



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



**Departamento de Parasitología
Facultad de Farmacia**

Guía de Prácticas de MPC- Parasitología Clínica

Grado en Farmacia

Curso 2022-23

Información general sobre las prácticas

- Las prácticas se desarrollarán en periodos de 4 días; el último día se dedicará a la evaluación de las competencias adquiridas por el alumno a través de la realización de un examen práctico.
- El alumno acudirá al laboratorio provisto de **bata y esta guía**.
- Antes del inicio de las prácticas deben repasar sus conocimientos sobre el uso del microscopio, para ello deben visualizar el siguiente tutorial de manejo del microscopio (en inglés, poner subtítulos en español):
<https://www.youtube.com/watch?v=vlwtTLKWYSY>
- Previamente a la realización de cada práctica, el alumno deberá leer con detenimiento la explicación dada en esta guía.

Práctica 1:

1. a. Determinación del tamaño de los parásitos mediante el uso del micrómetro ocular: calibración del microscopio

1. b. Observación de la morfología de los parásitos en preparaciones semipermanentes o permanentes, y determinación de su tamaño mediante el uso del micrómetro ocular previamente calibrado:

- Huevos:
 - *Schistosoma mansoni*
 - *Schistosoma japonicum*
 - *Schistosoma haematobium*
 - *Clonorchis sinensis*
 - *Trichuris trichiura*
 - *Enterobius vermicularis* (método de Graham)
- Larvas:
 - *Strongyloides stercoralis*

1. a. Procedimiento de calibración:

Justificación:

El tamaño es un criterio importante para la identificación de numerosos parásitos, de ahí la necesidad de medirlos. El método más utilizado supone el uso de un micrómetro ocular previamente calibrado.

1. En uno de los oculares del microscopio se habrá intercalado entre sus lentes un *micrómetro ocular*, que es un disco de vidrio que presenta una "especie" de regla con una serie de marcas distribuidas regularmente. Cuando observamos a través de él podemos ver una o dos (según los casos) escalas perpendiculares; cada una de ellas representa una línea dividida en 100 unidades. Al calibrar averiguaremos cuanto mide el espacio entre dos rayitas. La calibración se debe hacer con cada uno de los objetivos del microscopio.

2. Para la calibración del micrómetro ocular se utilizará un *micrómetro de objetivo o de platina*. Se trata de un portaobjetos milimetrado o de calibración que lleva grabado en el cristal una regla o escala de 1 mm (= 1000 μm) dividida en 100 unidades, siendo, por tanto, el valor de cada unidad de 0,01 mm (= 10 μm).

3. Procedemos a enfocar la citada escala del portaobjetos de calibración con el objetivo 10X del microscopio (primero con 4X y después 10X).

4. Se hacen coincidir los ceros de las dos escalas, la del portaobjetos y una del micrómetro ocular. El objeto es determinar un factor de calibración para este objetivo, es decir, lo que mide la distancia entre dos rayitas de la escala del micrómetro ocular cuando el parásito se observa con el objetivo 10X.

5. Se buscan dos rayitas, una de cada escala, que coincidan exactamente (las que estén más alejadas del 0) y se cuenta el número de espacios contenidos desde el 0 hasta ese nivel de coincidencia. En la escala del micrómetro (lo llamaremos X) y en la escala del portaobjetos (lo llamaremos Y).

En estas circunstancias ocurre que:

$$X \times fc = Y \times 10, \text{ donde}$$

X= número de divisiones de la escala del micrómetro ocular, **Y** el número de divisiones de la escala del portaobjetos, **10** lo que mide el espacio entre dos rayitas del portaobjetos y **fc** lo que mide el espacio entre dos rayitas del micrómetro ocular que es lo que queremos averiguar.

$(Y/X) \times 10 \mu\text{m}$ = medida entre dos líneas de la escala del micrómetro ocular, es decir, lo que mide una división del micrómetro ocular con el objetivo utilizado. A este valor se le denomina "factor de calibración" del objetivo.

Se anotará esta medida.

6. Calibrar el micrómetro ocular con el objetivo 40X. Enfocar la escala del portaobjetos con el objetivo 40X y proceder como se ha explicado anteriormente. Anotar el factor de calibración correspondiente a este objetivo.

1. b. La morfología de los parásitos se podrá consultar en la siguiente dirección de Internet, donde encontraremos una colección de imágenes de parásitos de los Centros para la prevención y control de las enfermedades (CDC) de Atlanta

✉ <https://www.cdc.gov/dpdx/az.html>

Procedimiento para la medida de los parásitos:

1. Enfocar el parásito con el objetivo 10X o 40X en función de su tamaño
2. Colocar la escala del micrómetro de ocular sobre el parásito y contar el número de divisiones que abarca, tanto a lo ancho como a lo largo.
Multiplicar el número de divisiones por el *factor de calibración* para el objetivo usado.
3. Expresar la medida del parásito en μm indicando su longitud y anchura.

Práctica 2:

2. a. Técnicas en coprología parasitaria: Técnicas de concentración de parásitos por métodos físicos (**flotación**) y difásicos o fisicoquímicos (**centrifugación** de Telemann modificada). Se usarán dos muestras de heces, una con huevos de *Taenia* sp. y otra con huevos de *Toxocara canis*

2. b. Observación de preparaciones teñidas:

Parásitos sanguíneos, tisulares y de cavidades: observación de preparaciones permanentes previamente teñidas con Giemsa

- *Trypanosoma cruzi*, tripomastigotes sanguíneos (sangre)
- *Trypanosoma brucei*, tripomastigotes sanguíneos (sangre)
- *Dirofilaria immitis* larvas microfilarias (sangre)
- *Trichomonas vaginalis* (otros)

Justificación del uso de técnicas de concentración:

El número de parásitos que se eliminan a través de las heces suele ser pequeño lo que limita su detección mediante el uso del microscopio. Con las técnicas de concentración conseguimos la reunión en un pequeño volumen de los elementos parasitarios inicialmente dispersos en una gran masa de heces. Existen numerosos métodos aunque ninguno evidencia todos los tipos de parásitos, por ello usaremos dos con propiedades complementarias. Se pueden realizar con materia fecal fresca o fijada (no con PVA); en nuestro caso usaremos heces fijadas con formol 5 %.

Procedimiento 1: Concentración con la técnica de flotación de Willis

1. Las heces de nuestro paciente están fijadas con formol 5 % y ya han sido filtradas a través de gasa para eliminar los restos groseros.
2. Poner 1 ml de las heces filtradas en un tubo de ensayo. A continuación, agregar con una pipeta solución saturada de ClNa (se reconoce que está saturada porque

hay un depósito de sal; agitar antes de usar) hasta llenar el tubo; se debe formar un menisco convexo en la superficie.

3. Colocar un portaobjetos desengrasado sobre el tubo, en contacto con el menisco.
4. A los 20-25 min retirar el portaobjetos dándole la vuelta con movimiento rápido, poner un cubreobjetos y observar al microscopio (las burbujas que seguramente se habrán formado nos ayudarán en el proceso de enfoque).
5. Observar al microscopio haciendo un barrido de la preparación para estudiarla en toda su superficie, primero con el objetivo 10X y después con 40X si el resultado con 10X es negativo.

Procedimiento 2: Concentración por método difásico (Telemann modificado)

Con este método, conocido comúnmente como "método de concentración del formol/acetato de etilo", las heces se mezclan con dos soluciones no miscibles (solución acuosa de formol y un disolvente de lípidos, normalmente acetato de etilo).

1. Las heces de nuestro paciente están fijadas con formol 5 % y ya han sido filtradas a través de doble gasa.
2. Depositar 1 ml de las heces filtradas en un tubo de centrífuga.
3. Añadir 1 ml de acetato de etilo, tapar con un tapón de caucho y mezclar vigorosamente de 30 s a 1 min, destapando el tubo uno o dos veces para facilitar la salida de gases.
4. Equilibrado de los tubos de centrífuga. En una balanza de doble brazo disponer de un lado el tubo con las heces y del otro un tubo vacío; agregar agua al tubo vacío hasta conseguir que ambos tubos pesen igual.
5. Centrifugar durante 5 min a 3000 rpm colocando un tubo enfrente del otro en la centrífuga.

6. Tras la centrifugación observaremos en el tubo 2 fases, una superior orgánica formada por el disolvente de lípidos (acetato de etilo) y otra inferior acuosa. Entre ambas habrá un anillo de suciedad que podría ser necesario despegar de las paredes usando una pipeta Pasteur. En el sedimento del fondo del tubo se encuentran los parásitos.

7. Decantar, es decir, volcar sobre un vaso de precipitado el contenido del tubo con movimiento seguro. Colocar el tubo en una gradilla y dejar que el líquido restante de los lados del tubo escurra hasta el sedimento. Mezclar bien con una pipeta Pasteur.

8. Colocar dos gotas separadas sobre un portaobjetos, agregar sobre una de ellas una gota de Lugol. Cubrir ambas con cubreobjetos y sellar. La preparación debe ser lo suficientemente clara para que pudiéramos leer la letra pequeña de un texto colocado debajo.

9. Observar al microscopio haciendo un barrido de las preparaciones para estudiarlas en toda su superficie, primero con el objetivo 10X y después con 40X si el resultado con 10X es negativo.

Práctica 3

3. a. Reconocimiento de artefactos encontrados en las heces y otros productos de la digestión.

Justificación: los artefactos se pueden confundir con parásitos por lo que es importante que el alumno se familiarice con ellos para que no diagnostique un falso parasitismo.

Se realizará la observación de fibras vegetales, células amiláceas, vasos conductores, granos de polen, levaduras, fibras musculares y cristales.

Las **células amiláceas** pueden aparecer más o menos digeridas. Contienen granos de almidón que con lugol (solución de yodo) toman un color que va del negro al azul, pasando por los violetas. A veces la cubierta se rompe y se pueden ver los granos de almidón sueltos. Cuando hay células con almidón o gránulos aislados sin digerir (colores oscuros) indica un tránsito acelerado del alimento por el colon, cuya causa, entre otras, podría ser un proceso diarreico infeccioso.

El alumno observará también **fibras musculares** y aprenderá a diferenciar las digeridas (redondeadas) de las no digeridas (extremos rectos y superficie estriada). La cantidad de fibras musculares en heces no es importante pues dependerá de la ingesta del paciente, en cambio, la existencia de una gran proporción de fibras musculares poco o nada digeridas, podría ser indicativa de la presencia de parásitos.

Se observarán los **cristales de Charcot-Leyden**. Proceden de la degradación de eosinófilos y suelen indicar la presencia de parásitos; tienen forma de palillo de dientes plano.

3. b. Preparación y observación de preparaciones teñidas con lugol (extemporáneas y semipermanentes): Análisis de muestras biológicas (heces) procedentes de pacientes mediante examen directo

3. b. 1. Observación de muestras de heces de pacientes parasitados

- *Entamoeba coli*, quiste
- *Giardia lamblia*, quiste

3. b. 2. Análisis de una muestra de heces de un paciente poliparasitado

Procedimiento: Las heces se proporcionan fijadas en formol 5 % y filtradas a través de una gasa. Colocar dos gotas separadas sobre un portaobjetos, agregar sobre una de ellas una gota de Lugol. Cubrir ambas con cubreobjetos y sellar. La preparación debe ser lo suficientemente clara para que pudiéramos leer la letra pequeña de un texto colocado debajo. Observar al microscopio haciendo un barrido de las preparaciones para estudiarlas en toda su superficie, primero con el objetivo 10X y después con 40X si el resultado con 10X es negativo. Buscar e identificar los parásitos existentes en la muestra.

3. c. Observación de artrópodos parásitos

Se proporcionará al alumno las siguientes preparaciones para su enfoque y observación de morfología general

- Insectos:
 - *Pediculus humanus*, adultos
 - *Phthirus pubis*, adultos
 - Moscas productoras de miasis, larvas (observación de espiráculos respiratorios posteriores)
- Ácaros:
 - *Sarcoptes scabiei*, adultos
 - *Demodex folliculorum*, adultos

N. B. Para todos los apartados en los que se contempla la observación morfológica de parásitos, téngase en cuenta lo apuntado en el apartado 1.b. de la página 5.

Cuarto día: examen práctico

1. El alumno recibirá **una muestra biológica** (heces fijadas en formol 5% y filtradas a través de gasa). Deberá aplicar la **técnica diagnóstica de concentración** que se le solicite, informando adecuadamente del resultado del análisis y haciendo una descripción del procedimiento seguido.

2. El alumno recibirá **2 preparaciones** listas para su observación al microscopio, debiendo realizar una búsqueda exhaustiva en las mismas hasta encontrar formas parásitas que deberá identificar y medir adecuadamente, explicando el procedimiento seguido para la determinación del tamaño de los parásitos.