es el reverso del procedimiento de tinción usual: las células se dejan sin teñir, pero se colorea en cambio el medio que las rodea. Lo que se observa, por lo tanto, es el perfil de las células. La sustancia utilizada para la tinción negativa es un material opaco que no tiene afinidad por los constituyentes celulares y que simplemente rodea las células, tal como la tinta china (que es una suspensión de partículas de carbono coloidal) o la nigrosina (un colorante negro insoluble en agua). La tinción negativa es un modo satisfactorio de aumentar el contraste de las células en la microscopia óptica, pero su máxima utilidad está en revelar la presencia de cápsulas alrededor de las células bacterianas.

Para que haya coloración verdadera es menester que el material a colorear se fije, con una intensidad tal que un lavaje efectuado con el disolvente, que ha servido para preparar el colorante, no decolore el objeto.

FIJACIÓN

Es una operación destinada a matar la célula, conservándola tanto como sea posible, en el mismo estado en que se encontraron durante la vida.

Un fijador debe reunir las siguientes condiciones:

- Actuar rápidamente.
- Tener poder de penetración (para que fijen las zonas profundas tanto como las superficiales).
- Producir lo menos posible, modificaciones artificiales, susceptibles de darnos una falsa idea de la estructura de los elementos celulares.
- Producir una coagulación total de las proteínas, que debe ser fraccionada o paulatina de manera de evitar retracciones, y nunca violenta o instantánea.

Fijadores:

- Físicos: calor
- Químicos: ácido crómico, ac. acético, ac. pícrico, trinitrofenol, bicromatos, alcohol etílico, acetona, formol, alcohol polivinílico (APV) etc.
- Físico-Químicos: utilizan mezclas de fijadores físicos y químicos, de manera de completar la acción de uno con las propiedades del otro. Por ej. calor y alcohol etílico.

Pasos a seguir en la realización de una coloración:

1. Preparación del material microscópico. Sobre un portaobjeto se pueden efectuar frotis, extendidos e improntas.
2. Fijación.
3. Coloración.
4. Lavado y secado.
5. Observación microscópica.

MÉTODOS DE COLORACIÓN PARA PROTOZOARIOS HEMÁTICOS

Coloración MayGrunwald –Giemsa

Técnica:

- 1- Confeccionar un extendido de sangre de la siguiente forma.

Se coloca una gota de sangre en el extremo de un portaobjeto limpio y desengrasado. Con el extremo biselado de otro portaobjeto, se presiona esta gota de manera que se extienda en capa delgada. Se hace deslizar el extensor sobre la superficie del primer portaobjeto, siguiendo un ángulo de 45° y efectuando un movimiento de derecha a izquierda. Se seca al aire libre.

Cubrir el extendido con 20 gotas de colorante de May Grunwald recubriendo el extendido, dejando actuar 3 min. para su fijación. Los colorantes neutros de este tipo, cuando están disueltos en alcohol metílico, carecen de propiedades tintoriales.

Pasados los 3 min. sin volcar el colorante, agregar un volumen igual de agua de la canilla o un buffer de fosfatos. Mezclar ya sea por pequeños movimientos de inclinación del portaobjeto, o por soplado con una pipeta. Deje actuar 1 min. Al agregar agua precipitan los colorantes y recién entonces actúan, tornándose otra vez inactivos cuando han precipitado del todo.

- 2- Volcar y sin lavar, recubrir con el colorante de Giemsa en la dilución de una gota o una gota y media de colorante por cada mililitro de agua. Dejar actuar de 15 a 30 min.

- 3- Lavar con agua corriente y secar.

Los hematíes se tiñen de rojo ladrillo, el núcleo de los leucocitos y las sustancias azurófilas de color azul violeta, las granulaciones de los neutrófilos de color rosa parduzco, las de los basófilos de color violeta oscuro, las de los eosinófilos de color rojo anaranjado, el citoplasma de los parásitos de color azul celeste y las sustancias cromáticas de color púrpura o rojo violáceo.

- 4- Colocar una gota de aceite de inmersión y observar con objetivo de inmersión con condensador alto.

Técnica de la gota gruesa de Ross

- 1- Se depositan varias gotas de sangre superpuestas en un portaobjeto bien limpio y desengrasado. Las mismas se extienden en forma circular con un palillo o bien girándola sobre el dedo, de manera de cubrir una superficie de 1,5 a 2,0 cm de diámetro

durante 3 a 5 min. Esto se hace para que los parásitos no queden atrapados en las redes de fibrina (desfibrinar).

- 2- Se deja secar al aire libre, al abrigo del polvo y de las moscas.
- 3- Se hace una dilución de la solución de Giemsa, en la proporción de una gota del colorante por 20 gotas de buffer pH 7,2, que se vuelca sobre el preparado y se deja actuar por espacio de media hora. De esta manera se hace la deshemoglobinización (lisis de hemáties) y la coloración en forma simultánea.
- 4- Se lava suavemente con buffer pH 7,2. Se deja secar al aire libre o con una estufa. La coloración preferiblemente debe realizarse boca abajo y que el colorante actúe por contacto para evitar formación de artefactos.
- 5- Una vez seco, se examina al microscopio óptico.
- 6- Todas las maniobras que se realizan durante la ejecución de la coloración deben ser ejecutados con movimientos suaves para evitar que se desprenda del portaobjeto la delgada película que deseamos colorear.
- 7- Se observan teñidos los núcleos y granulaciones de neutrófilos, eosinófilos, basófilos. Los citoplasmas de los parásitos se colorean de azul celeste y las sustancias cromáticas de color púrpura o rojo violáceo.

Buffer de fosfato pH= 7,0

Fosfato monopotásico	1 g
Fosfato disódico	33,7 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

Colorante de May-Grunwald.

Eosinato de azul de metileno	0,25 g
Alcohol metílico puro y neutro	100 ml

Colorante de Giemsa.

Azur II eosina	3 g
Azur II	0,8 g
Glicerina	200 ml
Alcohol metílico	312 ml

COLORACIONES UTILIZADAS EN COPROPARASITOLOGÍA

Lugol

Preparación: Solución de reserva

Iodo Metálico (cristales en polvo)	5 g
Ioduro de potasio	10 g
Agua destilada c.s.p	100 ml

Se recomienda usarlo diluido 1:5 (solución de trabajo o de D'Antoni). El lugol debe guardarse en frascos color caramelo, en la oscuridad y en la heladera. Las soluciones de iodo pierden progresivamente el color y sus propiedades tintoriales, por eso deben prepararse soluciones frescas cada dos o tres semanas.

Procedimiento: Colocar sobre un portaobjeto una gota de materia fecal, agregarle una gota chica de lugol, mezclar, cubrir y observar al microscopio óptico. El citoplasma se tiñe de amarillo, la cromatina de pardo negruzco y el glucógeno de pardo caoba. El almidón y sus productos de degradación muestran los colores característicos.

Tinta China

Esta coloración resulta útil para investigar *Blastocystis hominis* en heces frescas y/o preservadas. Emplea tinta china con el agregado de formol sin diluir (al 40 %) en concentración final de 10%. Permite también observar con claridad microorganismos rodeados de cápsula (por ej. *Cryptococcus neoformans*).

Procedimiento: Depositar una gota de materia fecal sobre un portaobjeto, mezclar con una gota de tinta china o nigrosina, colocar un cubreobjeto y observar antes que se seque. Permite visualizar la gruesa cápsula mucosa que rodea al parásito.

Coloración de Gram-Weigert:

Esta coloración resulta útil para la visualización de quistes de *Pneumocystis jirovecii*

Técnica:

- 1- Extender el material a colorear sobre portaobjeto y dejar secar.
- 2- Fijar con metanol tres minutos y dejar hasta evaporación y secado.
- 3- Colorear con eosina amarilla durante 5 minutos.
- 4- Lavar con agua y añadir cristal violeta recién filtrado. Dejar 3 min.
- 5- Lavar con solución de iodo y dejar con esta solución 5 minutos.
- 6- Lavar con agua, secar cuidadosamente con papel, tanto la parte superior como la inferior del portaobjetos y dejar secar al aire.
- 7- Decolorar con anilina- xileno hasta que no desprenda más color púrpura (el extendido debe quedar color rosado).
- 8- Enjuagar con xileno, secar al aire y observar con inmersión. Entre 10 y 15 minutos.

Los quistes de *Pneumocystis jirovecii* hongos se tiñen de azul oscuro e irregularmente. Los núcleos celulares pueden teñirse de azul si no están bien decolorados, pero no son tan oscuros como los quistes de *Pneumocystis jirovecii*.

Reactivos:

- Eosina: Disolver 1g de eosina amarilla en 100 ml de agua destilada.
- Cristal violeta: mezclar solución A y B. Filtrar antes de usar. Estable por tres meses.
- Solución A: mezclar 2 ml de anilina con 88 ml de agua destilada. Filtrar
- Solución B: disolver 5 g de cristal violeta en 10 ml de etanol al 95%.
- Solución de Iodo: 2 g de IK + pequeña cantidad de agua destilada. Agregar 1 g de iodo y llevar a 300 ml con agua destilada.
- Anilina-xileno: mezclar partes iguales de los 2 reactivos.

Técnica tricrómica para la tinción de protozoarios intestinales

Se insiste en la importancia de utilizar técnicas de tinción permanente, en muestras de materia fecal para encontrar e identificar con mayor seguridad los protozoarios intestinales. Los frotis teñidos son el mejor método para conservar pruebas positivas de la existencia de tales enteroparásitos identificados.

La coloración tricrómica es un procedimiento del que pueden obtenerse resultados uniformemente satisfactorios con el material fresco y preservado en alcohol polivinílico (APV).

Preparación de un frotis para teñir.

De muestras frescas, utilizando una varilla preparar un frotis de una muestra de heces sobre un portaobjeto limpio. Si es necesario diluir las heces con solución fisiológica. Sumergir el portaobjeto inmediatamente en el fijador de Schaudin. (ver sol. 1). El frotis no debe dejarse secar hasta que se monte (esto es muy importante). Si se debe interrumpir los pasos de tinción, los portaobjetos pueden almacenarse por largo tiempo el último paso de alcohol de 70 % (paso anterior a la tinción).

De muestras fijadas en APV con una varilla extender 2-3 gotas de muestra, fijarlas con APV, sobre 1/3 de la superficie del portaobjeto. Las extensiones se dejan secar completamente, ya sea durante una noche en una estufa a 37 °C o a temperatura ambiente. Es importante que las extensiones se sequen completamente, para impedir que se lave el material durante la tinción.

Método de tinción con muestras frescas

- Fijador de Schaudinn (sol. 1) 5 min. a 50 °C o 1 hora a temperatura ambiente.
- Alcohol 70 %, mas iodo (sol. 2) 3 minutos.

- Alcohol 70 % 3 minutos.
- Teñir con la sol. tricrómica (sol. 3) de 2 a 8 minutos.
- Alcohol 90% acidificado (1 gota de Ac. Acético Glacial en 10 ml. de alcohol- sol.4) 10-20 segundos.

- Alcohol 95-100 %. Lavar dos veces.
- Alcohol 100 % 3 minutos.
- Xileno 3 min. hasta que no se aprecie refracción en la interfase xileno-preparación.

Método de tinción con APV

- Alcohol 70 % más iodo (sol.2) 10 a 20 minutos.
- Alcohol 70 % de 3 a 5 minutos.
- Alcohol 70 % de 3 a 5 minutos.
- Teñir con sol. tricrómica (sol.3) de 6 a 8 minutos.
- Alcohol 90% acidificado de 10 a 20 segundos.
- Alcohol de 95 % a 100 %. Lavar.
- Alcohol de 95-100 % 5 minutos.
- Alcohol 100 % de 5 a 10 minutos.
- Xileno 10 min.

Solución 1 Schaudinn:

- Fijador alcohol etílico 95 % 1 parte
- Cloruro mercurico, saturado, sol, acuosa (14g x 100 ml agua) 2 partes
- Antes de utilizar añadir 5 ml. de ac. acético glacial a 100 ml de solución.

Solución 2:

- Alcohol de 70 % más cristales de iodo hasta color ámbar o vino oporto
- Solución 3. Colorante tricrómico.
- 2 R cromotopo 0,6 g
- SF verde claro 0,3 g
- Ac. fosfotúngstico 0,7 g
- Ac. acético glacial 1 ml
- Agua destilada c.s.p. 100 ml

Se agrega 1 ml de ácido acético glacial a los componentes secos. Esta mezcla se deja reposar y madurar durante 15-30 min. Luego se añaden 100 ml de agua destilada.

Reacciones de la tinción tricrómica: Las preparaciones se examinan con objetivo de inmersión. El citoplasma de quistes y trofozoítos fijados es de color azul verdoso con tonos púrpuras. La cromatina nuclear, cuerpos cromatínicos, glóbulos rojos y bacterias ingeridas se tiñen de rojo o rojo púrpura. El material de fondo normalmente se tiñe de verde que contrasta con el color de los protozoos.

Tinción de Ziehl-Neelsen

La tinción de Ziehl-Neelsen es una técnica de tinción diferencial rápida y económica, usada para la identificación de bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR), que se basa en que las paredes celulares de ciertos parásitos y bacterias contienen ácidos grasos (por ejemplo, el ácido micólico) de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos.

Por esto se denominan bacilos ácido-alcohol resistente o BAAR. Las micobacterias como *M. tuberculosis* y *M. marinum* y los parásitos coccídeos como *Cryptosporidium* se caracterizan por sus propiedades de ácido-alcohol resistencia. La coloración clásica de Ziehl-Neelsen requiere calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana que contiene ceras.

Técnica:

- 1.-Fijar el extendido por calor
- 2.-Cubrir el preparado con sol. de fucsina y calentar el preparado hasta desprendimiento de humos blancos, durante 5 min. Agregar agua si el preparado comienza a desecarse.
- 3.-Lavar con agua y decolorar con alcohol ácido.
- 4.-Lavar con agua y contra colorear con azul de metileno durante 1 min.
- 5.-Lavar y secar al aire. Mirar a 100 x.

Reactivos:

- Fucsina:

- a) Disolver 3 g de fucsina en 10 ml al 95 %
 - b) Disolver 5 g de fenol cristalizado en 100 ml.
 - c) Mezclar 10 ml de solución A con 90 ml de solución B y guardar a temperatura ambiente durante 3 meses.
- Alcohol ácido: 3ml de HCL + 97 ml de alcohol al 95 %.
- Azul de metileno: 0,3 g de azul de metileno + 100 ml agua destilada.

Técnica: hay dos variantes de esta técnica, la llamada "en caliente" y "en frío" o de Kinyoun y se siguen los siguientes pasos:

Variante clásica o "en caliente"

1. Hacer un frotis de la muestra de esputo.
 - a-La fijación al calor asegurará de que el frotis quede adherido al portaobjetos. Un frotis muy delgado puede darle resultados falsamente negativos y un frotis muy grueso puede desprenderse del portaobjetos durante la tinción.
 - b- Utilizando pinzas, coloque los portaobjetos en una gradilla de tinción con los extendidos hacia arriba. Coloque todos los portaobjetos orientados uniformemente, con el frotis hacia arriba. Nunca tiña más de 12 portaobjetos a la vez.
2. Dejar el frotis sobre el puente de tinción.
3. Aplicar fucsina-fenicada.
 - a-Deje que el colorante permanezca sobre los portaobjetos durante 5 minutos. Mantenga el calor durante este período.
4. Calentar con un mechero hasta la emisión de vapores (3-5 minutos).
 - a-Se requiere el tiempo adecuado para que la fucsina fenicada penetre y tiña la pared celular de la bacteria. No deje que hierva o se seque el colorante.
 - b- Lave suavemente el colorante de cada portaobjetos con agua corriente fría hasta que toda la tinción libre quede lavada. Lave suavemente de manera que el extendido no se barra del portaobjetos. Retire el exceso de agua.
5. Decolorar con alcohol-ácido.
 - a-Cubra cada portaobjetos con la solución decolorante, tal como alcohol ácido y manténgalo sobre el portaobjetos durante 3 minutos. Si no se decolora suficientemente, el contenido del esputo que no son bacilos de tuberculosis puede permanecer teñido. Enjuague con agua una vez más los portaobjetos y quite el exceso de agua. Si los portaobjetos aún están rosas, aplique una cantidad adicional de la solución decolorante de 1 a 3 minutos.
6. Aplicar azul de metileno (1 minuto).
 - a-Aplique la solución de contraste, azul de metileno, durante 1 minuto.
7. Enjuagar con agua
 - a-Vuelva a enjuagar con un leve chorro de agua e incline cada portaobjetos hasta drenar el exceso de agua. Finalmente, coloque cada portaobjetos en una gradilla a que sequen al aire.
 - b- Ahora coloque una pequeñita gota de aceite de inmersión y haga la observación al microscopio óptico con 100 x

Variante de Kinyoun o en "frío"

Fijar los extendidos con metanol.

1-Cubrir con carbolfucsina durante 5 minutos + calor hasta vapores blancos una vez.

2-Lavar con agua. Decolorar con H_2SO_4 al 5 % 30 - 60 segundos.

3-Lavar con agua. Escurrir. Agregar azul de metileno 3 minutos.

4-Lavar secar. Observar a 100 x.

Permite observar ooquistes de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* y *Cyclospora* (color rojo a rosado) debido al comportamiento ácido resistente de la cubierta quística de estos parásitos.

Reactivos:

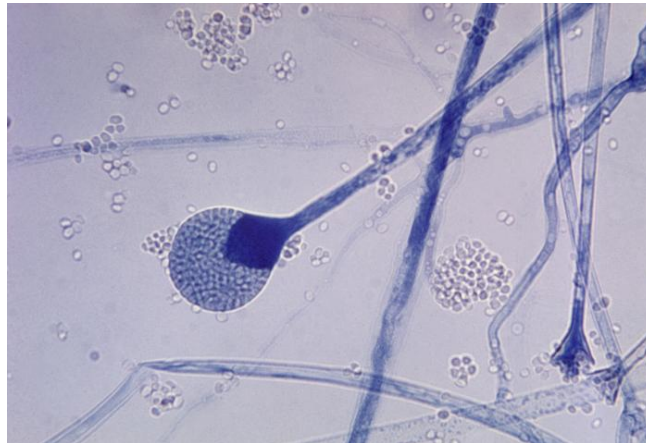
- Solución A: 0,3 g de fucsina + 10 ml de etanol al 95 %
- Solución B: 5g de fenol + 100 ml de agua destilada Calentar hasta disolución.
- Mezclar A y B. Conservar a temperatura ambiente. Estable 1 año.
- Decolorante: 5 ml H_2SO_4 (c) + 95 ml de agua destilada
- Azul de metileno: 0,3g de azul de metileno + 100 ml de agua destilada.

BIBLIOGRAFIA

- VII Curso de Paludismo INEI –Dr. Carlos Malbrán (2008)
- Curso de Toxoplasmosis Federación Bioquímica Argentina (2008)
- Botero Restrepo (2003). Parasitosis Humanas - Corporación para investigaciones Biológicas
- Bases del diagnóstico Microscópico de Paludismo. Parte I. Guía del Alumno, Organización Mundial de la Salud (2014).
- Manual operativo para el diagnóstico laboratorio de paludismo http://saladesituacion.salta.gov.ar/php/documentos/materiales_descarga_programas_epi/dir_eccion/paludismo/manual_operativo_para_el_diagn%C3%B3stico_laboratorio_de_paludismo.pdf (2018).
- Medios auxiliares para el diagnóstico - Microscópico del paludismo. Ginebra, Organización Mundial de la Salud (2010).



Micología



TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N.º 5: ESTERILIZACIÓN

Objetivos del trabajo práctico:

- Realizar correctamente la esterilización del material a utilizar en el laboratorio.
- Conocer las diferentes metodologías de esterilización.

INTRODUCCIÓN TEORICA

En el medio ambiente existen microorganismos que están contaminando los objetos que se encuentran en él. Así en el aire, agua y suelo, existen agentes patógenos y/o saprófitos que aprovechan los nutrientes a su alcance para desarrollarse o permanecer sobre ellos. Esta situación crea dificultades en los estudios microbiológicos, ya que para estudiar los microorganismos es fundamental tenerlos en cultivos puros.

Definición de términos:

Esterilización: es la práctica que tiene por fin destruir todos los microorganismos contenidos en una preparación. El material tratado se denomina estéril.

Desinfectante: se denomina así generalmente a un agente químico capaz de destruir microorganismos patógenos o perjudiciales. Normalmente se emplean para tratar objetos inanimados; por ello se pueden utilizar concentraciones más elevadas y por un tiempo más prolongado que en organismos vivos.

Se utiliza el término de séptico cuando un lugar u objeto posee microorganismos patógenos y estos pueden desarrollarse.

Agentes antisépticos: son sustancias químicas capaces de destruir los microorganismos o detener su desarrollo o acción.

Fungicida: son productos que destruyen totalmente los hongos.

Fungistático: son productos como por ejemplo los fungicidas que dependiendo de su concentración impiden la multiplicación de un hongo.

MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN

MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN	FÍSICOS	CALOR HÚMEDO	EBULLICIÓN TYNDALIZACIÓN PASTEURIZACIÓN
			VAPOR A PRESIÓN (AUTOCLAVE)
		CALOR SECO	FLAMEADO INCINERACIÓN HORNO PASTEUR (AIRE CALIENTE)
		RADIACIONES	RAYOS GAMMA RAYOS X RAYOS ULTRAVIOLETA
	QUÍMICOS	MECÁNICOS	FILTRACIÓN SEDIMENTACIÓN
		GASES	OXÍDO DE ETILENO OTROS

Por agentes Físicos:

1) Temperatura

Métodos de aplicación:

a) **Fuego directo:** consiste en exponer los objetos a la llama de un mechero (ansas, boca de tubos de ensayos y matraces, pipetas Pasteur, material de cirugía, etc.).

b) **Autoclave:** es un equipo que esteriliza a través de calor húmedo, al emplear vapor de agua a presión regulada. Consta de una cámara de doble pared que se llena de vapor saturado libre de aire y se mantiene a la temperatura indicada y a la presión establecida durante un periodo de tiempo determinado. En la parte inferior recibe calor por combustión de gas o por una resistencia eléctrica, esta se cierra en la parte superior por una tapa de bronce. Esta tapa posee tres orificios, uno para el manómetro, otro para el escape de vapor en forma de robinete y el tercero, para una válvula de seguridad.

Es un método muy efectivo ya que el vapor de agua difunde por osmosis a través de las membranas de los microorganismos coagulando sus proteínas. Se utiliza para esterilizar medios de cultivos, agua destilada, etc. Generalmente se esteriliza a temperaturas que van entre 107 – 126 °C por un tiempo de 5 a 20 minutos y a una presión de 1 atm. Tiene la ventaja de proporcionar un calentamiento rápido, así como un alto grado de penetración.

Manejo de autoclave:

1. Asegurarse de que haya un buen nivel de agua en el autoclave. Si no hay suficiente, agregarla hasta que casi llegue a la parrilla inferior procurando que su nivel no alcance a los objetos que se disponen sobre ella.

2. Introducir el material que se va a esterilizar procurando que quede bien colocado para evitar algún problema y cerrar la puerta ajustándola bien. Debe de quedar herméticamente cerrado. Las mariposas que cierran la tapa superior se deben ajustar de a pares y enfrentadas.

3. Abrir la válvula de salida de vapor y encender la fuente de calor del autoclave.

4. A medida que suba la temperatura del agua (ver el termómetro), empezará a salir una mezcla de vapor-aire por la válvula de salida de vapor, dejar que escape esta mezcla hasta que solo salga un flujo continuo de vapor y el aire haya sido eliminado; a esto se le llama purgar el autoclave.

5. Una vez purgado el autoclave, cerrar la válvula de salida de vapor y dejar que la presión suba hasta 1 Atm (vigilar el manómetro), lo que proporciona una temperatura de 121 °C. Observar que no es la presión del autoclave lo que mata a los microorganismos sino la elevada temperatura que puede alcanzarse cuando el vapor de agua se somete a presión.

6. En ese momento empezar a contar el tiempo.

7. Transcurridos 15 minutos a esta presión, cerrar la fuente de calor y dejar que el autoclave se enfríe sólo (no abrir la válvula de salida de vapor), hasta que la presión haya bajado a 0 atmosferas.

8. Abrir el autoclave y dejar que el material se enfríe hasta que tenga una temperatura a la cual pueda tomarse con las manos.

Forma de colocar el material:

Los paquetes deben colocarse uno seguido del otro y siempre dejando espacios para que el vapor penetre entre los paquetes (tratar de no llenar el autoclave). No introduzca material revuelto con otro tipo, porque tienen distintos tiempos de esterilización. Colocar de lado las botellas, frascos y cualquier clase de recipiente no poroso de material seco. Esto permite un pronto desplazamiento del aire y un rápido contacto del vapor con las superficies. También facilita el secado.

Cuando se esterilizan líquidos, debe hacerse con los recipientes destapados. La cristalería deberá esterilizarse colocando los recipientes boca abajo u horizontales (nunca con la boca hacia arriba).

¿Qué se puede esterilizar?

Textil
Líquidos Hidrosolubles
Material de caucho
Instrumental en bandeja
Medios de cultivo
Solución fisiológica
Guantes de Caucho (hule)
Sondas
Torundas
Instrumental de acero inoxidable

¿Que no se puede esterilizar?

Sustancias grasas.
Materiales termo sensibles.
Instrumental metálico cromado ó
niquelado.
Sustancias que no sean hidrosolubles.
Sustancias pulverulentas.

Ventajas del calor húmedo:

- Rápido calentamiento y penetración
- Destrucción de bacterias y esporas en corto tiempo
- No deja residuos tóxicos
- Hay un bajo deterioro del material expuesto
- Económico

Desventajas:

- No permite esterilizar soluciones que formen emulsiones con agua
- Es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos

c) **Estufas:** la esterilización se efectúa por calor seco. Se acostumbra a aplicar una temperatura de 160 °C a 170 °C durante una hora o más. Para materiales de vidrio de laboratorio es suficiente una exposición de dos horas de duración a 160 °C. En este tipo de esterilización existe una destrucción de los microorganismos oxidando sus constituyentes químicos, desnaturalizando las proteínas y los ácidos nucleicos y fragmentando las membranas celulares. Este método se utiliza preferentemente para esterilizar material de vidrio, ejemplo: placas de Petri, tubos de ensayo, matraces, pipetas, etc. Es necesario señalar que, por razones de dilatación en el proceso de esterilización, en el caso de pipetas volumétricas y matraces aforados, estos no deben esterilizarse a temperaturas superiores a los 140°C. Los materiales que no se pueden esterilizar por calor seco son: material textil (algodón, sedas, lino etc.) gomas y materiales sintéticos.

La gran variedad de productos factibles de ser esterilizados por esta variante, requiere que se establezca distintas relaciones tiempo – temperatura:

- Vidrio 160 °C 120´
- Instrumental 160 °C 120´ (170 °C 60´)
- Aceites y Polvos 160 °C 120´ (170 °C 60´)
- Gasa vaselinada 160 °C 150´
- Polvos c/ sulfas 140 °C 180´
- Glicerina 160 °C 120´ (170 °C 60´)

Consideraciones Generales:

Algunos materiales no soportan la esterilización por vapor y por lo tanto se selecciona este método para procesarlos. La muerte de los microorganismos es debida a la coagulación de las proteínas celulares, siendo las esporas más resistentes que las células vegetativas.

Los elementos a esterilizar deben estar libres de materia orgánica, grasas o aceites que aíslan los microorganismos de la acción del agente esterilizante.

La temperatura nunca debe ser menor a 160 °C, durante 1 hora para permitir la coagulación de proteínas. El material debe estar seco, ya que la humedad en el mismo disminuiría la temperatura por evaporación del agua. No se debe abrir la puerta de la estufa iniciado el proceso ya que produce descenso de la temperatura en el interior de la misma y por lo tanto también del material. Al definir el tiempo de esterilización se debe tener en cuenta la demora entre que la cámara alcanza la temperatura deseada. Es importante la distribución de las cajas en la estufa para permitir la circulación del aire caliente (no superponer). La carga no debe superar el 70/80 % de la capacidad de la cámara. Utilizar indicadores biológicos para verificar el proceso.

Ventajas del calor seco:

- No es corrosivo para metales e instrumentos.
- Permite la esterilización de sustancias en polvo y no acuosas, y de sustancias viscosas no volátiles.

Desventajas:

Requiere mayor tiempo de esterilización, respecto al calor húmedo, debido a la baja penetración del calor.

2) Radiaciones

Las primeras conocidas por su actividad son las ultravioletas; estas son las menos eficaces debido a su gran longitud de onda (se pueden utilizar para esterilizar bolsas de polietileno o papel, además de otros usos). Los rayos X y rayos gamma liberan una energía más importante y debido a ello penetran más profundamente. Por su poder de penetración más intenso estas radiaciones son más eficaces, pero sus instalaciones son costosas.

Su acción depende de:

- El tipo de radiación
- El tiempo de exposición
- La dosis

a) Radiaciones ionizantes: Producen iones y radicales libres que alteran las bases de los ácidos nucleicos, estructuras proteicas y lipídicas y componentes esenciales para la viabilidad de los microorganismos, dando lugar a mutaciones en los microorganismos que los incapacitan metabólicamente para producir una enzima esencial y sobreviniendo la muerte bacteriana. Las radiaciones tienen gran penetrabilidad y se las utiliza para esterilizar materiales termolábiles como jeringas descartables, sondas, etc. Se utilizan a escala industrial por sus costos.

b) Rayos X: Penetran bien, pero requieren mucha energía, son pocos operativos para su empleo masivo, su uso es muy costoso, por lo tanto, son muy poco usados con fines de esterilización

c) Rayos Ultravioletas: Afectan a las moléculas de ADN (ácido desoxirribonucleico) de los microorganismos. El ADN absorbe una longitud de onda de 260nm de longitud de onda y libera energía ocasionado rearrreglo de enlaces químicos son escasamente penetrantes y se utilizan para superficies y para la esterilización en quirófanos.

3) Eliminación mecánica

La filtración se utiliza para esterilizar soluciones que posean sustancias termolábiles como por ejemplo proteínas o hidratos de carbono, que no soportan altas temperaturas. Consiste en filtrar las soluciones a través de filtros que solo dejan pasar partículas ultra-diminutas. Los filtros son de diversos tipos; los primeros que se utilizaron fueron los filtros Chamberland (de porcelana); hoy en día estos han sido reemplazados por las membranas de acetato de celulosa llamados también filtros moleculares de porosidad graduada.

Por Agentes químicos

El alcohol etílico en concentraciones de 50 a 70 % es uno de los más utilizados. El alcohol metílico es menos activo, pero más nocivo. Los alcoholes poseen una acción similar al calor coagulando las proteínas. El uso de gases permite esterilizar productos inestables al calor como los objetos de plástico. Tipos de gases utilizados:

Con aldehídos:

Son agentes alquilantes que actúan sobre las proteínas, provocando una modificación irreversible en enzimas e inhiben la actividad enzimática.

a) Formaldehído: los vapores de formaldehído se pueden obtener por calentamiento de soluciones diluidas de formaldehído o por los productos de polimerización de este aldehído. Estos vapores poseen un poder antimicrobiano que aumenta con la temperatura y humedad. Debido a la toxicidad de los vapores, estos deben evacuarse una vez terminada la desinfección.

b) Glutaraldehído: consiste en preparar una solución alcalina al 2 % y sumergir el material a esterilizar de 20 a 30 minutos, y luego un enjuague de 10 minutos. Este método tiene la ventaja de ser rápido y ser el único esterilizante efectivo frío. Puede esterilizar plástico, goma, vidrio, metal, etc. El material debe estar completamente libre de materia orgánica y seco, pues la humedad provoca dilución del desinfectante y la materia orgánica interfiere en el proceso. La solución de glutaraldehído al 2 % se debe encontrar en período vigente (consignar fecha de preparación y vencimiento en el contenedor). Las soluciones se deben manipular con protección adecuada para evitar la exposición del personal que las manipula. Para el glutaraldehído al 2 %, el tiempo no debe ser inferior a 20 minutos. En caso de agentes químicos como el glutaraldehído al 2 % los materiales a desinfectar deben sumergirse completamente. Se debe mantener los contenedores tapados para evitar la evaporación y vapores tóxicos en el ambiente. Cumplido el tiempo de exposición se deben sacar los artículos manipulándolos con técnica aséptica (guantes estériles) y enjuagarlos con agua destilada o

estéril cuidando no contaminarlos. Si no serán utilizados de inmediato deben secarse con aire comprimido.

c) Óxido de etileno: poseen un amplio espectro de acción. El óxido de etileno es gaseoso a temperatura ambiente y líquido a una temperatura inferior a 10 °C. Su acción en base a la temperatura le permite entrar en contacto con los productos y objetos más diversos y su poder penetrante asegura la esterilización de telas y aun de ciertos plásticos. Es un agente alquilante que se une a compuestos con hidrógenos lábiles como los que tienen grupos carboxilos, amino, sulfhidrilos, hidroxilos, etc. destruye todos los microorganismos incluso virus. Sirve para esterilizar materiales termosensibles como el descartable (goma, plástico, papel, etc.). Es muy peligroso por ser altamente inflamable y explosivo, y además cancerígeno.

El óxido de etileno desde los años 50 ha sido el agente esterilizante por excelencia y desde que comenzó a utilizarse ha demostrado ser uno de los métodos más sencillos, seguros y económicos para esterilizar a baja temperatura toda una gama de dispositivos médicos.

Materiales que nunca deben esterilizarse con óxido de etileno:

- Siliconas y material confeccionado con este elemento por el gran poder de absorción y la facultad de eliminar los residuos tóxicos.

- El material previamente esterilizado en rayos gamma, no debe re-esterilizarse en óxido de etileno por que el proceso de rayos gamma permite que se liberen moléculas de cloro, que al combinarse con el óxido de etileno se convierten en etilenclorina, compuesto de gran toxicidad.

- No se recomienda esterilizar sustancias líquidas ni agua ya que esta última al contacto con el óxido de etileno forma etilenglicol, compuesto altamente tóxico.

- Telas y madera tiene gran penetración de óxido de etileno, por lo tanto, requiere mayor tiempo de aireación.

CONTROLES DE ESTERILIZACIÓN

En la actualidad no es suficiente someter los materiales al proceso de esterilización, sino que además se requiere cierto grado de seguridad en la eficiencia del procedimiento.

Los controles de esterilización se pueden clasificar en tres grupos:

1. Monitores físicos:

Son elementos incorporados al esterilizador como termómetros, manómetros de presión, sensores de carga, válvulas y sistemas de registro. Estos monitores físicos son de

gran utilidad, pero no son suficientes como indicadores de esterilización. Deben ser calibrados periódicamente.

2. Indicadores químicos:

Son productos comerciales consistentes en sustancias químicas que cambian de color si se cumple un elemento clave del proceso de esterilización como por ejemplo la temperatura necesaria. Algunos indicadores requieren más de un parámetro como cierto tiempo de exposición y humedad para cambiar de color. Pueden ser fabricados de papel especial, cintas autoadhesivas o consistir en tubos de vidrio con líquidos especiales. Los indicadores químicos son diferentes de acuerdo al proceso utilizado (calor seco, húmedo o gas).

3. Indicadores biológicos:

El uso de un producto estéril, y el proceso que produce este producto estéril, es crítico para el programa del control de infecciones. Un producto estéril es aquel que está libre de microorganismos viables. Los indicadores biológicos se usan para comprobar la eficiencia de un proceso de esterilización. Están diseñados para confirmar la presencia o ausencia de microorganismos viables después del proceso de esterilización. Existen diferentes indicadores biológicos según el sistema de esterilización. El indicador biológico contiene esporas que son las más resistentes al método de esterilización empleado.

Este "indicador biológico" se coloca dentro del autoclave junto con el resto del material durante el proceso de esterilización y después de terminado el ciclo de esterilización, este indicador sería controlado para ver si existía crecimiento.

Durante la validación de un ciclo de esterilización, los indicadores biológicos permiten medir la letalidad producida por dicho ciclo.

Al finalizar el ciclo de esterilización se retira el indicador y se lo incuba a temperaturas de crecimiento óptimas. Si el indicador está estéril, no hay cambios en el color del medio de cultivo se considera que el ciclo de esterilización es efectivo. Si hay esporos sobrevivientes, estos germinan, crecen y modifican el medio de cultivo de modo que se produce un viraje del indicador de pH del violeta al amarillo con abundante turbidez. Esto significa que el proceso de esterilización ha sido insuficiente.

Una vez establecidas las condiciones de esterilización, es tan importante el monitoreo con indicadores biológicos como el control de los parámetros físicos de cada proceso.

El principio es el siguiente: el indicador se coloca en la zona más fría del autoclave (si el método es por calor húmedo) junto con el material a esterilizar. Si el tamaño del lote lo requiere, se debe utilizar una cantidad adecuada de indicadores distribuidos en toda la carga.

Es importante destacar que aun cuando se demuestre la muerte de las esporas, esto no necesariamente significará esterilidad de los artículos en esa carga debido a otras variables del proceso que deben cumplirse espacialmente en presencia de materia orgánica y sales.

Tipos de Indicadores biológicos:

- Tiras con esporas: es una tira con esporas que viene dentro de un sobre. Esta tira con esporas debe ser colocada dentro de un paquete de prueba. Generalmente requiere un tiempo de incubación de 7 días.
- Indicadores biológicos auto-contenidos: son los usados con mayor frecuencia y su ventaja está en que pueden ser incubados dentro de la misma Central de Esterilización. Su lectura es en 24 a 48 horas.
- Indicadores biológicos de lectura rápida: es un indicador auto-contenido y está basado en la detección de enzimas asociada a la espora del microorganismo. Este método permite su lectura de una a tres horas dependiendo del ciclo de esterilización.
- Indicador enzimático es un nuevo producto que consiste en una tableta con enzimas biológicas dentro de un tubo de vidrio con una tapa de esponja. Una vez terminado el ciclo de esterilización, se le agrega un reactivo y el resultado se lee a los 20 a 30 segundos.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DEL MATERIAL ESTÉRIL

Los artículos deben ser almacenados en forma que se utilicen primero los equipos que tienen menor tiempo de vigencia de la esterilización.

La duración de la protección de los elementos estériles empaquetados depende de la porosidad del envoltorio y del método de empaquetamiento. Las áreas de almacenamiento deben estar libres de polvo e insectos. Hay algunos factores como cambios en la temperatura, humedad, corriente de aire y ruptura del envase, que pueden contribuir a la contaminación. El artículo permanece estéril mientras el empaque se mantiene cerrado, indemne y seco.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Gnass, S., & De Andrade Stempliuk, V. (2008). Manual de esterilización para centros de salud
- Alonso Cuesta, P y Benito Lara, M.A (2008). Manual de Gestión de los procesos de esterilización y desinfección del material sanitario. Madrid: INSALUD.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N.º 6: PREPARACIÓN DE MATERIALES, MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y COLORANTES UTILIZADOS EN MICOLOGÍA

Objetivos del trabajo práctico:

El presente trabajo práctico capacitará al alumno en los siguientes ítems:

- Prepara medios de cultivo, soluciones y colorantes de uso frecuente en la práctica micológica.
- Esterilizar el material preparado para su posterior utilización.

Para un buen estudio micológico deben tenerse en cuenta todas aquellas precauciones de las técnicas microbiológicas, siendo de vital importancia la esterilidad de los materiales y medios de cultivo a ser utilizados. Hay que tener en cuenta que un buen resultado depende en gran medida del sitio de la toma de muestra como también de las condiciones de esterilidad de la misma, para evitar la contaminación con hongos indeseados que lleven a diagnosticar erróneamente al paciente.

MATERIALES UTILIZADOS EN MICOLOGÍA:

- **Hisopos:** Se utilizan para toma de muestras, los mismos deben estar estériles
- **Ansas en aguja y forma de L:** Para hongos filamentosos
- **Ansas en anillo:** Para hongos levaduriformes
- **Pinzas y bisturíes:** Se utilizan para toma de muestras, se esterilizan por inmersión en alcohol y quemado a la llama
- **Jeringas y agujas:** Sirven para toma y procesamiento de muestras clínicas, comercialmente se proveen estériles
- **Pipetas:** Es conveniente disponer de distintos volúmenes de pipetas estériles cuando se necesita transferir muestras líquidas o medios de cultivo
- **Tubos de ensayo y placas de Petri:** Se utilizan para distribución de los distintos medios de cultivo. Las placas suelen ser utilizadas además para recolección de muestras clínicas (escamas, uñas, pelos). La ventaja de los tubos es que ocupan poco lugar al incubarlos y el potencial de contaminación es menor, en contraste las placas proporcionan una mayor superficie para evidenciar cultivos mixtos y poder aislar un hongo en cuestión.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

-Sabouraud glucosado agar

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. También es útil para el cultivo de levaduras

Agar: 65 g

Agua destilada: 1000 ml

Fundir en mechero y distribuir 5 ml por tubo. Esterilizar 15 min a 121°C. Solidificar en pico de flauta.

Nota: mantener en lugar fresco pues la exposición al calor aumenta la hidrólisis de los componentes.

-Agar lactrimel

Medio utilizado para la fructificación de hongos filamentosos. Muy útil para observar la micromorfología de dermatofitos.

Miel de abeja: 2 g

Leche descremada: 40 ml

Harina común: 4 g

CO₃Ca: 0,5 g

Agar: 4 g

Agua destilada: 200 ml

Mezclar todos los componentes y calentar en mechero hasta una completa homogeneización de todos los componentes. Esterilizar en autoclave 15 min a 121 °C. Agregar la mezcla antibiótica y fraccionar en tubos estériles. Solidificar en pico de flauta.

-Agar papa glucosado

Medio de cultivo adecuado para el aislamiento y recuento de hongos y levaduras en alimentos, productos farmacéuticos y otros materiales de importancia sanitaria.

Papa: 40 g

Glucosa: 2 g

Agar: 4 g

Agua destilada: 200 ml

Pelar y rayar la papa. Disolver la glucosa en el agua y agregar el resto de los componentes. Hervir 20 minutos y filtrar con algodón. Esterilizar 15 minutos a 121°C. Agregar la mezcla antibiótica y fraccionar en tubos estériles. Solidificar en pico de flauta.

Medio comercial: Disolver 7,8 g del polvo en 200 ml de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos. Calentar hasta ebullición con agitación continua para disolución total. Distribuir en recipientes apropiados. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Si se desea ajustar el pH a 3,5 agregar aproximadamente 3 ml de una solución estéril de ácido tartárico al 10 %, cuando el agar se encuentra entre 45-50 °C. Distribuir en placas de Petri estériles.

-Agar Czapek - Dox

Medio utilizado para la identificación de especies de *Aspergillus*

Medio deshidratado: 9,6 g

Agua destilada: 200 ml

Calentar hasta ebullición con agitación continua para disolución total. Distribuir en tubos apropiados. Autoclavar 15 min a 121 °C. Solidificar en pico de flauta.

-Agar semillas de girasol

Medio selectivo y diferencial para el aislamiento de *Cryptococcus neoformans*

Extracto de semillas de girasol: 60 ml

Glucosa: 0,2 g

Agar: 4 gr

Agua destilada: 140 ml

Suspender los componentes en el agua destilada, esterilizar 15 minutos a 121 °C agregar la mezcla antibiótica (1 ml de ampicilina + 1 ml de gentamicina). Plaquear o fraccionar en tubos de ensayo adecuados. Solidificar en pico de flauta.

-Extracto de semillas de girasol

Moler 70 gr de semillas de girasol en molinillo de café, agregar 350 ml de agua destilada. Hervir y filtrar con gasa. Esterilizar a 121°C 15 minutos. Guardar a 4 °C herméticamente.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE ANTIBIÓTICOS PARA USO EN MICOLOGÍA

-Gentamicina

Llevar los 80 mg contenidos en la ampolla a 4 ml de volumen final con agua destilada. Fraccionar en tubos de a 1 ml. rotulados y conservar en freezer. Utilizar un tubo por cada 200 ml. de medio preparado (concentración final 100 µg/ml).

-Ampicilina

Disolver el contenido de un frasco de droga (1000 mg) en 5 ml de agua destilada (200000 µg/ml). Tomar 1 ml de esta solución y llevar a 10 ml con agua destilada (20000 µg/ml).

Fraccionar en tubos de a 1 ml. rotulados en el freezer. Utilizar 1 tubo cada 200 ml de medio preparado. (Concentración final 100 µg/ml).

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y COLORANTES

-Hidróxido de potasio 20%

Solución utilizada para disgregación de muestras clínicas y posterior observación microscópica. El hidróxido de potasio disuelve la queratina y permite visualizar los elementos fúngicos.

KOH:	2 g
Agua destilada:	10 ml

Mezclar los componentes y calentar hasta disolución. Guardar en frasco de vidrio.

-Lactofenol azul de algodón

Utilizada para la observación de los componentes fúngicos y apreciar fácilmente las estructuras para una adecuada identificación. El fenol inactiva las enzimas líticas de la célula e impide que ésta se rompa. El ácido láctico preserva las estructuras fúngicas, al provocar un cambio de gradiente osmótico con relación al interior fúngico, lo que genera una película protectora. El azul de algodón es un colorante ácido que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, mientras que el glicerol mantiene húmeda la preparación.

Azul de algodón:	0,05 g
Glicerina:	20 ml
Ácido láctico:	20 ml
Cristales de fenol:	20 g
Agua destilada:	20 ml

Disolver el fenol en agua, agregar el ácido y la glicerina. Calentar a 70 °C y adicionar el azul de algodón. Guardar en frasco de vidrio.

Nota: Los cristales de fenol tienden a oxidarse dando como consecuencia un producto rosado que es la felona. En tal caso lavar los cristales con Etanol 96°, esto produce la reducción del compuesto apareciendo nuevamente los cristales blancos típicos del fenol.

-Azul de metileno 1 % en solución acuosa

Solución utilizada para la observación de *Malassezia* en muestras clínicas

Azul de metileno:	0,1 g
-------------------	-------

Agua destilada: 10 ml

ACTIVIDADES A DESARROLLAR EN EL TRABAJO PRÁCTICO:

Preparación de materiales a esterilizar

Placas de Petri

Pipetas de 2,5 y 10 ml

Tubos de ensayo de 15 ml con tapón de algodón

Tubos tapa rosca de 5 ml

Envolver adecuadamente con papel el material de vidrio para su posterior esterilización en autoclave 15 minutos a 121 °C.

BIBLIOGRAFIA

- Medvedeff, M.G., Bargardi, S, Jerke, G; Horianski, M.A.; Amer, L. (2009). Guía de Trabajos Prácticos. Catedra de Microbiología e Inmunología. 1° Parte. Editorial Universitaria de UNaM. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones.
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. (2017). Microbiologia Médica. 8° Ed. Elsevier. España. Grafica Muriel.
- Ureña J. L. (2002). Microbiología Oral. Editorial McGRAW-HILL. Interamericana de España.
- Winn W. C., Allen S. D., Janda W. M., Koneman E. W., Procop G. W., Schrenckenberger P. C. y Woods G. L. (2008).
- Koneman. (2008). Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color. Edición 6a. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N.º 7: TÉCNICAS DE SIEMBRA Y AISLAMIENTO

Objetivos del trabajo práctico:

- Realizar correctamente la siembra de los microorganismos para lograr un cultivo microbiano puro.
- Conocer las diferentes temperaturas de incubación.
- Conocer distintas técnicas de siembra y su aplicación.
- Conocer y aplicar técnicas de aislamientos de microorganismos.
- Adquirir destreza en la generación de microcultivos y conocer su utilidad.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Siembra

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Luego de sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento. Todos los cultivos para hongos se incuban a temperatura ambiente o preferentemente a 30° C y se mantienen durante 30 días antes de descartarlos como negativos. Algunos hongos requieren incubación a 35-37° C para mostrar sus formas de levaduras.

La siembra puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido, utilizando punta, ansa, hisopo o pipeta estéril según la naturaleza de la muestra.

Siembra en medio líquido

Habitualmente se realiza en tubos o en matraces. El crecimiento se puede manifestar por enturbiamiento, por formación de velo o película, o por sedimento.

Siembra en medio sólido

Puede ser en tubos o placas:

Tubos con agar inclinado: Para sembrarlos, se mueve el ansa o la punta suavemente sobre la superficie del agar con un movimiento en zigzag desde el fondo hasta la parte superior, cuidando de no dañar el agar.

Tubos sin inclinar: Se siembran introduciendo una punta en el centro del agar. También se llama siembra por picadura.

Siembra en placas: Puede ser en superficie o incorporada.

En superficie: Se colocan 0.1 ml de la dilución de la muestra con pipeta estéril en el centro de la placa, y se distribuye con un rastrillo estéril. Se siembra con un ansa para aislar o se siembra con un hisopo.

Incorporada: Se coloca 1 ml de la muestra en una placa estéril vacía, en el centro de la misma. Sobre ella se agregan 20 ml de medio de cultivo sólido fundido y termostatzado a 45 °C; luego se agita la placa para que la muestra se mezcle con el agar y se deja solidificar.

En medio sólido cada célula viable dará origen a una colonia y por lo tanto la siembra en placas se puede utilizar, no solo para cultivar microorganismos, sino además para contar y aislar.

AISLAMIENTO

Aislar es separar un microorganismo a partir de una población que los contiene de varios tipos. En hábitats naturales raramente encontramos a los microorganismos en cultivo puro (un solo tipo de microorganismo), por lo tanto, es necesario hacer algún procedimiento de aislamiento para separar los distintos tipos de microorganismos presentes para luego así poder identificarlos.

El aislamiento se puede lograr directamente a partir de una muestra cuando el o los microorganismos están en una proporción adecuada.

Para aislar se utiliza alguno de los siguientes procedimientos:

Aislamiento por diluciones sucesivas en agar: Se aprovecha la propiedad que tienen los medios de cultivo con agar (medios sólidos), de permanecer líquidos a temperatura relativamente baja, lo que permite la incorporación de la mezcla microbiana. Una serie de 4 a 6 tubos de cultivo, cada uno de los cuales contiene 10 ml de un medio de agar adecuado, se calienta en baño de agua para fundir el agar. Enfriar el contenido de los tubos a 45° C; se añade al primero de ellos un volumen de 1ml del material que contiene la levadura agitando cuidadosamente, se lleva 1 ml a un segundo tubo y el resto se vierte asépticamente en una placa de Petri; se agita el segundo tubo y se separa 1 ml para el tercero, vertiendo el resto en la placa de Petri. Se continúa del mismo modo hasta obtener 4 o 6 muestras, y como el cultivo se va diluyendo de una a otra, en alguna de ellas habrá ya un cultivo puro con los microorganismos inmovilizados y separados uno de otro, originando colonias que se pueden contar para realizar el recuento.

Aislamiento por agotamiento en superficie: Existen distintas técnicas, el objeto es obtener colonias aisladas. Una de ellas consiste en cargar el ansa con la muestra y hacer estrías paralelas en la cuarta parte de la superficie de la placa; se quema el ansa, se enfría, se gira la placa 90° y se vuelve a estriar tocando 3 o 4 veces el área sembrada inicialmente y

cubriendo otro cuarto de placa. Por último, sin quemar el ansa, se estría el resto de la superficie sin sembrar. La placa también se puede dividir en cuadrantes sembrado en cada uno de ellos sin volver a cargar el ansa.

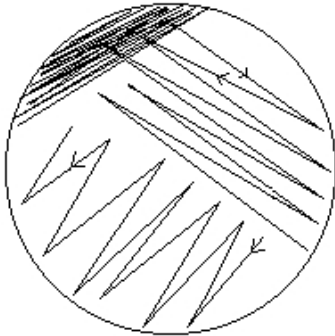


Figura 8: Esquema de aislamiento por agotamiento

http://biotecnologiatqi.blogspot.com/2009/09/plan-de-aislamiento-de-microorganismos_28.html

Aislamiento por siembra espontánea: Permite obtener la flora micológica del aire de una localidad o ambiente. Se colocan placas con medio de cultivo Sabouraud-glucosa abiertas en los lugares apropiados. Al cabo de un intervalo de tiempo variable (5-15-30 minutos), se cierran las cajas y se incuban a 28 ° C durante una semana. Aparecerán en la superficie colonias de hongos que se encontraban en el aire, se pueden realizar repiques de las colonias que nos interesen para trabajar con un hongo determinado.

MÉTODOS ESPECIALES DE AISLAMIENTO

Recurriendo a las propiedades biológicas del hongo: Por ejemplo, el anzuelo queratinoso permite el aislamiento de aquellos hongos capaces de desarrollar con queratina como única fuente de nutrición. La tierra en estudio es colocada en una caja de Petri estéril; sobre ella se colocan pelos (humanos o de caballo) estériles y se humecta. Se incuba a 28 °C durante 15 a 30 días, trasladando luego los pelos con los hongos queratinofílicos a un medio de cultivo adecuado.

Microcultivo

Permiten la observación microscópica del micelio fúngico y sus elementos de reproducción en forma intacta.

A-Cultivos de adhesión:

El preparado de microcultivo (también conocido como cultivo en portaobjeto) se realiza de la siguiente manera. En la superficie de una caja de Petri se coloca un pedazo de papel de filtro o un trozo de algodón y dos varillas de vidrio, cortadas de un tamaño adecuado. Se coloca un portaobjeto sobre las varillas y se esteriliza. Se corta un pequeño bloque de agar Sabouraud o similar previamente vertido en una caja de Petri hasta una profundidad de 4 mm. Esto puede hacerse usando una hoja de bisturí estéril o un tubo de ensayo recto estéril sin bordes. Con el mismo bisturí estéril se coloca el bloque de agar sobre la superficie del portaobjeto. Con un ansa aguja estéril se remueven porciones pequeñas de colonia de hongos que se desea estudiar y se inocula en los cuatros cuadrantes del bloque de agar. Luego de la inoculación, se coloca un cubreobjeto estéril sobre la superficie del agar. Se humedece el papel o el trozo de algodón y se incuba. La colonia crecerá por debajo de la superficie del cubreobjeto. Se examina el montaje periódicamente a simple vista para determinar si la colonia ha madurado y esta lista para su observación microscópica. Cuando es evidente el crecimiento, se retira cuidadosamente el cubreobjeto con pinzas estériles y se coloca en un portaobjeto que contiene una gota de lactofenol azul de algodón. Si se desea un montaje permanente, se limpia la superficie del portaobjeto inmediatamente adyacente al borde del cubreobjeto y se aplica esmalte para uñas color claro.

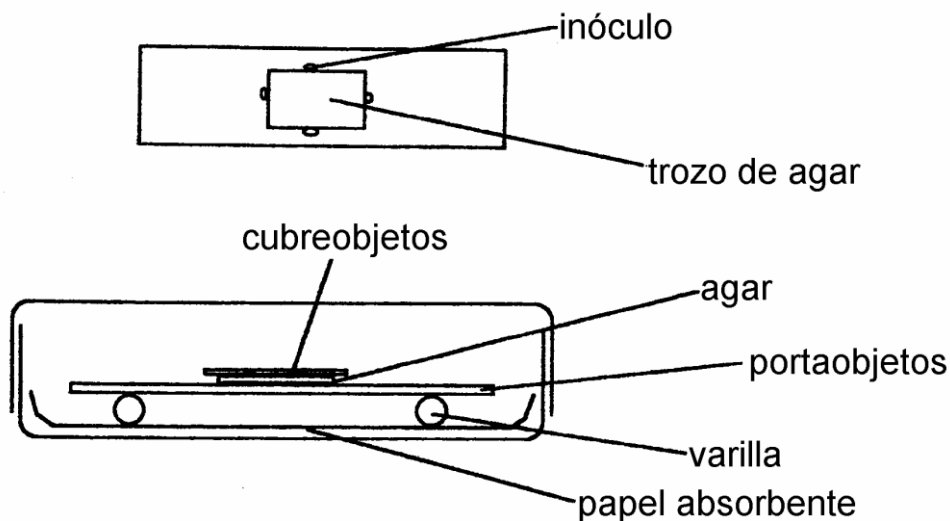
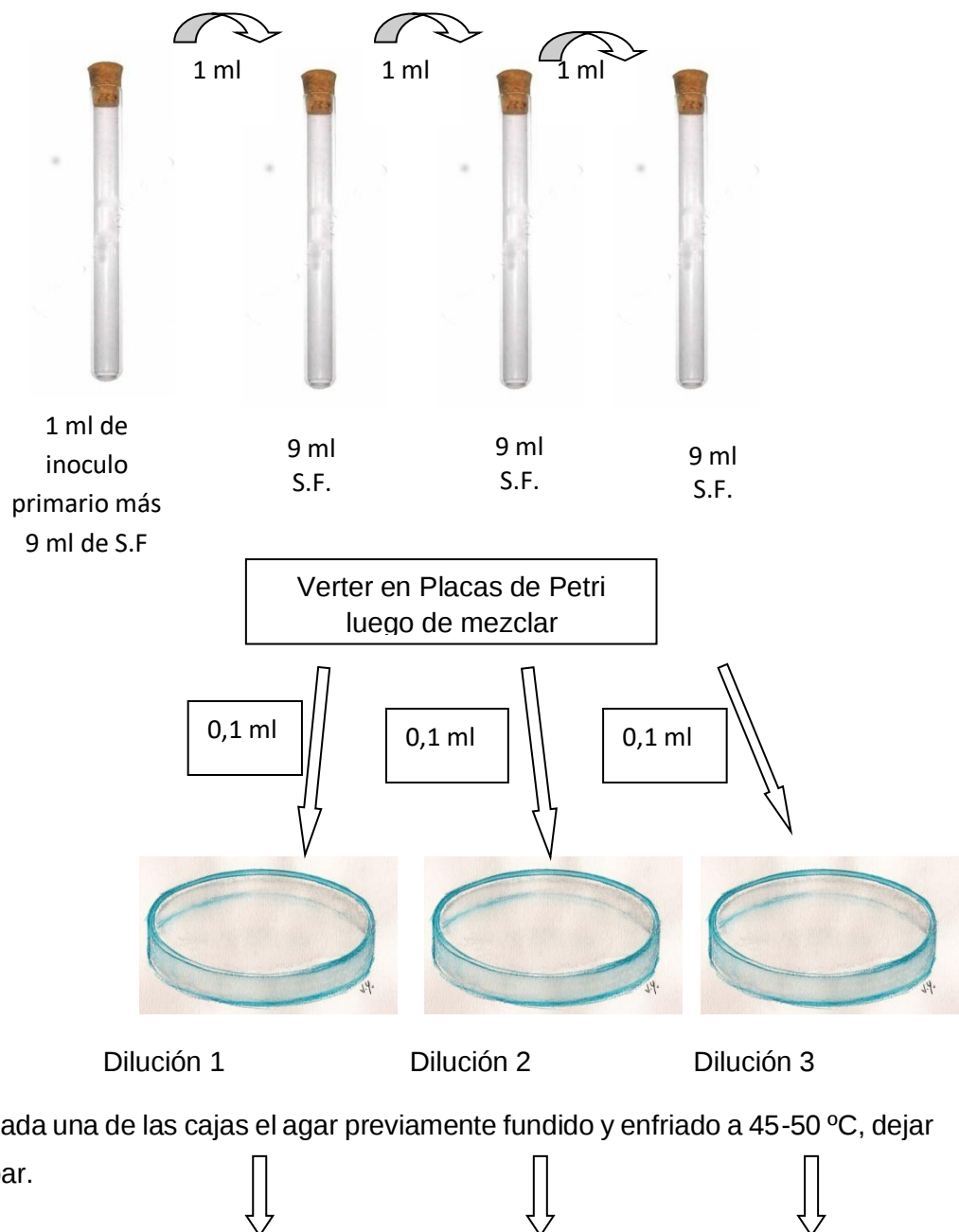


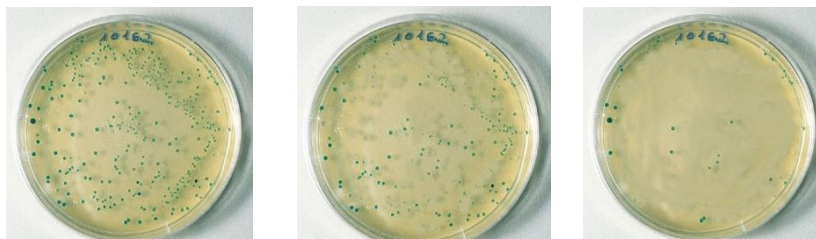
Figura 9: Esquema de microcultivo. Figura propia

B- Cultivo en lámina gelosada: En una placa de Petri estéril colocar los soportes y un portaobjeto previamente flameado. Depositar sobre el portaobjeto agar Sabouraud-Glucosa (previamente fundido, enfriado a 50 °C y sembrado con esporas del hongo a estudiar), obteniendo una lámina de medio bien delgada. Dejar solidificar. Humectar el fondo de la caja de Petri con agua destilada estéril, incubar a 28 °C. Para su observación depositar sobre el

desarrollo fúngico un cubreobjeto y colocar el portaobjeto así preparado en el microscopio óptico.

Método de las diluciones para el recuento de colonias se trabaja de forma similar al método de aislamiento por diluciones sucesivas en agar realizando las diluciones en Solución Fisiológica estéril y luego vertiendo las diluciones obtenidas en placas de Petri estériles a las que a continuación se les agrega el agar fundido y enfriado a 45 – 50 °C, se homogenizan, se dejan solidificar y se incuban a la temperatura adecuada. Esta técnica se realizará en el laboratorio.





(1) Demasiadas colonias (2) Número adecuado de colonias (3) Pocas colonias

Figura 10: Esquema métodos de las diluciones. Figura propia.

Siembra de colonia gigante:

Sembrar con ansa aguja en el centro de botellas utilizadas en los hemocultivos o tubos de ensayos con el medio dispuesto en pico de flauta, también se pueden usar cajas de Petri, que contengan un sustrato de por lo menos 3-4 mm de espesor; en este caso el hongo desarrollará libremente en todas direcciones. Incubar. Son útiles para describir las caracteres macroscópicos de las colonias (diámetro, elevación, aspecto óptico, textura, bordes, color, etc.), haciendo las observaciones a los 3 ó 4 días y luego cada semana, durante un mes.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR:

Con las muestras de hongos suministradas por la Cátedra procederán a trabajar de la siguiente manera:

- Siembra por estrías en caja de Petri y pico de flauta
- Método de diluciones para recuento de colonias (trabajar con hongos levaduriformes),
- Siembra espontánea en algún ambiente cercano al laboratorio (baños, aulas, etc.)
- Preparación y siembra de microcultivo
- Siembra de colonia gigante (trabajar con hongos filamentosos)

Debemos tener la precaución de trabajar correctamente con el ansa y con las pipetas para evitar posibles contaminaciones de los medios de cultivo y de todo el personal presente.

BIBLIOGRAFÍA

- R. Arenas Guzmán (2008). Micología Médica Ilustrada, Tercera Edición. Mc-Graw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., ISBN-13: 978-970-10-6567-9, México, pp. 391
- M. Cuenca Estrella, I. Gadea Gironés, E. Mazuelos, J. Pemán García, J. Pontón, J.

Rodríguez Tudela (2006). Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos en Procedimiento en Microbiología Clínica.

- Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC, (2006). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2a edición. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología.