



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Preparación de materiales de prácticas para la asignatura de Parasitología

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Diciembre 2015

Autor: Jose Luis Mojica Aracil
Modalidad: Experimental
Tutor/es: Luis Navarro Martínez
Fernando J. Bornay Llinares

Agradecimientos.

En primer lugar agradecer a los doctores Fernando Jorge Bornay Llinares y Luis Navarro Martínez por brindarme la oportunidad de realizar este Trabajo de Fin de Grado con ellos y por su paciencia durante el transcurso del mismo conmigo.

En segundo lugar, agradecer al Doctor Pere Berbel Navarro y a Manuel J Giner por su enorme amabilidad y generosidad al permitirnos utilizar su Microscopio Olympus BX41 y la Cámara ProRes™ C12plus para captar las fotografías de los organismos.

Por último, agradecer a mi familia su apoyo y cariño incondicional a lo largo de estos 5 años de carrera que finalizan con este Trabajo de Fin de Grado.



Resumen.

Objetivos: La identificación de las estructuras parasitarias se basa fundamentalmente, en criterios morfológicos. Para ello, se han elaborado herramientas adecuadas que permitan implantar un sistema de educación proactiva como método de enseñanza para facilitar el aprendizaje del alumno en las prácticas de la asignatura de Parasitología (2º curso del Grado en Farmacia).

Material y método: Se realizaron montajes permanentes en portaobjetos conteniendo: a) huevos de helmintos incluidos en glicerogelatina, b) quistes de protozoos fijados con EUKITT®. También se realizó la Tinción de Weathley en protozoos. Y c) artrópodos de menor tamaño, fueron clarificados y también montados con EUKITT®. Artrópodos de mayor tamaño fueron montados en placas Petri y fijados a la misma mediante una mezcla de EUKITT® y xilol. También se creó una colección audiovisual de fichas, imágenes y videos sobre los organismos.

Resultados: Se montaron satisfactoriamente portaobjetos con 60 muestras conteniendo huevos de helmintos, 8 con quistes de protozoos, 7 de adultos de artrópodos clarificados y 8 placas Petri con artrópodos de gran tamaño. Se realizaron 71 tomas fotográficas, se confeccionaron 18 fichas de trabajo y fueron grabados 13 vídeos explicativos cortos. No se obtuvo ninguna muestra que hubiera sido teñida satisfactoriamente.

Conclusiones: Conocer la morfología de las estructuras parasitarias es un requisito indispensable para poder realizar su diagnóstico. Se ha preparado el material necesario para favorecer un sistema de educación proactiva que mejore el aprendizaje y la autonomía del alumno. Serán necesarios futuros trabajos que amplíen y completen el espectro parasitario objeto de estudio, a fin de perfeccionar el sistema de educación proactiva propuesto.

Índice de contenidos.

1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.1.1. ¿Qué es la Parasitología?.....	1
1.1.2. Tipos de parásitos y grupos.....	1
1.1.3. Enteroparásitos.....	3
1.1.4. Artrópodos.....	4
1.1.5. La educación proactiva como modelo de aprendizaje.....	5
2. Justificación y objetivos.....	7
2.1. Justificación.....	7
2.2. Objetivos.....	7
2.2.1. Objetivo general.....	7
2.2.2. Objetivos específicos.....	7
3. Material y métodos.....	8
3.1. Selección de muestras fecales conteniendo helmintos y protozoos.....	8
3.1.1. Montaje de huevos de helmintos.....	8
3.1.2. Montaje de protozoos.....	8
3.2. Montaje de artrópodos.....	9
3.3. Material audiovisual.....	9
3.3.1. Captura de imágenes.....	9
3.3.2. Vídeos al microscopio.....	10
3.3.3. Fichas explicativas.....	10
4. Resultados.....	11
4.1. Resultados en helmintos.....	11
4.2. Resultados en protozoos.....	11
4.3. Resultados en artrópodos.....	11
4.4. Resultados del material audiovisual.....	11
5. Discusión.....	13
6. Conclusiones.....	15
Anexo I. Protocolos.....	16
1. Protocolo para realizar la técnica de Ritchie modificada.....	16
2. Glicerogelatina para el montaje de huevos de helmintos.....	16
3. Tinción de Weathley: material y procedimiento.....	17
4. Clarificación de artrópodos.....	18
Anexo II. Modelo de fichas explicativas.....	20
Ficha 1. <i>Entamoeba coli</i>	20

Ficha 2. <i>Ascaris lumbricoides</i>	22
Ficha 3. <i>Hymenolepis nana</i>	24
Ficha 4. Subfamilia Triatomidae.	26
Bibliografía.	27



1. Introducción.

1.1. Antecedentes

1.1.1. ¿Qué es la Parasitología?

La parasitología es la rama de la biología que estudia el fenómeno de parasitismo.

Parasitismo se define clásicamente como una de las relaciones interespecíficas antagónica de dos seres de distinta especie, en equilibrio inestable y dinámico, en el cual, el más pequeño o primitivo biológicamente (parásito), vive de modo temporal o permanente sobre o dentro del más organizado (hospedador), alimentándose a sus expensas, sin proporcionarle beneficio alguno, antes bien, causándole algún menoscabo o daño, potencial o actualmente¹. Una característica clave para definir el parasitismo es el carácter obligatorio de esta relación para el parásito, incapaz de cumplir su ciclo biológico en ausencia de alguno de sus hospedadores².

La parasitología estudia, por un lado, la morfología, biología, los ciclos biológicos de los parásitos y sus relaciones con el hospedador. Por otro lado, también estudia las parasitosis o enfermedades parasitarias, que causan en el hombre y en los animales.

Los parásitos de interés sanitario por afectar al ser humano, que se estudian en la asignatura de Parasitología, son organismos eucariotas diferenciados en tres grandes grupos: protozoos, helmintos, y artrópodos. Sin embargo, los virus y determinadas bacterias también podrían incluirse en la definición de parásito, pero se encarga de estudiarlos la Microbiología.

1.1.2. Tipos de parásitos y grupos.

Atendiendo al microhábitat del parásito en el hospedador humano, se diferencian en ectoparásitos y endoparásitos. Los ectoparásitos son aquellos que viven en el exterior del hospedador, bien sea sobre la piel o invadiendo sus capas más externas, como garrapatas, pulgas o piojos. Por otro lado, los endoparásitos son aquellos que se encuentran en el interior del hospedador pudiendo afectar a varios órganos y tejidos. Dentro de este último grupo

encontramos enteroparásitos, hemoparásitos, parásitos tisulares y parásitos erráticos (cuando aparece en un órgano o tejido que no es el habitual)^{3,4}.

Atendiendo a los grupos taxonómicos de los parásitos, encontramos: Protozoos, helmintos y artrópodos parásitos humanos.

Los Protozoos, pertenecientes al Reino Protista, son organismos microscópicos unicelulares eucariotas con representantes de varios phylum. El phylum Sarcomastigophora se basa en la presencia de flagelos (subphylum Sarcodina) o pseudópodos (subphylum Mastigophora) como medio de locomoción. Los individuos del phylum Ciliophora son ciliados y poseen dos núcleos: macro y micronúcleo. El phylum Apicomplexa comprende parásitos intracelulares con un complejo apical que permite invadir la célula hospedadora. En este phylum encontramos la subclase Coccidia, que parasitan las células del epitelio intestinal, y la clase Aconoidasida, parásitos de eritrocitos sanguíneos. Finalmente, los representantes del phylum Microsporidia, son pequeños parásitos capaces de invadir la célula hospedadora gracias a la presencia de un tubo polar^{5,6}. Dentro de cada grupo, existen diferencias entre sus estructuras (quistes, ooquistes o esporas), como pueden ser su tamaño, forma, presencia de vacuolas, flagelos y núcleos, la cantidad de los mismos, etc.

Por otro lado se encuentran los Helmintos, que son especies animales de cuerpo largo y vermiforme. Hay tres grupos de helmintos divididos en dos phylum: phylum Nematelminthes, que son de cuerpo cilíndrico, y el phylum Platyhelminthes, que son de cuerpo plano. Dentro de los platelmintos encontramos dos grupos: la clase Cestoda son gusanos planos y segmentados sin aparato digestivo, mientras que la clase Trematoda son gusanos planos no segmentados con ventosas como órganos adhesivos^{5, 7}. En heces es habitual encontrar sus huevos, cuyas diferencias morfológicas están muy definidas y bien descritas, constituyendo la clave para su diagnóstico.

En cuanto a los artrópodos, la mayoría son ectoparásitos, es decir, están situados en el exterior del hospedador como piojos o garrapatas. Varios de sus representantes son más importantes por actuar como vectores de otras enfermedades infecciosas, capaces de transmitir determinados virus, bacterias,

hongos, protozoos y helmintos, que por su propia acción directa como ectoparásitos. Taxonómicamente hablando, las dos principales clases de artrópodos de interés sanitario son: la Clase Arachnida que se caracteriza por tener un cuerpo dividido en gnathostoma e idiosoma, cuatro pares de patas en la fase adulta, presencia de quelíceros y carencia de alas⁸, y la Clase Insecta, con el cuerpo dividido en cabeza, tórax y abdomen, tres pares de patas, dos pares de antenas y la ausencia o presencia de hasta dos pares de alas, como en la Familia Reduviidae (Triatomíneos) del Orden Hemiptera, o en la Familia Culicidae del Orden Diptera⁹.

Los enteroparásitos, junto con los artrópodos, son los protagonistas de este trabajo de laboratorio.

1.1.3. Enteroparásitos.

Los enteroparásitos son endoparásitos que tienen como microhábitat al tubo digestivo.

Son especies que al adaptarse a la vida parasitaria adquirieron exigencias cada vez más estrictas. Las condiciones de pH, tensión superficial, potencial de óxido-reducción y las concentraciones de O² y CO² son los principales factores que determinan el lugar específico del tubo digestivo donde van a permanecer los parásitos¹⁰.

La mayoría de las especies habitan entre el duodeno y el recto. Este hecho, lejos de ser fortuito, se debe a que es un medio muy rico en nutrientes procedentes del bolo alimenticio que está siendo digerido y de la presencia de flora bacteriana que sirve de fuente alimenticia para algunos protozoos. Además, las lipasas pancreáticas y esteroides biliares ocasionan el desenquistamiento de los protozoos y la eclosión de los huevos de helmintos. Estas lipasas pancreáticas de las distintas especies son las responsables de que un parásito pueda parasitar al hospedador. Por ejemplo, las lipasas que posee un perro no van a provocar la eclosión de los huevos o desenquistamiento de los mismos parásitos que las del ser humano^{4,10}.

Una vez rotas las formas de resistencia del parásito, el número de parásitos en la luz intestinal aumenta ya que las microvellosidades y criptas de

la pared intestinal y las secreciones mucosas favorecen la fijación y desarrollo de los mismos.

1.1.4. Artrópodos.

Como ya se ha dicho anteriormente, dentro de los artrópodos parásitos, la función como vectores de otras afecciones puede ser mucho más importante, en cuanto al daño causado al humano, que la propia acción perniciosa del parásito. Por ejemplo, la picadura per se de un mosquito anopheles no es muy dañina, sin embargo sí lo es el hecho de que, con esa picadura, el mosquito nos transmita un plasmodio, parásito responsable de la malaria.

Así pues, los vectores son animales invertebrados que transmiten un agente infeccioso al hospedador, bien mediante picadura o mediante contaminación de una mucosa o superficie con material infectante¹⁰. Los vectores pueden ser de dos tipos: mecánicos o biológicos.

Los vectores mecánicos son aquellos en los que la transmisión del patógeno es debida al azar, sin existir una asociación específica patógeno-vector. Durante la estancia en el vector, el parásito no evoluciona, de modo que no le es esencial para completar su ciclo biológico, ni es su principal vía de transmisión¹¹.

El vector biológico, en cambio, es aquel en el que la transmisión del patógeno es muy específica, y existe una asociación patógeno-vector. A diferencia de los mecánicos, en el interior de los vectores biológicos se produce una evolución y/o multiplicación del parásito, resultado indispensable para que complete su ciclo biológico y sirviendo de principal vía de transmisión¹¹.

De nuevo, los vectores biológicos se subdividen en dos grupos. El primero de ellos lo forman los vectores biológicos multiplicativos, en los que el agente patógeno se multiplica en número sin variar su estado evolutivo. El segundo de ellos está constituido por los vectores biológicos cíclicos, en los que se da lugar un cambio evolutivo del parásito para alcanzar su forma metacíclica, infectiva para el humano. Esta evolución puede ser seguida o no de una multiplicación

en el número de estructuras, distinguiendo vectores biológicos cíclico-multiplicativos y cíclico-evolutivos, respectivamente¹¹.

Las características que convierten a un artrópodo en vector son: ser antropófilo, alimentarse de los hospedadores del parásito, poder infectarse con la misma especie de parásito que infecta al hospedador, soportar el crecimiento del parásito sin que le cause un daño que impida su transmisión, y ser capaz de transmitir el parásito al hospedador.

1.1.5. La educación proactiva como modelo de aprendizaje.

La principal dificultad en el diagnóstico de parásitos es la gran diversidad de organismos y diferencias entre ellos. Por ello, se ha de seleccionar el mejor método de enseñanza posible para los alumnos.

Debido a que los organismos se clasifican en taxones atendiendo principalmente a su morfología, cabe suponer que ésta es la principal herramienta usada para el diagnóstico de muestras en un laboratorio clínico.

La educación proactiva se asienta sobre la elección de un sistema de enseñanza que asegure el desarrollo de las potencialidades de quien las reciba, tomando en consideración sus necesidades y generándole una verdadera autonomía¹².

Se entiende como proactividad a la actitud personal que impulsa a tomar decisiones e iniciativas, así como a responsabilizar a la persona de sus resultados. Se trata de decidir en cada momento qué se quiere y cómo se va a hacer.

En este sistema entran en juego otros conceptos como la educación por pares, aprendizaje cooperativo¹³ y autoaprendizaje. Sumando estos tres términos, se pretende la formación de grupos de alumnos similares, de modo que, mediante la dotación del material necesario, los alumnos sean capaces de aprender de manera autónoma, resolviendo las dudas mediante la reflexión, y ayudándose los unos a los otros, de modo que el alumno que tenga más conocimientos se los transmita al resto. Spencer Kagan así lo define: “La suma de las partes interactuando es mayor que la suma de las partes solas”¹⁴.

Así, una actitud proactiva por parte del alumno en las aulas, se centra en el pasado y en los hechos únicamente como punto de partida para diagnosticar y analizar un hecho. Lo fundamental es proponerse que el alumno reflexione, repare, rectifique y aprenda de sus errores para mejorar en el futuro. El alumno debe interiorizar la necesidad de responsabilizarse de los actos y, por tanto, de progresar en el desarrollo personal.



2. Justificación y objetivos.

2.1. Justificación.

Las enfermedades parasitarias están extendidas mayoritariamente en África, el sur de Asia, América central y Sudamérica, infectando a más de un tercio de la población mundial (alrededor de dos mil millones de personas), entre los que los niños son los principales damnificados. Sólo en el año 2013 fueron diagnosticados 198 millones de casos nuevos de malaria¹⁵.

En muchos casos conseguir estructuras parásitas para la docencia es una labor compleja, ya que no existen preparaciones comerciales de todos los organismos, o estas están realizadas con técnicas que no se corresponden con la realidad del trabajo en diagnóstico clínico de un laboratorio hospitalario. Para acercarse más a la realidad, es necesario recurrir a muestras clínicas reales y, utilizando las mismas técnicas que en el laboratorio, preparar muestras con las cuales realizar preparaciones permanentes, que puedan ser utilizadas, tanto para la docencia a estudiantes, como controles positivos que sirvan de confirmación/recordatorio para el investigador y técnico de laboratorio.

2.2. Objetivos.

2.2.1. Objetivo general.

Preparar las herramientas didácticas necesarias para favorecer un sistema de educación proactiva para las prácticas de la asignatura de Parasitología, obligatoria de 2º curso del Grado en Farmacia.

2.2.2. Objetivos específicos.

- Elaborar una colección de preparaciones permanentes de parásitos seleccionados a partir de muestras clínicas almacenadas en el Área de Parasitología de la Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Crear material audiovisual complementario que sirva de ayuda para el aprendizaje constituido por fichas informativas, imágenes y videos sobre los parásitos diagnosticados y seleccionados.

3. Material y métodos.

3.1. Selección de muestras fecales conteniendo helmintos y protozoos.

Para la preparación de todas las muestras de helmintos y protozoos en primer lugar se realizó una búsqueda activa de estructuras parásitas utilizando la colección de muestras fecales del Área de Parasitología. Se usaron métodos de concentración como la técnica de Ritchie modificada y se tiñeron con lugol¹⁶ (tinción temporal) para ayudar a su identificación. Se seleccionaron aquellas que fueran las más adecuadas para su utilización en el autoaprendizaje del alumno.

3.1.1. Montaje de huevos de helmintos.

Una vez seleccionadas las muestras, se procedió a su montaje con glicerogelatina. Para ello, se mezclaron 15µl de glicerogelatina, previamente preparada (ver Anexo I) y fundida al baño maría, con otros 15µl de muestra sobre un portaobjetos. A continuación se depositó el cubreobjetos con cuidado de no formar burbujas. Se dejó solidificar la glicerogelatina, se eliminó el exceso con una cuchilla y se aplicó una fina película de laca de uñas sobre los bordes del cubreobjetos para mejorar la conservación de la muestra.

3.1.2. Montaje de protozoos.

Se realizaron dos muestras distintas.

Por un lado, con las muestras que estaban conservadas con la solución MIF (Metiolato-Iodo-Formol), que colorea las estructuras presentes en la muestra, se realizaron frotis de 30µl de muestra y se dejaron secar completamente durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación, se cubrió la muestra seca con una mezcla de EUKITT® (O. Kindler GmbH & Co. Alemania), el cual contiene 45% de resina acrílica y 55% de xilenos, y xilol, seguido de la cuidadosa colocación del cubreobjetos, y se dejó solidificar.

Con las muestras preservadas en formol tamponado al 4%, se realizaron montajes de muestras teñidas con la Tinción tricrómica de Weathley^{17,18} para protozoos (ver Anexo I).

3.2. Montaje de artrópodos.

Los artrópodos ectoparásitos suelen ser organismos de pequeño tamaño que precisan del uso de lupa para poder verlos correctamente. Sin embargo, debido a que su cuerpo quitinoso es muy denso, la luz transmitida no es capaz de pasar a través de ellos y la observación de sus estructuras con luz incidente es difícil. Por ello, los individuos deben ser clarificados, de forma que sus escleritos reduzcan su grosor y permitan el paso de la luz para poder visualizar correctamente su anatomía. Para realizar esta clarificación se utilizó una solución de hidróxido potásico (KOH) al 10% o 40% (p/v) dependiendo de si eran de menor o mayor tamaño, respectivamente. A continuación se deshidrataron en soluciones de etanol al 70%, 85%, 95% y etanol absoluto. Una vez clarificados y deshidratados se montaron en portaobjetos utilizando EUKITT® como medio de montaje.

Un caso especial de artrópodos fue la Familia Reduviidae (Triatomíneos) que, debido a su excesivo tamaño y que la parte del cuerpo importante para el diagnóstico es la cabeza, en lugar de ser clarificados, se prepararon ocho montajes de individuos fijados a placas petri con EUKITT®. Dos placas con un individuo de cada uno de los géneros: *Rhodnius sp.*, *Triatoma sp.* y *Pastrongylus sp.*; y en otras dos placas petri, más grandes que las anteriores, se montaron tres individuos, uno de cada género, con las cabezas enfrentadas.

3.3. Material audiovisual.

3.3.1. Captura de imágenes.

Con objeto de visualizar los enteroparásitos con mayor detalle se tomaron microfotografías con un Microscopio Olympus BX41 y una Cámara ProRes™ C12plus, en el laboratorio del Doctor Pere Berbel Navarro y con la inestimable ayuda de D. Manuel J Giner, del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Además de estas imágenes de alta resolución, se tomaron fotos al microscopio óptico mediante un teléfono Samsung Galaxy S3 de algunas muestras de enteroparásitos para ofrecer una vista más real de las situaciones

que pueden presentarse al observar una muestra en el laboratorio de análisis clínicos.

3.3.2. Vídeos al microscopio.

Con la misma técnica utilizada para realizar las fotos con el móvil se realizaron vídeos cortos donde se muestran quistes de protozoos y huevos de helmintos. El vídeo permite realizar tomas con varios puntos de enfoque, con lo que podemos observar mejor las estructuras en todos sus distintos campos. De este modo se ven mejor las estructuras, al poder enfocar sus distintas partes. Estos vídeos se acompañan de un texto explicativo sobre sus principales características morfológicas.

3.3.3. Fichas explicativas.

Como apoyo didáctico y de diagnóstico, se realizaron 15 fichas explicativas, una para cada organismo montado, que reunieran los aspectos principales del individuo utilizando los datos de la web de la dpdx¹⁹ (división of parasitic diseases), perteneciente al CDC (Center for Diseases Control and Prevention), centro de referencia de EEUU para al diagnóstico de parásitos. El esquema general que siguen las fichas consta de: descripción, ciclo vital del parásito y claves diagnósticas con imágenes correspondientes a las fotos tomadas mencionadas en el apartado anterior. Exclusivamente en las fichas de helmintos se incluyó un apartado sobre los individuos adultos, y en las fichas correspondientes a familias (como los Triatominos), se incluyó un apartado que contiene las principales diferencias entre las distintas especies de dicha familia.

4. Resultados.

4.1. Resultados en helmintos.

Respecto a los montajes de huevos de helmintos en glicerogelatina, se prepararon: 9 portaobjetos de *Ascaris lumbricoides*, 10 de *Taenia spp*, 10 de *Hymenolepis nana*, 5 de *Schistosoma mansoni*, 6 de *Diphyllobothrium latum*, 11 de *Fasciola hepatica* y 9 con coinfección por *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*.

4.2. Resultados en protozoos.

Las muestras que se sometieron a la Tinción de Weathley no reflejaron los resultados esperados, siendo inservibles para los objetivos propuestos. En cambio, se montaron adecuadamente 4 portaobjetos con quistes de *Entamoeba coli* y otros 4 con coinfección por *Entamoeba coli* y *Giardia duodenalis* procedentes de muestras conservadas con MIF.

4.3. Resultados en artrópodos.

Los artrópodos que fueron clarificados y montados en portaobjetos con EUKITT® y xilol fueron: 3 hembras de *Anopheles sp*, 2 garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, y 2 ejemplares de *Pediculus capitis*. Además también se realizaron los montajes de Triatominos ya descritos anteriormente.

4.4. Resultados del material audiovisual.

Se tomaron un total de 71 fotografías, de las cuales 53 fueron mediante el Microscopio Olympus BX41 y la Cámara ProRes™ C12plus, y 18 mediante el teléfono móvil. Aunque no se utilizaron todas ellas en las fichas explicativas, se han guardado en la galería de imágenes de la asignatura para su posible utilización en las clases de teoría.

Por lo que respecta a las fichas, se realizaron un total de 18, de las cuales 8 pertenecen a los helmintos *Ascaris lumbricoides*, *Diphyllobothrium latum*, *Enterobius vermicularis*, *Fasciola hepática*, *Hymenolepis nana*, *Schistosoma mansoni*, *Taenia spp* y *Trichuris trichiura*. Otras 4 se corresponden con los protozoos *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*,

Giardia duodenalis y *Iodamoeba bütschlii*. Las 6 fichas restantes tratan las Familias de artrópodos Cimicidae, Culicidae, Ixodidae, Pulicidae, Subfamilia Flebotominae y Subfamilia Triatomidae. Todas las fichas se encuentran subidas a Internet tanto en el portal de Google Drive²⁰ como en la página web de la asignatura de Parasitología²¹.

Finalmente, se prepararon un total de 10 videos sobre los siguientes organismos: *Ascaris lumbricoides*, *Diphyllobothrium latum*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*, *Fasciola hepatica*, *Giardia duodenalis*, *Hymenolepis nana*, *Schistosoma mansoni*, *Taenia spp* y *Trichuris trichiura*, además de otros 3 videos con coinfecciones por: *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*, *Entamoeba coli* y *Trichuris trichiura*, y uno último con *Ascaris lumbricoides*, *Entamoeba coli*, y *Trichuris trichiura*. Todos ellos se encuentran disponibles en el portal de vídeos Youtube²² así como en la página web de la asignatura²¹.



Figura 1. Set de preparaciones para prácticas de Parasitología (tanto protozoos, como helmintos y artrópodos), la reetiquetada colección de muestras del Área de Parasitología, y el repertorio de fichas elaboradas.

5. Discusión.

El material obtenido como resultado de este trabajo fue más que satisfactorio, tanto de helmintos y protozoos enteroparásitos como de artrópodos.

Han sido conseguidas muestras que reflejan fidedignamente casos reales, diagnosticados habitualmente en un laboratorio de análisis clínicos, como puede ser una muestra de heces con un solo huevo de *Fasciola hepática*, o muestras con alta carga parasitaria de *Entamoeba coli* o *Giardia intestinalis*.

En cuanto a los artrópodos, en aquellas especies que fueron clarificadas, se han obtenido muestras de buena calidad para su uso en el aula, si bien algunas de ellas se clarificaron en exceso debido a que no teníamos bien definidos los tiempos de clarificación mediante KOH, que fluctúa no solo entre distintas especies, sino entre individuos en diferente estadio de desarrollo dentro de la misma especie.

El material audiovisual, además de servir como apoyo al estudiante, también se pretende usar para realizar exámenes, controles y/o autoevaluaciones durante las prácticas. De este modo se conseguiría una mayor atención e implicación por parte del estudiante.

En primera instancia se puede afirmar que el material necesario para favorecer la implantación de un sistema de educación proactiva ha sido elaborado satisfactoriamente. Sin embargo, se trata de un proyecto a largo plazo, en el que se irán fijando nuevos objetivos como constituir una web de navegación totalmente completa y de acceso libre a los estudiantes y docentes, ya sean miembros de la Universidad Miguel Hernández de Elche o no.

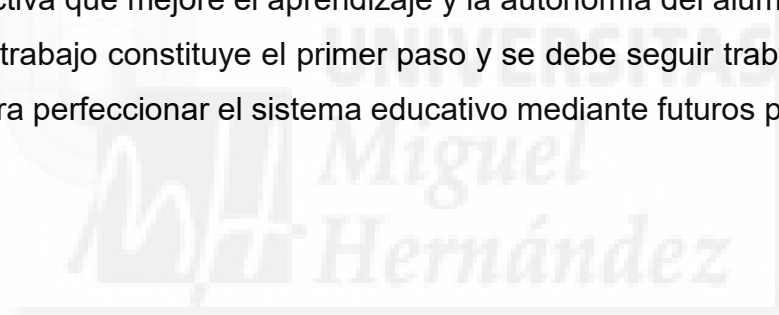
El único resultado negativo fue que se obtuvieron malos resultados en los montajes de protozoos con la Tinción de Weathley. Era un hecho esperado, debido a que esta tinción funciona mejor con muestras frescas o conservadas en otras soluciones fijadoras, como el alcohol polivinílico (PVA). Las muestras disponibles en el área de Parasitología, estaban almacenadas durante varios años en formol tamponado al 4% o SAF (acetato de sodio-ácido acético-fomalina), no indicadas para la tinción tricrómica.

Por todo ello, serán necesarios futuros estudios y o trabajos para perfeccionar el sistema y medir su eficiencia.



6. Conclusiones.

1. El trabajo desarrollado en el laboratorio del área de Parasitología me ha permitido aprender las diferencias morfológicas de las estructuras parasitarias, requisito indispensable para su identificación.
2. Se ha elaborado material de laboratorio que permitirá implantar el sistema de educación proactiva, que permite desarrollar las potencialidades del alumno, tomando en cuenta sus necesidades, y generarle una verdadera autonomía.
3. Ha sido satisfactoriamente elaborado un archivo de preparaciones a partir de la colección de muestras almacenada en el área de Parasitología.
4. Se ha confeccionado el material audiovisual complementario (fichas de trabajo y videos), necesario para impulsar un sistema de educación proactiva que mejore el aprendizaje y la autonomía del alumno.
5. Este trabajo constituye el primer paso y se debe seguir trabajando sobre él para perfeccionar el sistema educativo mediante futuros proyectos.



Anexo I. Protocolos.

1. Protocolo para realizar la técnica de Ritchie modificada.

La técnica de Ritchie LS (1946)²³ permite la concentración de todos los grupos de parásitos habituales en heces. Esta técnica, además, permite una visualización en fresco más clara debido a que se separa la grasa contenida en las heces y se desecha. Para ello, se necesita el siguiente material:

- Tubos de centrifuga de 15ml
- Embudo
- Gasas (no estériles)
- Bastoncillos con torunda
- Formalina 10% (dilución al 10% de formaldehído 3,7-4% en agua)
- Etilacetato
- Centrifuga

Con todo el material disponible, se realiza el siguiente procedimiento:

1. Filtrar a través de una gasa materia fecal hasta obtener 5ml de filtrado.
2. Añadir formalina al 10% hasta alcanzar los 10ml del tubo.
3. Centrifugar a 500rpm durante 10 minutos.
4. Desechar el sobrenadante.
5. Añadir formalina 10% hasta 7ml y resuspender.
6. Añadir 3ml de etilacetato.
7. Agitar vigorosamente en posición invertida durante 30 segundos.
8. Centrifugar a 500rpm durante 10 minutos.
9. Separar la interfase de las paredes del tubo con la ayuda de un bastoncillo, descartar el sobrenadante y limpiar la pared del tubo.
10. Resuspender el sedimento y visualizar al microscopio (examen en fresco)

2. Glicerogelatina para el montaje de huevos de helmintos

La glicerogelatina o gelatina de glicerol, es un medio de montaje hidrófilo que, añadido a una preparación de heces en fresco, permite mantener las estructuras presentes, principalmente huevos de helmintos, en un medio solidificado durante largos periodos de tiempo, facilitando así su observación a

lo largo de varios meses o años²⁴. Para realizar este medio de montaje se necesita el siguiente material:

Gelatina en grano	7gr.
Formalina 10%	42 ml
Glicerina	50 ml
Dieldrin	4 gotas (o 2 ml ácido sódico)

- Se pesan 7g de gelatina en grano y se añade la formalina 10%, dejando que se humedezca durante unas horas (overnight)
- Calentar al baño maría hasta que se licue (unos 50°C, NO HERVIR)
- Añadir la glicerina y el dieldrin agitar para obtener una mezcla homogénea.
- Mantener en un recipiente ocre (oscuridad). Calentar para utilizar.

(NOTA: con cada recalentamiento va perdiendo eficacia)

3. Tinción de Weathley: material y procedimiento.

Se realiza siguiendo el protocolo de Wheatley W. (1951)¹⁷ (revisado en De Carli y col. 2001)¹⁸.

Mediante la Tinción de Weathley, el colorante Tricrómico tiñe de forma diferencial núcleos, citoplasmas y otras estructuras celulares, lo cual resulta muy útil en la identificación de especies.

Se deben preparar los siguientes reactivos necesarios para realizar la tinción:

- Colorante TRICRÓMICO (para 500ml): Preparación: 3g de Cromotropo 2R + 1,5g de Verde Luz SF + 3,5g de Ácido fosfotúngstico. Se mezcla en seco y se añade 5ml de Ácido Acético glacial. Mezclar y dejar reposar 30 minutos. Añadir 1000ml de Agua destilada. Guardar en un frasco tapado o resguardar de la luz.
- Alcohol Yodado (para 40ml): Preparación: Añadir unos pocos cristales de Yodo a 40ml de Etanol 70%. Debe agitarse la mezcla y añadir más yodo, en caso de ser necesario, hasta que la solución tenga el color "té fuerte".

Guardar en frasco tapado o resguardar de la luz. Tiene una estabilidad máxima de 3 semanas.

- Alcohol Acidificado (para 1000ml): Preparación: 4,5ml de Ácido Acético glacial + 995,5ml de etanol 90%.

El portaobjetos debe sumergirse en una solución de Poli-L-lysina, cuya función es ayudar a la fijación de la extensión de heces al portaobjetos.

El procedimiento a seguir es el siguiente:

1. Dejar secar un frotis de la muestra en un portaobjetos.
2. Una vez seco, se introduce 2 minutos en una cubeta con etanol 70%.
3. A continuación se escurre y se introduce en otra cubeta con alcohol yodado 5 minutos y se elimina el exceso con papel secante tras ese tiempo.
4. Después se introduce consecutivamente en dos cubetas de etanol 70% durante 5 minutos cada una.
5. Pasado ese tiempo se escurre y se sumerge en una cubeta con el colorante tricrómico 10 minutos y se elimina el exceso con papel secante.
6. Después del tricrómico se sumerge fluidamente 2 o 3 veces en una cubeta con el alcohol acidificado, se escurre, se sumerge otras 2 o 3 veces en una cubeta con etanol 70%, y a continuación se deja otros 5 minutos en otra cubeta con etanol 70%.
7. Por último, se escurre el etanol 70%, se sumerge 5 minutos en xilol, se escurre el xilol, y se monta con EUKITT y un cubreobjetos.

4. Clarificación de artrópodos.

Mediante la clarificación de artrópodos se consigue que la luz sea capaz de atravesar la estructura y por tanto ver los distintos escleritos que lo forman, siendo así más fácil la identificación de las diferentes partes y estructuras²⁵.

El método estándar se realiza mediante una solución de hidróxido potásico al 10% (p/v), pero en aquellos casos en los que el tamaño sea considerable, se puede utilizar una solución de mayor concentración (40% (p/v) en nuestro caso).

El procedimiento es el siguiente:

1. Llenar a la mitad aproximadamente una placa Petri con la solución de hidróxido potásico e introducir el artrópodo a clarificar.
2. Observar a la lupa cada aproximadamente 5 minutos y retirar el artrópodo cuando tenga apariencia translúcida.
3. Una vez retirado, introducir el artrópodo en una solución de etanol al 70% durante 5 minutos.
4. Introducir otros 5 minutos en una solución de etanol al 85% y seguidamente otros 5 minutos en etanol 95%.
5. Por último, terminar de deshidratar introduciendo el artrópodo en una solución de etanol absoluto durante, al menos, 5 minutos.



Anexo II. Modelo de fichas explicativas.

Ficha 1. *Entamoeba coli*.



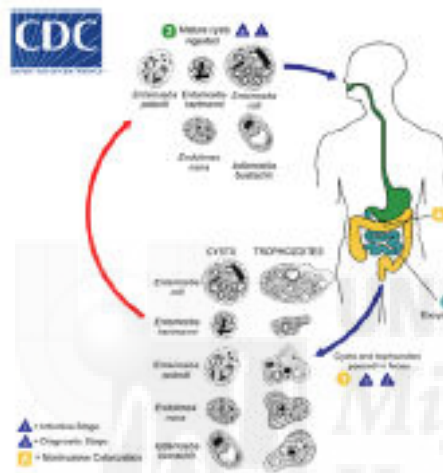
Descripción:

Protozoo del grupo de las amebas (Subphylum Sarcodina).

Parásito comensal no patógeno del tracto gastrointestinal.

Importancia diagnóstica: No confundirla con *Entamoeba histolytica*, que sí es patógena.

Nota*: No se debe confundir con *Escherichia coli*, que es una bacteria.

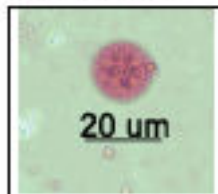



Ciclo:



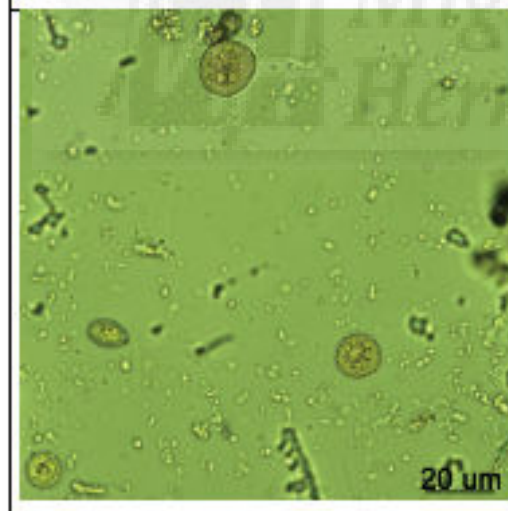
1. Tanto quistes como trofozoitos pasan en heces.
2. Los quistes maduros son ingeridos de una fuente de alimento o agua contaminada.
3. En el intestino los trofozoitos salen del quiste y colonizan el intestino de manera no patógena (A).

Claves diagnósticas:

Quistes en heces.

	<ul style="list-style-type: none"> - Tamaño de 10 a 35 micras - Contorno irregular. Forma esférica u ovalada - Quistes maduros con OCHO núcleos o incluso DIECISEIS. - Quistes inmaduros con CUATRO núcleos que a menudo se confunden con <i>Entamoeba histolytica</i>. No obstante, el quiste inmaduro de <i>E. coli</i> es mayor en tamaño, presenta cromatina nuclear periférica y un cariosoma compuesto por gránulos. - El cariosoma compacto o difuso, localizados de manera excéntrica. - La cromatina periférica áspera y granular, a lo largo de la membrana nuclear, aunque puede distribuirse uniformemente. - El citoplasma de quistes maduros puede contener glucógeno difuso.
	



	<p>Video: https://youtu.be/P6b5tjBmMo</p>
 <p>20 μm</p>	<p>Coinfección por <i>E. coli</i> y <i>G. lamblia</i>.</p>
 <p>20 μm</p>	<p>Coinfección por <i>E. coli</i> y <i>G. lamblia</i>.</p>

Ficha 2. *Ascaris lumbricoides*.



Descripción:

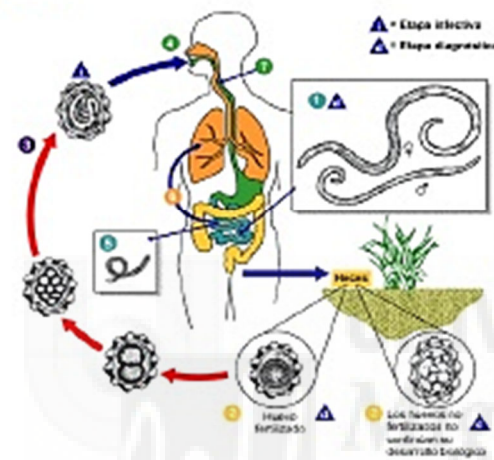
Helminto

Phylum nematoda (helminos redondos).
Nematodo de mayor tamaño en humanos.

Importancia diagnóstica:

Problemas de salud pública en condiciones de higiene inadecuada en agua y alimentos.

Ciclo:



Claves diagnósticas:

Presencia de huevos en heces.



- De hasta 70 o 90um de longitud.
- Ovalados.
- Pared gruesa.
- Cubierta externa de mamelones.
- Color naranja/rojizo.



<p>1 50 μm</p>	<p>Huevos fértiles (1 y 2):</p> <ul style="list-style-type: none"> • De 45 a 70 μm de longitud. • Ovalados. • Pared gruesa. • Cubierta externa de mamelones (1), inexistente en huevos decorticados (2). • Embrionados en el momento de la puesta (2). • Larvados si las condiciones de preservación no han sido adecuadas (1). <p>Huevos infértiles (3):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hasta 90 μm de longitud. • Alargados. • Pared más fina. • Masa de gránulos refractarios (no embrionados).
<p>2 50 μm</p>	<p>Video</p> <p>https://youtu.be/yu1m_8WkTo</p>
<p>3 50 μm</p>	

Adultos:

- Helmintos redondos: nematodos
- Machos: hasta 30 cm de longitud. Parte caudal habitualmente curvada.
- Hembras: hasta 35 cm de longitud. Parte caudal más enderezada.

Ficha 3. *Hymenolepis nana*.



Descripción:

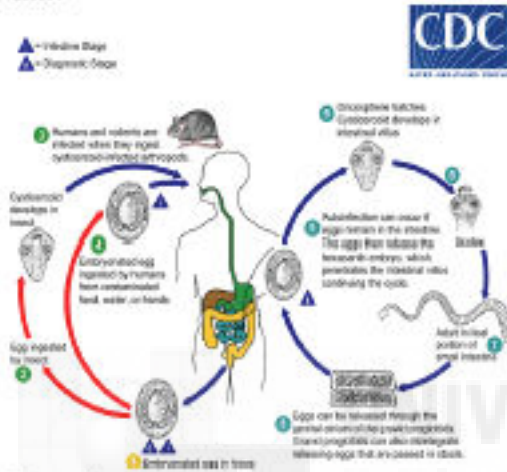
Helminto.

Phylum: Platyhelminths.

Importancia diagnóstica:

Causante de hymenolepiasis y eosinofilia.

Ciclo:



1. Huevos embrionados en heces.

Pueden ser ingeridos desde agua, comida, o manos contaminadas (4), o al ingerir un insecto infectado con el cisticercoide (2 y 3).

5. El cisticercoide sale de la oncosfera en los villi y desarrollan el escólex (6).

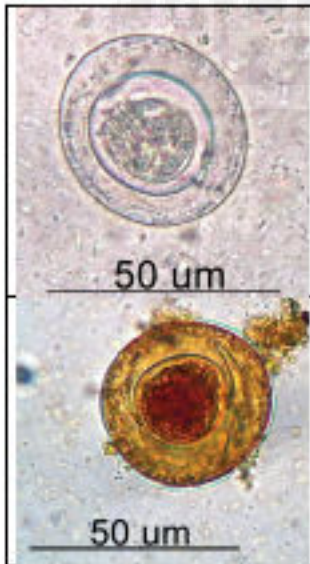
7. Taenia en el íleo.

8. Huevos son expulsados a través del poro genital de las proglótides.

9. Probable autoinfección.

Claves diagnósticas:

Presencia de huevos en heces.



- Forma ovalada.
- Tamaño entre 30 y 47 µm.
- Pared fina.
- Embrión hexacanto.
- Cuatro u ocho filamentos polares en la membrana interna.

Vídeo



<https://youtu.be/EIISWnKAD9c>

Nota: Imagen superior en fresco, imagen inferior teñido con lugol.



Adultos:



Ficha 4. Subfamilia Triatomidae.



Descripción:

Insectos pertenecientes a la Familia Reduviidae, Orden Heteroptera.

Importancia:

Vectores potenciales de la Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana (*T. cruzi*).

Claves diagnósticas

- Artrópodos de gran tamaño.
- Ojos compuestos y ocelos.
- Pronoto en forma de trapecio.
- Probóscide recta formada por tres segmentos.
- Dos pares de alas, siendo el segundo membranoso.
- Hemiólitos desarrollados cubriendo abdomen.
- Antenas largas de cuatro artejos.

Diferencias entre *Rhodnius* sp., *Triatoma* sp., y *Panstrongylus* sp:

	En <i>Rhodnius</i> spp. las antenas se encuentran muy lejos de los ojos (cerca del ápice de la cabeza). Además, es el de menor tamaño.
	En <i>Panstrongylus</i> spp. las antenas se encuentran prácticamente al lado de los ojos.
	En <i>Triatoma</i> spp. las antenas están entre los ojos y el ápice de la cabeza.



Bibliografía.

1. Gállego Berenguer, Jaime. 1. Asociaciones interespecíficas, el parasitismo. En: Gállego Berenguer, Jaime. Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. 2ª Edición. Barcelona: EDICIONS DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA; 2003. P. 29-35.
2. Botero David, Restrepo Marcos. Parasitosis Humanas. 4ª Edición. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas. 2005.
3. Atias Antonio M. Parasitología Médica. Santiago de Chile: Editorial Impresos Universitaria S.A. 1991.
4. Gállego Berenguer, Jaime. 5. Interrelaciones entre parásitos y hospedadores. En: Gállego Berenguer, Jaime. Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. 2ª Edición. Barcelona: EDICIONS DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA; 2003. P. 61-78.
5. Rey, Luis. Principais Grupos Protozoários e Metazoários Parasitos do Homem e seus Vetores. En: Rey, Luis. Rey Parasitología. 3ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2001. P. 123-134.
6. Guilo Rondanelli Elio. Atlas of Human Protozoa, Atlante dei Protozoi Umani. Milán: Masson S.p.A. 1993.
7. Ash Lawrence R, Orihel Thomas C. Atlas de Parasitología Humana. 5ª Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A. 2010.
8. Gállego Berenguer, Jaime. 23. Phylum Arthropoda: Clase Arachnida (I). En: Gállego Berenguer, Jaime. Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. 2ª Edición. Barcelona: EDICIONS DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA; 2003. P. 367-387.
9. Gállego Berenguer, Jaime. 25. Phylum Arthropoda: Clase Insecta (I). En: Gállego Berenguer, Jaime. Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. 2ª Edición. Barcelona: EDICIONS DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA; 2003. P. 403-430.
10. Rey, Luis. Principais Tipos de Hábitat dos Parasitos. En: Rey, Luis. Rey Parasitología. 3ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2001. P. 71-81.
11. Gállego Berenguer, Jaime. 3. Ciclos Biológicos de los Parásitos. En: Gállego Berenguer, Jaime. Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. 2ª Edición. Barcelona: EDICIONS DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA; 2003. P. 40-49.

12. Fraga Vidal, Jose Alberto. Aprendizajevital.es. Procesos de Aprendizaje, Mejora y Desarrollo Humano [Sede web]. [Actualizada 10 de Julio de 2015; citado 27 de Agosto de 2015]. Disponible en:
<http://www.aprendizajevital.es/faq/>
13. Barrientos Contreras, Fernanda. Aprendizaje cooperativo [Sede web]. Wikipedia; 31 de Diciembre de 2007 [Actualizada por última vez el 8 de Septiembre de 2015; citado el 15 de Octubre de 2015]. Disponible en:
https://es.wikipedia.org/wiki/Aprendizaje_cooperativo
14. Kagan, Spencer. Cooperative learning. San Clemente: Resources for teachers. Kagan; 1994.
15. World Health Organization. Global Health Observatory, Malaria [base de datos en Internet]. WHO 2015. Disponible en:
<http://www.who.int/gho/malaria/en/>
16. Attilio De Carli, Geraldo. Capítulo 2: Examen Macroscópico e Microscópico da Amostra Fecal Fresca e Preservada. En: Attilio De Carli, Geraldo. Parasitologia Clínica, Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratorio para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. Rio de Janeiro: Editora ATHENEU; 2001. P.27-81.
17. Wheatley W. A rapid staining procedure for intestinal amoebae and flagellates. Am J Clin Pathol, 21: 990-991, 1951.
18. Attilio De Carli, Geraldo. Capítulo 3: Preparação e Coloração de Esfregaços Permanentes. En: Attilio De Carli, Geraldo. Parasitologia Clínica, Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratorio para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. Rio de Janeiro: Editora ATHENEU; 2001. P.83-114.
19. Centers for Disease Control and Prevention [Sede web]. Atlanta: USA GOV [Última actualización 21 de Octubre de 2015; acceso 29 de Julio de 2015]. DPDx – Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. Disponible en:
<http://www.cdc.gov/dpdx/>
20. Google Drive [Sede web]. Repositorio de fichas: Morfología de Parásitos en Heces. Luis Navarro Martínez, profesor del Área de Parasitología de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Alicante [Última actualización 21 de Septiembre de 2015]. Disponible en:
<https://drive.google.com/open?id=0B8pAZbyjKzOsZzdQNVJZRWJpZnM>
21. Universidad Miguel Hernández de Elche [Sede web]. Alicante [Actualizado el 24 de Octubre de 2015]. Blog de la asignatura de Parasitología. Disponible en:
<http://umh1687.edu.umh.es/descargas/practicas/>

22. Youtube [Sede web]. Lista de reproducción: Morfología de Parásitos en Heces. Luis Navarro Martínez, profesor del Área de Parasitología de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Alicante [Última actualización 17 de Julio de 2015; visitado el 13 de Octubre de 2015]. Disponible en: https://youtu.be/OGEcVZxXrwg?list=PL7MlyY3sb0puymVMLBFV1fL4uEGClj_56
23. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examination. Bull US Army Med Dept, 8:326, 1946.
24. Attilio de Carli, Geraldo. Apêndice 1: Meios de Montagem. En: Attilio de Carli, Geraldo. Parasitologia Clínica, Seleçao de Métodos e técnicas de Laboratorio para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas.
25. Márquez, L. J. Técnicas de colecta y preservación de insectos. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa. No. 37. España. 2005.

