

MICOCULTIVOS EN LAMINAS COLOREADAS SEGUN LOS METODOS DE PAS Y GOMORI-GRODTT

*Drs. D. Borelli y C. Alemán**

Hemos hallado que los métodos de tinción aplicables a las membranas fúngicas, dan excelentes resultados en los cultivos en láminas.

Los cultivos en láminas son ampliamente conocidos y practicados en micología, sobre todo cuando se estudia la micromorfogenia.

Muchos métodos han sido propuestos^{1,9} Uno de nosotros ha venido introduciendo modificaciones al método de Rivalier y Seidell^{10,11} las cuales permiten observar y fotografiar los microorganismos durante su desarrollo, cuando la forma del hongo es la de su membrana.

La preparación de tales cultivos para su conservación, requiere casi siempre de algún modo de coloración.

Los métodos tradicionales utilizados en la tinción de los cultivos en láminas, incluyen el uso de colorantes protoplasmáticos que no tiñen las membranas. De esta manera, quedan sin teñir grandes porciones de micelio vacuolizado, que son parte integrante del cuadro morfológico correspondiente a ciertas especies y base útil para su diagnóstico.

Recientemente han sido introducidos métodos electivos para poner en evidencia las membranas fúngidas en cortes histológicos y frotis^{12, 16} Nosotros hemos utilizado hasta ahora, el método de Pas y el de Gomori¹⁷

M E T O D O

Los cultivos en láminas han sido conducidos según la técnica publicada, basada esencialmente en el dispositivo de Rivalier y Seidel⁹ con las siguientes modificaciones

a) El tubo en U es sustituido por una tira rectangular de aluminio de 230 por 8 mm., doblada en U.

* Departamentos de Micología y Anatomía Patológica del Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela, Caracas.

b) El medio de cultivo se extiende con la ayuda de un asa de platino, en una superficie redondeada de 15 a 24 mm., de diámetro.

c) Después de colocado el inóculo sobre el medio, se voltea lámina, quedando el cultivo en esta forma, adherido a la cara inferior de la lámina durante el desarrollo.



Figura 1. Phialophora sp. cultivada sobre el medio sablac durante un mes, coloreada con el Gomori-Grodt. X 900.

d) El cultivo puede ser examinado al microscopio y fotografiado en cualquier momento, sin menoscabo de su vitalidad.

Terminado el desarrollo, tratándose de una especie peligrosa, se añade formol al agua del fondo y se deja reposar durante dos días. A partir de este momento, se efectúan los pasos comunes aplicados a cualquier cultivo, es decir

1° Se bota el agua de la cápsula y se coloca ésta destapada en la estufa a 37° C., por 48 horas, para que las láminas sequen completamente.

2° Las láminas con los cultivos ya desecados, son sumergidas en una solución de colodión al 1 por ciento en alcohol-éter a partes iguales e inmediatamente retiradas. Previa limpieza del dorso, las láminas son devueltas a sus cápsulas y colocadas en la estufa durante 6 a 24 horas.

3° Con ayuda de un bisturí se desprenden las partes gruesas que sobresalgan de la superficie del cultivo.

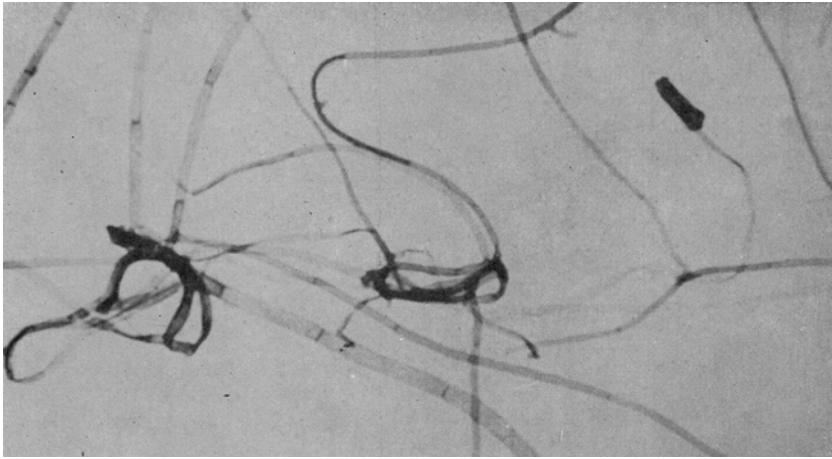


Figura .2—Madurella grises, cepa aislada del suelo, cultivada Por 25 días sobre el medio emalac, coloreada con el mismo método X 900

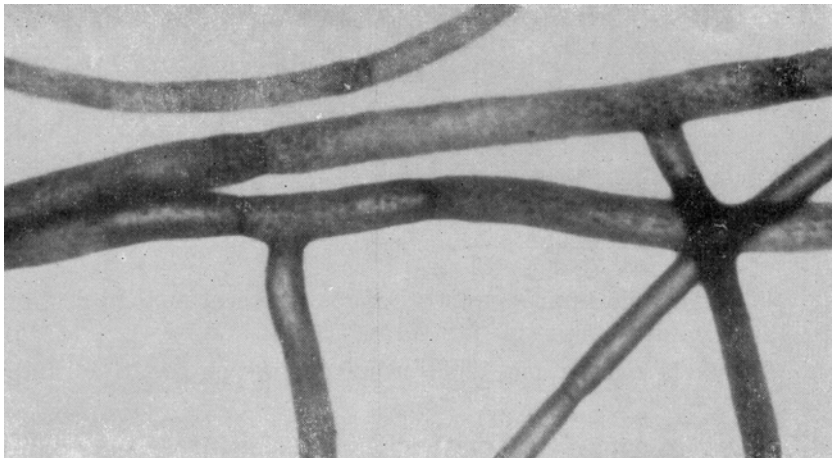


Figura 3. Hyalopopus sp, aislado del suelo cultivado por una semana sobre emalac, coloreado con el Gomori-Grodt. X 2.000.

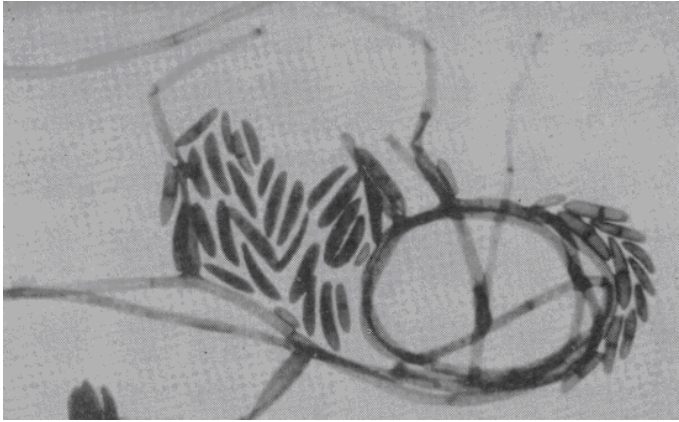


Figura 4.-Hyalopus sp., como en la figura 3; conidióforo, glomérulo, conidias sueltas. Coloración con el mismo método X 900.

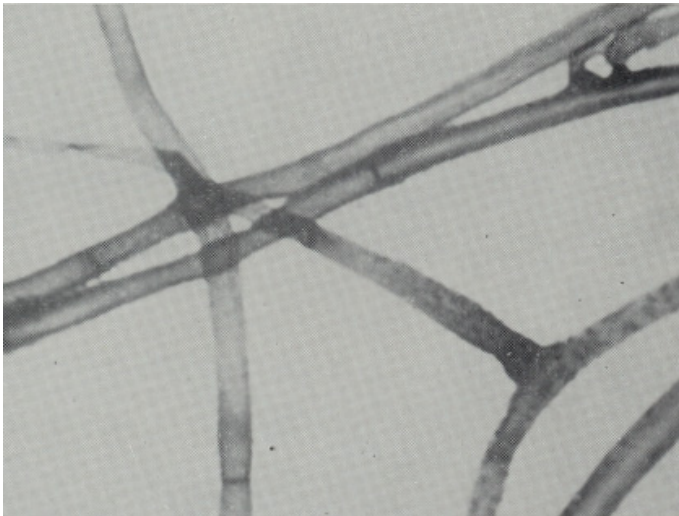


Figura 5.-Hyalopus sp., como en la figura 3.hifas vegetativas, hifa fértil y conidióforo (punteados), glomérulo de conidias adheridas, X 2.000

4- Si se trata de impregnar los hongos según el método de Gomori-Grodt¹⁷ se procede en la siguiente forma

- a) Cubrir la lámina con ácido crómico al 5 por ciento durante una hora.
- b) Lavar en agua de chorro por dos o tres minutos.
- c) Cubrir con bisulfito de sodio al 1 por ciento durante un minuto, para remover el ácido crómico que puede haber quedado.

d) Lavar abundantemente en agua de chorro por cinco minutos y luego efectuar tres cambios con agua destilada.

e) Impregnar en la solución de Methenamina-Nitrato de plata en la estufa a 56° C. Los hongos al control del microscopio, toman un color pardo oscuro en un tiempo que según nuestra experiencia oscila entre 75 y 90 minutos.

f) Efectuar cinco cambios en agua destilada.

g) Diferenciar con solución de cloruro de oro al 0,1 por ciento durante cinco minutos. Lavar en agua destilada.

h) Tratar con hiposulfito de sodio al 2 por ciento durante cinco minutos para remover la plata no precipitada.

i) Deshidratar, clarificar y montar en Clarite u otra resina.

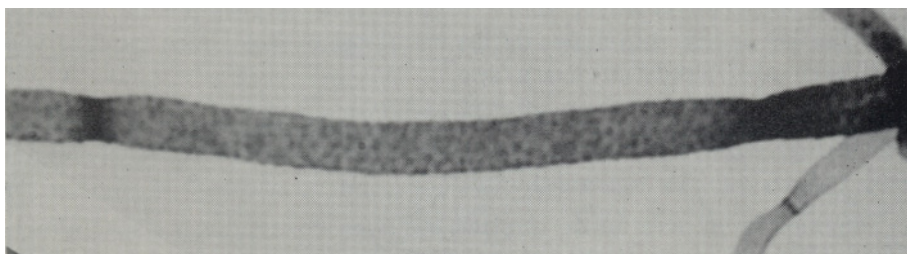


Figura 6.-Hyalopus sp., como en la figura 3. una hifa grande con ornamentos puntiformes bien evidenciados por el Gomori-Grodt, X 2.000.

Si se trata de usar el método de PAS, se procede en la siguiente forma

a) Oxidar por cinco minutos con la solución de ácido periódico al 0,5 por ciento.

b) Lavar en agua destilada por cinco minutos.

c) Cubrir la preparación con solución a partes iguales, de Leucofucsina de Schiff, y agua destilada durante 5-10 minutos.

d) Colocar en agua corriente hasta que aparezca el color rojo.

e) Deshidratar, clarificar y montar en Clarite u otra resina.

RESULTADOS

Aplicando la técnica descrita, se obtiene la tinción de todos los elementos de los cultivos.

La intensidad de la tinción suele variar a paridad de circunstancias, según las especies y el grosor de las membranas en los puntos considerados. Parece influir netamente la presencia de protoplasma sobre la colo-

reabilidad de la membrana : los trechos enteramente vacuolizados se encuentran más pálidos, y, más oscuros, los trechos ocupados por protoplasma.

Este fenómeno es tangible, por ejemplo, en las preparaciones de *Coccidioides immitis*. Tanto en el PAS, como en el Gomori-Grodtt, la pared de los clámido-artrosporos se tiñe intensamente, mientras los trechos intercalares resultan apenas visibles, aun empleando el tiempo máximo indicado.

Las hifas que han sobresalido del medio, suelen teñirse más intensamente de las que han crecido sobre el mismo : es posible que el medio incrustado y la mayor cantidad de colodión que suele depositarse en el centro de los cultivos, dificulten la colocación. Sin embargo no tenemos pruebas concluyentes al respecto.

Algunas preparaciones, sobre todo con la impregnación argéntica, evidencian las ornamentaciones de las membranas, las cuales muchas veces contribuyen al diagnóstico del grupo.

Asimismo es posible ocasionalmente, visualizar cuerpos contenidos en las hifas, cuyo significado todavía no hemos podido aclarar, aunque parece seguro que no son artefactos.

Tenemos la impresión de que los métodos ensayados y especialmente el Gomori-Grodtt, dan resultados satisfactorios, mejores que los empleados hasta ahora. La membrana es el límite anatómico del micelio y determina su forma; acentuando el dibujo de las membranas, como hacemos con estos métodos, delineamos mejor los contornos. La observación microscópica y la microfotografía, se benefician con este hecho en forma decisiva.

RESUMEN

Se han aplicado a la tinción de cultivos en láminas los métodos de PAS y Gomori-Grodtt. Los resultados parecen ser más satisfactorios que los obtenidos con los métodos anteriormente usados.

SUMMARY

PAS and Gomori-Grodtt staining methods were applied to fungus cultures on slides. The results seem to be more satisfactory than those obtained by others methods formerly used.

ZUSAMMENFASSUNG

Pilzkulturen auf dem Objektträger werden nach PAS and GomoriGrodtt gefärbt. Die Ergebnisse scheinen befriedigender, als die bisher erzielten.

BIBLIOGRAFIA

1. Vantieghe, P. M. & Le Monnier, G. 1873. Recherches sur les Mucorinées. Ann. Sej. Nato Bot. XVII: 261-399. Pl. XX-XXX.
2. Redaelli, P. & Ciferri, R. 1931. Culture of fungi on liquid media in Petri dishes. Zbel. Bakt. Parsk. Infektkrh. 1 Abt. Orig. 121; 370-371.
3. Dalmau, L. M. 1929. Observations on mycologic technique with particular reference to pathogenic fungi. P. R. J. Pub. Health & Trop. Med. 5: 302.
4. Langeron, M. & Guerra, P. 1938. Nouvelles recherche3 de Zymologie médicale. Ann. Paras. XVI: 36-84.
5. Raubitscheck, F. & Sagher, F. 1948. Hanging drop preparations as a routine method for culturing material from fungus diseases. Acta Médica Orientalia, 7: 213.
6. Littman, M. L. 1949. Improved slide culture technique for study and identification of pathogenic fungi. Am. J. Clin. Path. 19: 278.
7. Riddell, R. W. 1950. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. Mycologia, 42: 265.
8. Vogel, R. A. 1952. A Modified VanTieghem mount. J. Invest. Dermat., 19 (2) 103-104.
9. Knaysi, G. 1957. New Technique of growing molds in slide culture under environmental conditions similar to those prevailing in the Petri dish. J. Bacteriol. 73 (3)431-435.
10. Rivalier, E. y Seidel, S. 1932. Nouveau procédé de culture sus lames gélosées appliquées a l'étude microscopique des champignos desteignes. Ann. Paras. X: 444-452. C. R. S. B. CX: 181 (1932).
11. Borelli, D. 1954. Nota técnica sobre cultivo en lámina de los hongos frágiles. Rev. Policlinica Caracas, XXII (131), 285-290.
12. Kligman, A. M. & Mescon, H. 1950. The Periodic-Acid Schiff Stain for Demonstration of Fungi in Animal Tissues. J. Bacteriol. 60: 415.
13. Gomori, G. 1952. Microscopic Histochemistry: Principles and Practice. Univ. Chicago Press, Chicago.
14. Grodtt, R. G. 1955. A statin for Fungi in Tissue Sections. Amer. J. Clin. Path. 25: 975-979.
15. Gridley, M. F. 1953. A statin for Fungi in Tissue Sections. Amer. J. Clin Path. 23: 303.
16. Herrera, J. M. Paracoccidioidosis brasiliense. Arch. Med. Panameños. V. 4, número 4: 209-219.
17. Armed Forces Inst. of Path. 1957. Manual of Histologic and Special Staining Technics.