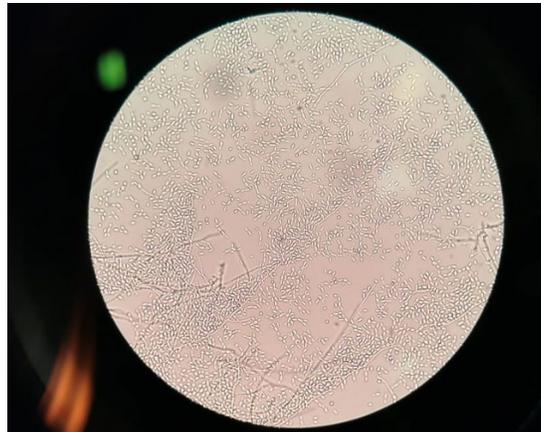




# **Manual de técnicas para el manejo del hongo patógeno *Sporothrix schenckii***

**Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato**



**Piñón Trujillo Abraham, Ángeles Torres Katherine Y.**

**Ortega Guzmán Dulce G., Virrueta Alatorre, Jaime M.**

**Ramírez Olvera Alondra N., Hernández Martínez, Lizbeth J.**

**Revisión y Edición: Dr. Gustavo A. Niño-Vega y M. en C. Tannia Razo Soria**

**Veranos de la Ciencia UG 2023**



# Contenido

1. Prefacio
2. Buenas prácticas en el laboratorio en el trabajo de microorganismos patógenos
  - Qué son los hongos
  - Hongos patógenos
  - Bioseguridad al manejar microorganismos patógenos
  - Manejo de la campana de seguridad
  - Manejo de condiciones estériles para los cultivos
3. Técnicas de asilamiento y manejo el hongo *Sporothrix schenckii*
  - Hongo dimórfico
  - Propagación del hongo *Sporothrix schenckii*.
  - Manejo de las distintas morfologías en el laboratorio
  - Manejo de los desechos del hongo *Sporothrix schenckii*
  - Diagnóstico de *Sporothrix schenckii*
  - Tratamiento en caso de infección por *Sporothrix schenckii*
4. Elaboración de un cepario del hongo patógeno *Sporothrix schenckii*
  - Resiembra del hongo *Sporothrix schenckii*
  - Asilamiento del hongo para su conservación
  - Conteo celular en la cámara de Neubauer
  - Métodos de conservación
  - Liofilización
5. Técnicas de biología molecular empleadas para el estudio de la expresión de genes de  $\beta$ -glucanasas de la pared celular del hongo patógeno *Sporothrix schenckii*.
  - Extracción de ARN de ambas fases (levadura y micelio) y de la fase levaduriforme crecidas en YPD, para producción de ADNc y ensayos de RT-PCR.
  - Cuantificación de ácidos nucleicos
  - PCR control

- **Síntesis de ADNc (RT-PCR)**

## **6. Bibliografía**

### **7. Anexos: Infografías**

- **Manejo de Hongos Patógenos en Laboratorio**
- **Manejo del Hongo Patógeno *Sporothrix schenckii* en Laboratorio**
- **Cámara de Neubauer**
- **Expresión de genes en *Sporothrix schenckii***



# Manual de técnicas para el manejo del hongo patógeno *Sporothrix schenckii*



## 1. Prefacio

Las micosis en humanos y animales han tenido un aumento en recientes décadas, esto se observa en la continua e imparable notificación de su incremento clínico. Es destacable que su aumento ha ayudado en la mejora de los conocimientos, técnicas y tratamientos médicos. La aparición de nuevas formaciones de fármacos de utilidad comprobada y nuevos agentes antifúngicos ha llenado de grandes esperanzas en el tratamiento de las micosis.

En este manual describimos el manejo de un organismo causante de una micosis cutánea consecuencia de la parasitación por un hongo: *Sporothrix schenckii*. La esporotricosis es una infección subcutánea que es causada por el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*, el cual se encuentra como saprofito en asociación con material orgánico como vegetación descompuesta, el suelo o el heno. Esta especie al ser un hongo dimórfico que tiene una fase de micelio saprofito a temperatura ambiente (25°C-28°C) y una fase patógena tipo levadura a 36°C-37°C [1]

La piel del hospedero que sufre un trauma será lo que le permite al hongo ingresar, principalmente en forma de conidios que se encuentran en el ambiente, y luego recorren ascendentemente los canales linfáticos, empezando a desarrollar lesiones a lo largo de este canal; esto puede ocurrir por contacto con restos de plantas contaminadas en el área de trauma o por rasguños o mordeduras de animales que portan el hongo.

El peligro que representa la infección por *Sporothrix schenckii* ha llevado a los científicos a desarrollar herramientas moleculares y de modelos biológicos celulares disponibles para comprender la patogenia y los factores de virulencia del hongo.

Por lo anteriormente descrito, es de suma importancia conocer sobre el manejo de las cepas de organismos patógenos de humanos para evitar la contaminación e infección del personal que manipule el material biológico patógeno, este manual busca informar sobre la correcta manipulación del material, zona de experimentación y cultivos de *Sporothrix schenckii*.



## Manual de técnicas para el manejo del hongo patógeno *Sporothrix schenckii*



### 2. Buenas prácticas en el laboratorio en el trabajo de microorganismos patógenos

**Objetivo.** Que el alumno pueda reconocer los elementos de seguridad necesarios para realizar las diferentes actividades dentro del laboratorio de investigación.

Los hongos son un grupo de organismos con características propias de nutrición y fisiología y reproducción. Formando un reino aparte de las plantas y animales, si bien estos organismos no contienen clorofila poseen células con núcleo y su cuerpo está formado por gran cantidad de filamentos ramificados con pared celular de quitina o celulosa llamados hifas. Formando así una estructura que llamamos micelio. Son el grupo que se considera con mayor número de organismos después de los insectos, sumado a eso, también existen hongos altamente patógenos para la salud humana. Los hongos patógenos son organismos que provocan enfermedades a su hospedero, que puede ser animal o vegetal y en algunos casos se puede llegar a ocasionar la muerte [2,3].

El laboratorio de Glicobiología de hongos es el lugar en donde se realizan los diferentes experimentos del proyecto, en este laboratorio de trabajan con diferentes microorganismos, uno de ellos, como fue antes mencionado es *Sporothrix schenckii*, el cual es un organismo patógeno en humanos, por lo que el cuidado en su manejo es fundamental para asegurar la seguridad del personal que manipule directamente al organismo.

En el laboratorio entre las infecciones adquiridas la infección fúngica representa el 9% en su mayoría debida a hongos dimórficos. Y aunque pareciera ser un porcentaje relativamente bajo, el empleo de las normas de seguridad ayudan a minimizar el riesgo de adquisición de la infección. Podemos determinar la patogenicidad del microorganismo analizando su virulencia, su potencial epidémico, la dosis requerida para iniciar la infección, la ruta de infección o de transmisión, el espectro de huéspedes susceptibles incluyendo los reservorios animales y sus vectores, la viabilidad del agente infeccioso en el entorno del laboratorio y la existencia de tratamiento. El hongo patógeno *Sporothrix schenckii* con el que se trabaja en este proyecto se define como un agente biológico de grupo 2, esto significa que, es aquel que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis y tratamiento eficaz.

Para el manejo de hongos patógenos es necesario el uso de cabinas de seguridad biológica, las cuales son recintos diseñados para limitar el riesgo del personal del laboratorio mediante flujos de aire que disminuyen la exposición a los agentes infecciosos. Tiene como objetivo la protección tanto para el personal como para las muestras que se trabajen dentro de la cabina. Disponen de las barreras de aire y de filtros que crean que el flujo de una sola dirección a una velocidad constante dando lugar a lo que se conoce como cortina de aire [4]

Es importante que se sigan todas las medidas mencionadas a continuación, por seguridad del personal.

## **Materiales**

### **Parte A**

- Bata de laboratorio
- Guantes de nitrilo o látex
- Lentes de seguridad
- Cubrebocas
- Calzado cerrado

### **Parte B**

- Campana de flujo laminar

## **Procedimiento “A”**

La higiene del personal es fundamental para la correcta realización de los experimentos.

-El personal que tenga cabello largo deberá llevarlo recogido. Evitar el uso de aretes y uñas largos.

-Comer, fumar, beber esta estrictamente prohibido mientras se realizan los experimentos en contacto con *Sporothrix schenckii*. Solo se podrá comer y beber en los lugares designados.

-El personal deberá de lavarse las manos antes de realizar cualquier experimento y después colocarse los guantes para manipular *Sporothrix schenckii*. Por ningún motivo deberá tocarse la cara, boca, nariz u ojos, después de la manipulación del hongo patógeno.

-El personal deberá ser muy cuidadoso con las heridas en las manos, deberán ser cubiertas antes de ponerse los guantes, si la herida se produce al momento de realizar sus labores comuníquese al personal encargado.

-El personal manipulara todos los cultivos de hongos en la cabina de flujo laminar, para evitar la contaminación del laboratorio y del personal. No abrir las cajas Petri en la mesa de laboratorio, y usar siempre guantes. El montaje de muestras en un portaobjetos debe ser en la cabina de flujo laminar.

-El personal deberá asegurar las cajas Petri para evitar su abertura accidental, se colocan pequeños pedazos de cinta en las orillas donde se abre la caja Petri.

-El personal deberá de usar correctamente su bata, esta deberá estar limpia, y deberá de cubrir hasta las rodillas. Evitar el uso de short, faldas o vestidos, esto para minimizar la superficie corporal expuesta.

-Se recomienda el uso de la mascarilla al momento de manipular los cultivos *Sporothrix schenckii* esto para evitar la contaminación, o en su caso, evitar hablar mientras manipula cualquier cultivo o muestra.

-El personal deberá ser cuidadoso con la manipulación de material que este caliente, como medios de cultivo, autoclave, etc. usar siempre guantes de protección del calor.

### **Procedimiento “B”**

Encender la cabina y dejarla con un flujo laminar por 15 – 30 minutos.

Comprobar que la presión sea la adecuada.

Limpiar el interior de la cabina antes de colocar las muestras y después de usar la campana.

Antes de usar la cabina, lavarse las manos y brazos; después de usar la cabina lavarse las manos y brazos.

Al momento de estar trabajando con las muestras, es necesario trabajar a una distancia de 5-10 cm por encima de la superficie procurando no obstruir las rejillas de aire con el material o residuos.

Evitar corrientes de aire que provengan de puertas o ventanas.

Evitar usar mecheros dentro de la campana ya que pueden dañar los filtros y si es el caso de usar asas, es necesario usar un encendedor eléctrico con una llama pequeña. [4]



## Manual de técnicas para el manejo del hongo patógeno *Sporothrix schenckii*



### 3. Técnicas de asilamiento y manejo el hongo *Sporothrix schenckii*

**Objetivo.** Conocer los aspectos de limpieza, desinfección y esterilización de diversos materiales, empleados en un laboratorio de cultivo de hongos.

Algunos hongos presentan dimorfismo son los que se desarrollan de diferente manera al exponerse a diferentes temperaturas; por los 25°C se desarrollan como filamentos o hifas y a los 37 °C como levaduras. Por lo general los hongos suelen propagarse esparciendo microsporas, en caso de ser un hongo patógeno estas micrósporas pueden ser inhaladas o entrar en contacto con la piel. El primer síntoma por la infección de esporotricosis es un pequeño bulto rosado que aparece en la piel similar a la picadura de un zancudo por donde ha entrado el hongo a través de una herida, con el tiempo esta infección provoca úlceras que sanan muy lentamente. Su diagnóstico es mediante un médico el cual toma una muestra de la herida y la manda a un laboratorio para cultivos de hongos, o puede hacerse una muestra sanguínea para su detección. El tratamiento es generalmente aplicando yoduros [4]

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la esterilización como la técnica de saneamiento cuyo fin es la destrucción de toda forma de vida. Estamos eliminando todo microorganismo, tanto patógeno como no patógeno, incluidas las formas esporuladas, altamente resistentes. Entonces, el material esterilizado está libre de microorganismos que pueden interferir con los experimentos realizados en el laboratorio, la minuciosa limpieza del material que antecede a la esterilización es un factor central en la eficacia de ello. Estas técnicas se han comenzado a usar desde hace más de 150 años, Chamberlain invento en 1884 la autoclave basada en el uso de calor húmedo a presión para eliminar microorganismos. La cual será utilizada para poder esterilizar el material limpio y el material que haya entrado en contacto con *Sporothrix schenckii*. Es de suma importancia realizar una limpieza al material que haya entrado en contacto con cualquier materia extraña en el ambiente, superficies y objetos, con el propósito de reducir la biocarga (número de microorganismos) a través del arrastre mecánico. En el laboratorio se suele usar agua con detergente para frotar o cepillar el material o se usa la presión del agua [4]

Es importante señalar que el material que haya entrado en contacto con *Sporothrix schenckii* debe de pasar por la esterilización para la destrucción del agente patógeno, y posteriormente, puede realizar el lavado manual del material para usarlo o volverlo a preparar para su uso estéril. El calor húmedo destruirá los microorganismos por desnaturalización de proteínas, enzimas y desestabilización de membranas.

Se debe usar la temperatura para controlar y monitorear el proceso de esterilización, y la presión se usa para que la temperatura sea la óptima. Se recomienda que el proceso de esterilización por calor húmedo en autoclave sean 15 minutos a 121-124 °C (200 kPa).

### **Materiales**

- Autoclave
- Agua destilada
- Hipoclorito de sodio (NaClO) 5%

### **Procedimiento**

**Nota:** Cualquier manejo del material que estuvo en contacto con las colonias de *Sporothrix schenckii* es necesario usar siempre los guantes y bata del laboratorio.

### **Esterilización de material limpio (previamente lavado y seco)**

Para la esterilización de material que este limpio y necesite ser usado en condiciones de esterilidad es importante colocar barreras que le permitan entrar al vapor húmedo e impida que entren en contacto con cualquier elemento externo. Ejemplos de este material serian:

-Matraces

-Cajas de puntas para micropipetas

-Tubos falcón

-Tubos para microcentrífuga

-Agua destilada

-Medio de cultivo YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa)

Los matraces deben de llevar un tapón hecho de gasa que ajuste perfectamente la boca del matraz, los taponos deben de llevar papel aluminio que los cubra en su totalidad. Las cajas de puntas para micropipetas deben de ir envueltas en una cubierta de papel, asegurarse de etiquetar las cajas con el volumen de las puntas. Los tubos falcón deberán ir en una bolsa de polipapel cerrada con un nudo ligeramente suelto, así como cada tubo tiene que ir ligeramente abierto. Para los tubos de microcentrífuga deberán ir el frasco de vidrio ligeramente abierto. El agua destilada de igual manera deberá ir etiquetada y ligeramente abierta. Para los medios YPD, tanto solidos como líquidos, deberán ir etiquetados correctamente, ligeramente abiertos y con una capa de papel aluminio sobre la tapa.

### **Para la preparación de la autoclave:**

Asegúrese de abrir la llave de paso del gas, prepare cerillos y guantes de protección al calor. La autoclave debe de estar limpia, agregue agua hasta 2/3 partes antes de llegar al soporte donde se apoyará el material. Acomode el material preparado dentro de la autoclave. Prenda el mechero que se encuentra debajo de la autoclave, y cierre la tapa girando a la izquierda. Debe esperar a que la autoclave comience a sacar vapor por la válvula reguladora de presión.



Regulador de presión



Una vez que sea constante la salida de vapor por la válvula reguladora de presión será momento de colocar el regulador de presión. A los pocos minutos observaremos la elevación de las otras dos válvulas que integran la autoclave. Y debemos estar atentos que la presión llegue a 15 libras y permanezca a esa presión constante durante 15 minutos. Una vez terminado el tiempo de esterilización, apagamos el mechero, cerramos la llave de paso, y esperamos a que salga todo el vapor húmedo de la autoclave, esto lo podemos comprobar al observar que todas las válvulas han dejado de estar arriba, y que de la válvula reguladora ya no sale vapor.

**NOTA:** Una vez que identifique que se ha salido todo el vapor, abra con cuidado la olla siempre orientando la abertura de la tapa en dirección contraria, apuntando a la pared. El vapor puede provocar quemaduras, evite que el vapor salga directo hacia su rostro. Use guantes y bata para evitar quemaduras.

Por último, asegúrese de sacar todo el material limpio estéril y cerrar todo lo que estaba ligeramente abierto para mantener la esterilidad hasta su uso.

### **Esterilización de material que estuvo en contacto con *Sporothrix schenckii* o cualquier otro microorganismo.**

Para la esterilización de material debemos asegurarnos que no ocurrirán derrames de líquidos con microorganismo, por lo que, es importante que todo material con líquidos este tapado por Parafilm, papel aluminio, o bolsas de polipapel para evitar su precipitación. Ejemplos de este material serian:

- Cajas Petri
- Matraces con medio o restos de líquidos con *Sporothrix schenckii*
- Puntas de micropipetas
- Tubos falcón con medio

-Tubos de microcentrífuga con conidios o levaduras de *Sporothrix schenckii*

-Morteros para moler conidios de *Sporothrix schenckii*

-Cubreobjetos y portaobjetos

Las cajas Petri deberán ir dentro de una bolsa de polipapel cerrada. Las puntas de micropipeta sucias deberán ir en un bote con agua, al igual que los portaobjetos y cubreobjetos.

La preparación de la autoclave es la misma que para la esterilización de material limpio. En caso de esterilización de material que estuvo en contacto con microorganismos debe de dejarse en esterilización por 20 minutos para asegurar la eliminación de cualquier microorganismo patógeno. Cuando el material se haya enfriado, lavar con jabón y agua por acción mecánica y dejar escurrir el material limpio.



## Manual de técnicas para el manejo del hongo patógeno *Sporothrix schenckii*



### 4. Elaboración de un cepario del hongo patógeno *Sporothrix schenckii*

**Objetivo.** Realizar la siembra, obtención y propagación de las cepas de *Sporothrix schenckii* para mantener la disponibilidad de material biológico para diferentes análisis.

*Sporothrix schenckii* es un hongo altamente patógeno que causa micosis subcutánea, no todas las cepas del género *Sporothrix* son de emergencia clínica, ya que en su lugar se les considera en su mayoría como especies saprofitas. En general las especies de *Sporothrix* son hongos dimórficos que presentan un crecimiento a una temperatura ambiente de 25 a 28 °C y la fase patógena levaduriforme, crece en un rango de temperatura de 36 a 37 °C [3]. El primer caso registrado por la esporotricosis fue en 1898 por Benjamin Schenck en el cual describía como la piel habría sufrido graves lesiones por el hongo. La manera de contagio puede ser varias, puede ser a través del torrente sanguíneo el cual el hongo ingresa al huésped por una lesión cutánea, por restos de plantas contaminadas o por rasguños o mordeduras de animales contaminados [5]. En su forma filamentosa, las colonias son de lento crecimiento de 5 a 6 días por lo general son de color claro, húmedas o esponjosas, que posteriormente se convierten en colonias duras y arrugadas de color marrón o negro en su totalidad o por zonas, debido a la producción de conidios pigmentadas. Al observarse con el microscopio, se puede apreciar hifas delgadas de 1-2 mm de diámetro que presentan conidióforos perpendiculares donde su extremo se encuentra formando una vesícula denticulada la cual nacerá los próximos conidios. Con el pasar de los días, el cultivo empieza a perder sus nutrientes y con ello las células empiezan a envejecer más rápido y aumenta la aparición de conidios sésiles a lo largo de los conidióforos e incluso hifas no diferenciadas. Algunas cepas forman conidios de mayor tamaño, triangulares, pigmentadas y de pared gruesa, más resistentes. En la forma levaduriforme se observan levaduras ovoides o en forma de cigarro, con varias gemaciones. Para la obtención de conidios es necesario usar un medio YPD sólido a un pH de 4.5 y para la obtención de levaduras un medio YPD líquido a un pH de 7.8 [6].

#### **Materiales**

- Medio YPD sólido
  - Peptona de gelatina.
  - Extracto de levadura.
  - Glucosa.
  - Agar.
  - Solución de HCl 1N.
  - Solución de NaCl 1N.
- Medio YPD líquido
  - Peptona de gelatina.
  - Extracto de levadura.

- Glucosa.
  - Solución de HCl 1N.
  - Solución de NaCl 1N.
- Potenciómetro.
- Balanza.
- Charolas.
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Micropipetas de 1000 µL.
- Puntas de pipetas de 1000 µL.
- Micropipetas de 200 µL.
- Puntas de micropipetas de 200 µL.
- Agua destilada esterilizada 500 mL.
- Agua destilada 500 mL.
- Tubos falcón estériles.
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL y 0.5 mL
- Glicerol al 50%.
- Placas Petri.
- Campana de flujo laminar.
- Centrifuga.
- Microcentrífuga.
- Probeta.
- Asa triangular.

### **Procedimiento**

**Nota:** Cualquier manejo con las colonias de *Sporothrix schenckii* es necesario usar siempre los guantes y bata del laboratorio.

### **Obtención de conidios**

Para la obtención de conidios es necesario usar un medio YPD a un pH ácido (4.5). La cantidad necesaria usada para la elaboración de alrededor de 15 cajas es de aproximadamente 500 mL (dependiendo del diámetro de la caja, que puede ser de 20–25 mm).

El medio se prepara con:

- 2% de peptona de gelatina.
- 1% de extracto de levadura.
- 3% de glucosa.
- 2% agar.

Usando la fórmula de relación peso/volumen las cantidades en gramos por cada reactivo son las siguientes:

- 10g de peptona de gelatina.

- 5g de extracto de levadura.
- 15g de glucosa.
- 10g agar.

Para la preparación del medio, es necesario ajustar el pH a un nivel ácido de aproximadamente 4.5, esto se logra usando el potenciómetro al cual una vez mezclados todos los reactivos del medio en agua destilada exceptuando el agar. Se debe de medir el pH inicial e ir ajustando al pH deseado ya sea el caso acidificando o alcalinizando la solución con NaOH o HCL 2N. Una vez finalizado, es necesario agregar el agar y mezclar correctamente.

El medio es esterilizado y una vez completado ese paso, es necesario realizar un vaciado a las cajas Petri, esperando su solidificación.

Se inoculan placas de medio YPD, pH 4.5 con 50-100  $\mu\text{L}$  de un stock de conidios congelados a  $-70^\circ\text{C}$  con una densidad de  $2 \times 10^7$  células/mL esparciéndolos con un asa triangular por toda la caja Petri.

Las placas se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 7 días.

### **Recolección de muestras de las placas Petri**

Una vez crecido el cultivo, los conidios se cosecharon de cada placa agregando 5 mL de agua destilada estéril frío y frotando la superficie del cultivo usando un asa de vidrio estéril, esto fue necesario realizarlo 2 veces.

El agua junto a los conidios se recuperó y se colecto en tubos falcón de 50 mL. Se centrifugaron los tubos ( $6800g \times 5 \text{ min}$  a  $4^\circ\text{C}$ ).

Se quito el sobrenadante de la muestra y las pastillas de las células formadas en la base del tubo falcón, fue recolectada y se pasó a un tubo falcón de 1.5 mL. Fue necesario con ayuda de una microcentrífuga realizar una segunda centrifugación. De igual manera se quitó el sobrenadante y solo se dejó la pastilla con las células.

Las pastillas de los conidios se lavaron con PBS (o agua destilada), y se re suspendieron en 4.5 mL de medio YPD y glicerol al 50%.

### **Obtención de fase micelial**

A partir de conidios se inoculan tubos falcón de 50 mL con 15 mL de medio YPD liquido a un pH de 4.5 con 150  $\mu\text{L}$  de suspensión de conidios de  $1 \times 10^7$  mL como preinóculo, y se incuban a  $28^\circ\text{C}$ , 120 rpm por 2 días

El preinóculo se usa como inóculo en matraces con 25 mL de medio YPD y se incuban a una temperatura de  $28^\circ\text{C}$ , 120 rpm por 4 días en un incubador.

Una vez transcurrido el periodo de incubación, se puso el medio con la fase micelial en tubos falcón estériles de 50 mL y se centrifugan a  $6800g \times 5 \text{ min}$ .

Las pastillas de células se lavaron con PBS (o agua destilada), y se re suspendieron en 4.5 mL de medio YPD y glicerol al 50%.

## Obtención de levaduras

De un stock inicial de conidios, se inoculan 150  $\mu\text{L}$  en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 20 mL de medio YPD líquido a un pH de 7.8, y se incuban a  $37^\circ\text{C}$  con agitación constante (120rpm) por 7-8 días.

Después del periodo de incubación, las células se recuperan.

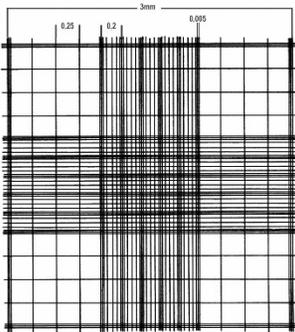
Son vaciadas a un tubo falcón quitando el mayor volumen del sobrenadante y centrifugado a 6800 g x 15 minutos.

Posteriormente fueron lavadas las colonias con PSB 1x.

## Conteo celular en la cámara de Neubauer.

Cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer permite realizar conteos celulares. Posee dos zonas de soporte y una de recuento. Cada cámara posee dos zonas de recuento en la parte superior y otra en la inferior [7,8].



Poseen múltiples divisiones en forma de cuadrícula, donde se observan 4 cuadros medianos en cada esquina y un cuadro central.

Para el montaje de la muestra, es necesario hacerlo cuidadosamente, pues esto influye en el conteo. Primeramente, se realiza una dilución y se resuspende. La cámara se monta colocando en la zona central la laminilla hematimétrica. Se llena colocando la punta de la pipeta en un ángulo de aprox.

$35^\circ$  en el borde de la zona de carga de ambos lados. Se va descargando la muestra suavemente de modo que, la muestra se va moviendo por capilaridad por la cámara.

Para el conteo, se ha tomado en cuenta el cuadro central, que a su vez están dentro 5 cuadros de  $4 \times 4$ , tomados para el conteo. Al final del conteo se realiza la ecuación para calcular el promedio de células en la muestra.

Concentración celular:  $(\text{Total de células contadas} / \text{Número de cuadrados}) \times 4 \times 10^6$  [8]

## Métodos de conservación de hongos

Existen varios métodos de conservación de hongos en el laboratorio que permiten mantener las cepas viables a largo plazo [9 - 13]. El hongo patógeno *Sporothrix schenckii*, puede conservarse en un cepario utilizando los siguientes métodos de conservación [11 - 13]:

- **Conservación en medio de cultivo sólido:** El método más común implica el crecimiento del hongo en placas de agar Sabouraud o medio de cultivo similar. Las colonias de *S. schenckii* se cultivan en placas estériles y se mantienen a bajas

temperaturas, generalmente en el refrigerador a 4-8 grados Celsius. Las placas deben estar selladas herméticamente para evitar la contaminación y el desecamiento.

- **Conservación en medio de cultivo líquido:** El hongo también puede conservarse en forma líquida en tubos de ensayo o viales con caldo de cultivo enriquecido con nutrientes. Los tubos o viales se mantienen en el refrigerador, siguiendo las mismas pautas de temperatura y sellado que en la conservación en medio sólido.
- **Conservación en glicerol:** Se puede utilizar el método de conservación en glicerol para *S. schenckii*. Las colonias del hongo se suspenden en una solución estéril de glicerol al 20-50% (v/v) en medio de cultivo líquido. Las suspensiones se transfieren a viales estériles y se almacenan a temperaturas muy bajas, como en nitrógeno líquido (-196 grados Celsius) o en un congelador a -80 grados Celsius.
- **Conservación por liofilización:** La liofilización es otra opción para conservar *S. schenckii*. Las colonias del hongo se liofilizan utilizando un liofilizador, que permite la extracción del agua por sublimación en condiciones de vacío. Los hongos liofilizados se almacenan en viales sellados a temperatura ambiente o en el refrigerador.

### **Liofilización**

La liofilización se refiere a uno de los métodos de conservación que se realiza para periodos de tiempo prolongado, utilizando la congelación y la deshidratación. Este es de gran importancia debido a que, una vez reactivado el producto, es capaz de presentar las mismas características que el producto original, reduciendo las pérdidas de calidad provenientes del daño a la muestra por reacciones químicas o por degradación enzimática, siendo un método eficaz a la hora de trabajar con los conidios o cualquier otra estructura propagativa del hongo [13,14].

El proceso de liofilización puede describirse en cuatro fases:

La congelación consiste en congelar rápidamente el cultivo, los cuales una vez congelados, presentarán una apariencia opaca, la cual mantendrán durante todo el proceso de secado.

Para el tratamiento al vacío, la muestra se introduce en un recipiente de la cámara del liofilizador y se conecta al vacío a fin de eliminar los gases no condensables.

Una vez creado el vacío, se continúa con el siguiente paso, el de suministrar calor a la cámara hasta alcanzar el valor adecuado para la sublimación.

Para el último paso, la condensación, se fijan las moléculas de agua en forma de hielo sobre la superficie del condensador del liofilizador.

Los productos resultantes de esta técnica son regenerados rápidamente, pues el proceso para que la rehidratación se lleve a cabo es la adición de 1 ml de agua estéril dejando reposar por

30 minutos, para finalmente, tomar una pequeña muestra de la suspensión y sembrar en placas Petri con medio de cultivo [14].

5. Técnicas de biología molecular empleadas para el estudio de la expresión de genes de  $\beta$ -glucanasas de la pared celular del hongo patógeno *Sporothrix schenckii*.

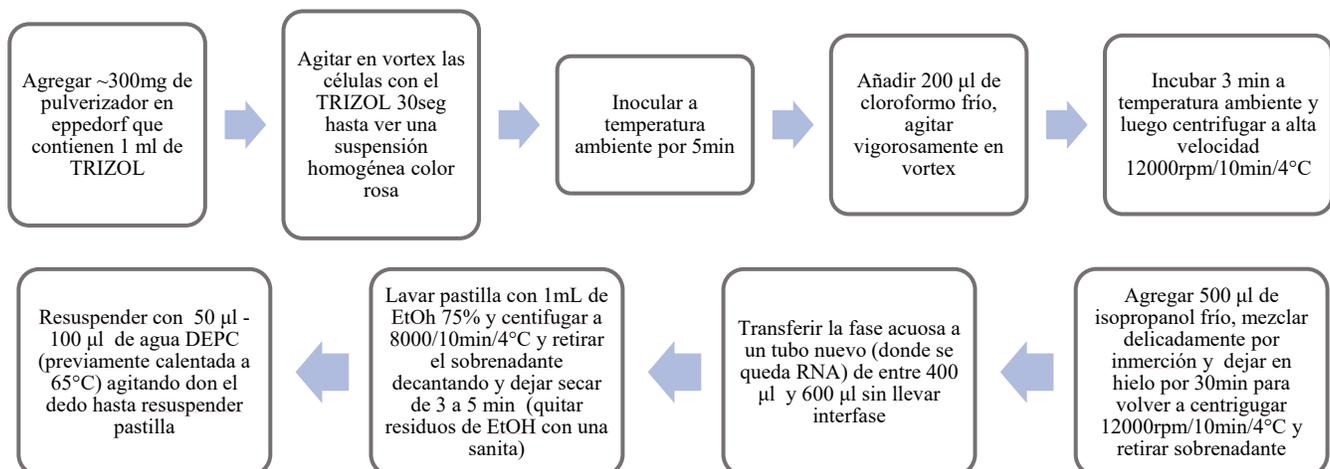
**Extracción de ARN de ambas fases (levadura y micelio) y de la fase levaduriforme crecidas en YPD, para producción de ADNc y ensayos de RT-PCR.**

**Partiendo de micelio**, las células se extraen por medio de vacío, gracias a un sistema matraz Kitasato, un embudo Buschner y papel para cromatografía, se coloca un poco de agua fría y poco a poco el inóculo y gracias al vacío se adhieren los micelios en el papel, después, se dan lavados con agua estéril y fría, los suficientes hasta que el agua comience a percibirse transparente. Posteriormente, el micelio se despega del papel y se coloca en un tubo Falcón, llevándolo a a nitrógeno líquido, congelamiento súbito.

**Partiendo de levaduras**, estas se colocan en tubos de ultracentrífuga. Posteriormente las células se llevan a centrifugación a  $5\ 000 \times g/4^{\circ}\text{C}/5\text{min}$ , formándose una pastilla en fondo. La pastilla se lava y nuevamente se centrifuga, se lava hasta que el agua se vea más clara. La pastilla obtenida se lleva a nitrógeno líquido, congelamiento súbito.

Posteriormente congeladas las células, se maceran en un mortero, hasta obtener un polvo muy fino, evitando la descongelación agregando más nitrógeno líquido durante la maceración.

La extracción se realizó por el método de Trizol.



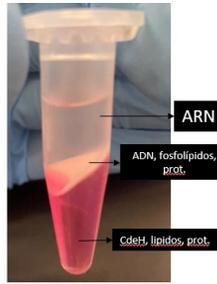


Fig.1. Extracción de RNA después de centrifugar con TRIZOL. Se forma una fase acuosa, una interfase y una fase orgánica. El ARN se encuentra en la fase acuosa por qué forma puentes de hidrogeno.

### Cuantificación de las muestras

Se leen las concentraciones en el NanoDrop, para hacer una conversión de ng/ $\mu$ l, a  $\mu$ g/ $\mu$ l para la reacción, ya que por una reacción de 10 $\mu$ l total se agrega 1 $\mu$ g/ $\mu$ l de ARN.

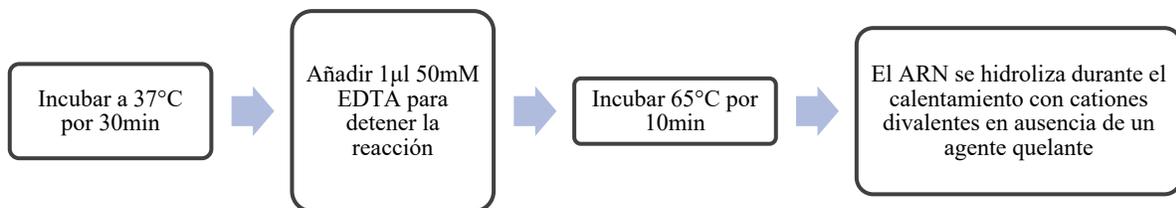
La cuantificación del RNA se hace para saber su concentración y que tan puras están las muestras para saber si son aptas o no para poder obtener ADNc

- Pureza de RNA
  - 260/280 (2.0-2.2) si el valor es inferior está contaminado con proteínas
  - 260/230 (1.8-2.0) si el valor es inferior hay presencia de contaminantes que absorben a 230nm como son los fenoles y sales

\* Si se requiere llegar a un volumen de 20 $\mu$ l solo se pone el doble de cada reactivo

Para obtener 10 $\mu$ l de ARN limpio con DNasa se tiene que hacer la siguiente reacción	
1 $\mu$ g RNA	La cantidad de RNA que se pone se determina dependiendo la concentración de la muestra y con la formula $C1V1=C2V2$ para obtener una concentración de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l
Buffer DNasa I 10X	1 $\mu$ l
Enzima DNasa I 1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O DEPC	Lo que se necesite para llegar a 10 $\mu$ l

Y se sigue el siguiente procedimiento:



Gracias a la DNasa, es posible deshacerse del ADN encontrado en la muestra y tener muestras de RNA pura

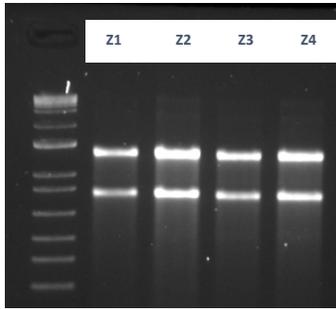
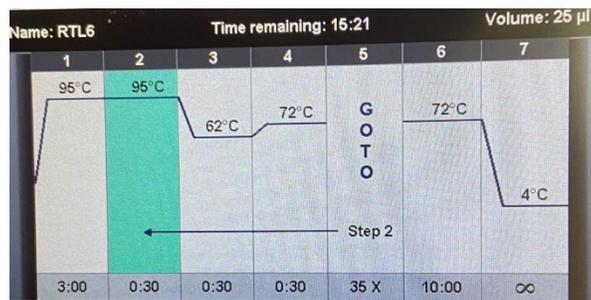


Fig2. Gel de agarosa en TBE al 1.5%. muestras limpias libres de ADN

### PCR control

Para obtener 25µl en cada tubo de PCR se tiene que hacer la siguiente reacción :	
10X taq. Buffer	2.5 µl
dNTPS(2mM)	2.5 µl
Fw primer [10mM]	2.5 µl
Rv primer [10mM]	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> [25mM]	2 µl
RNA	1 µl
Taq. Pol.	0.3 µl
H <sub>2</sub> O DEPC	11.7 µl
<b>Volumen final</b>	<b>25µl</b>

Una vez obtenida la reacción, se mete a un termociclador con las siguientes condiciones:



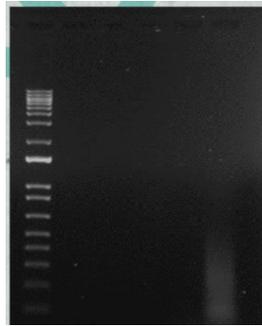


Fig3. PCR control. En la presente electroforesis se confirma la ausencia de ADNg en las muestras de RNA, ya que no se amplifica ningún gen.

### Síntesis de ADNc (RTPCR)

La síntesis de ADNc se realiza a partir de RNA, gracias a la enzima Transcriptasa Inversa (SuperScript III), que puede llevar a cabo la síntesis de ADN complementario a partir de RNA. Por otro lado, la RNase OUT evita la degradación del RNA, por lo que es un inhibidor no competitivo de ribonucleasas.

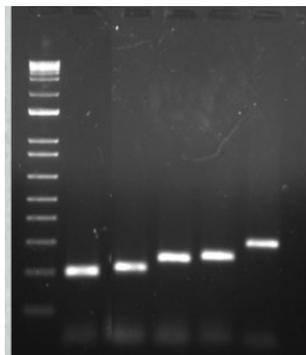
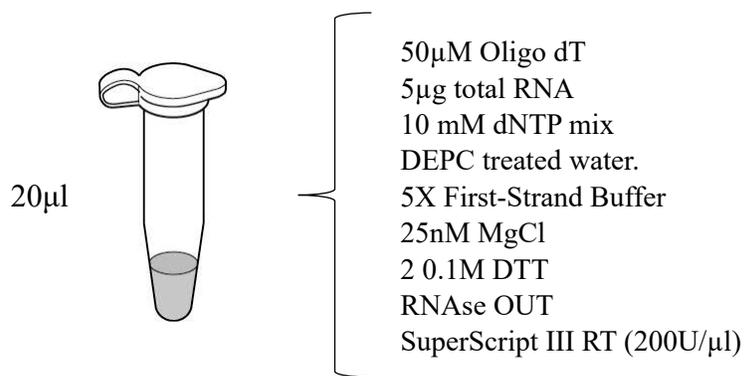


Fig. 4, RTPCR punto final. Se muestra la expresión semicuantitativa de 5 genes 1. Crf1, 2.Eng1, 3.Eng2, 4.Eng3, 5.EglC, a partir de ADNc de micelio, los cuales codifican para  $\beta$ -glucanas



## Manual de técnicas para el manejo del hongo patógeno *Sporothrix schenckii*



### 6. Bibliografía

1. Travassos, L. R. (1985). *Sporothrix schenckii*. En: Szaniszlo, P.J., Harris, J.L. (eds) *Fungal Dimorphism*. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4982-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4982-2_6)
2. Lopes-Bezerra, L. M., Schubach, A., Costa, R. O. (2006). *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78, 293-308.
3. Barros, M. B. D. L., de Almeida Paes, R., Schubach, A. O. (2011). *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 633-654
4. Borrell N., Mesquida X., Alomar P., (2007) Normas de Seguridad. En: Pemán J., Martínez-Mazuelos E., Rubio-Calvo MC (Eds). *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*, 2da edición. *Revista Iberoamericana de Micología*. Cap 17, pp 17-1 - 17-13. ISBN: 978-84-611-8776-8
5. López-Romero, E., Reyes-Montes, M. D. R., Pérez-Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagómez-Castro, J. C., Mora-Montes, H. M., Flores-Carreón, A., Toriello, C. (2011). *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiology*, 6(1), 85-102.
6. García-Carnero, L. C., Martínez-Álvarez, J. A. (2022). Virulence factors of *Sporothrix schenckii*. *Journal of Fungi*, 8(3), 318.
7. Manual de Bioquímica Celular y de los Tejidos II; Anexo 2: Cámara de Neubauer – Blog del Manual del Laboratorio, UNAM. <https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/>
8. Gil M.; 12 julio 2019; Lifeder; Cámara de Neubauer: historia, características, usos. <https://www.lifeder.com/camara-de-neubauer/>
9. Cañedo, V., Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Conservación de hongos por liofilización. 47-49. <https://www.udocz.com/apuntes/340250/manual-de-laboratorio-para-el-manejo-de-hongos-entomopatogenos>
10. Dixon, D. M. (1989). Preservation of pathogenic fungi for research and diagnostic purposes. *Medical Mycology*, 27(Supplement\_1), 51-57.
11. Ellis, D., & Davis, S. (2014). The selection of strains of *Sporothrix schenckii* for susceptibility testing. *Journal of Medical Microbiology*, 63(10), 1353-1358.
12. Irney, D. (2006). Evolución de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la pontificia Universidad Javeriana. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8280/tesis260.pdf?sequence=1>
13. El proceso de la liofilización. (s/f). Tema 4. Recuperado de <https://www.ub.edu/talq/es/node/261>

14. Noguera, I. B. (2020). Proceso de liofilización: Ventajas y Aplicaciones. Ingeniería Química. <https://www.ingenieriaquimicareviews.com/2020/09/liofilizacion-proceso-y-ventajas.html>

UNIVERSIDAD DE  
GUANAJUATO



## Manual de técnicas para el manejo del hongo patógeno *Sporothrix schenckii*

### 7. Anexos: Infografías





# MANEJO DE HONGOS PATÓGENOS EN LABORATORIO

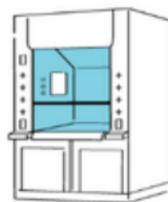
## Hongos patógenos



Son organismos microscópicos que pueden causar enfermedades en plantas, animales y seres humanos. Estos hongos tienen la capacidad de invadir tejidos vivos, crecer y reproducirse dentro de ellos, lo que puede resultar en daños y enfermedades.



**POR SEGURIDAD**



**PARA ESTERILIDAD**

### Autoclave:

Equipo utilizado en laboratorios y otros entornos para realizar la esterilización de diversos materiales y medios de cultivo. Proporciona un ambiente de alta presión y temperatura para eliminar microorganismos y agentes contaminantes.

### Campana de flujo laminar:

Proporciona un flujo de aire limpio y unidireccional para proteger tanto al usuario como a la muestra o producto manipulado dentro de la campana.

## *Sporothrix schenckii*



### LEVADURA

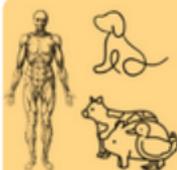
- Temperatura de 25-37°C
- Requiere de pH 7.8
- Crecimiento de 7-8 días
- Reproducción principalmente por gemación
- Morfología ovalada con diámetro de entre 2 y 5 micrómetros.
- Forma parásita que causa esporotricosis

### MICELIO



- Temperatura de 25-28°C
- Requiere de pH 4.5
- Crecimiento de 4-5 días
- El micelio produce estructuras de reproducción llamadas conidios
- Morfología que consiste en hifas septadas delgadas
- Forma saprófita, no infecta

## INFECCIÓN



### Importancia/riesgo

La infección se produce por inoculación del hongo en la piel, generalmente a través de objetos contaminados infectando humanos y animales.



### Síntomas

- Comienza con una lesión cutánea (protuberancia rojiza) en el sitio de entrada del hongo que puede ulcerarse y desarrollar costras.
- Posterior, aparecen nuevas lesiones en las extremidades, el tronco o la cara.
- En ocasiones, la infección se disemina a través del sistema linfático y afecta los ganglios.

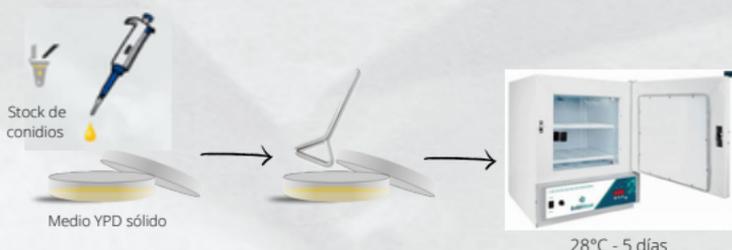
# Manejo del hongo patógeno *Sporothrix schenckii* en laboratorio

## PROPAGACIÓN DEL HONGO

### MEDIO YPD SÓLIDO

- Extracto de levadura 1%
- Peptona de gelatina 2%
- Glucosa / Dextrosa 3%
- Agar 2%
- Ajustar pH 4.5 con HCl (1N)
- Ajustar pH 7.8 con NaOH (1N)

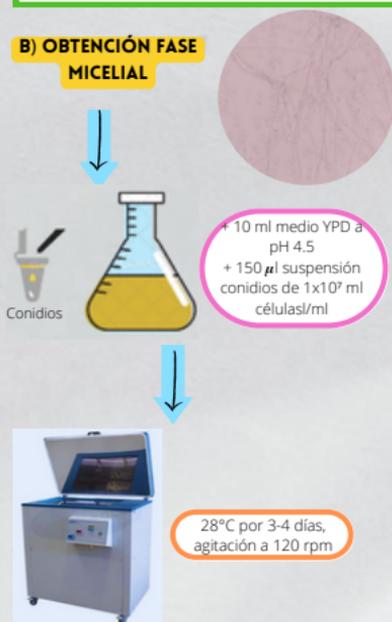
## A) OBTENCIÓN DE CONIDIOS



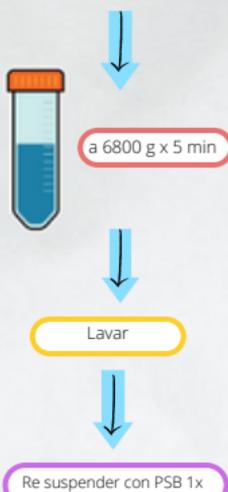
## RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se cosechan conidios agregando 5 ml de agua destilada estéril frío, con un asa de Drigalsky se frota la superficie y se recupera el líquido en tubos falcón de 50 ml (2 repeticiones). Se reparte 1 ml en tubos Eppendorf y se centrifuga a 12000 g x 3 min. Retirar el sobrenadante de la mitad de los tubos; se agregan 500  $\mu$ l del resto a los primeros. Centrifugar de nuevo y repetir, para quedar finalmente con 5 tubos. Se agrega 500  $\mu$ l de glicerol y 500  $\mu$ l de medio; refrigerar. Posterior, se realiza el conteo en cámara de Neubauer.

## B) OBTENCIÓN FASE MICELIAL



## C) OBTENCIÓN DE LEVADURAS



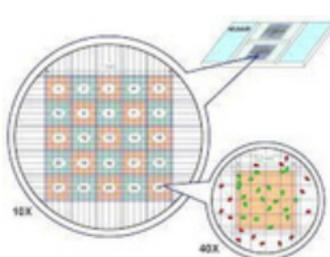


# Cámara de Neubauer

¿Qué es?

Es un dispositivo utilizado en laboratorios para realizar el recuento de células en un volumen conocido de una muestra líquida.

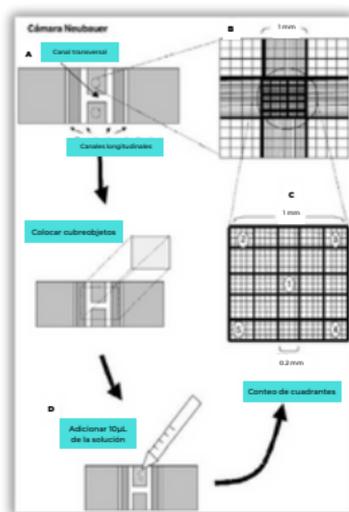
## ¿Cómo esta constituida?



Consta de una cuadrícula de 9 grandes cuadrados y cada cuadrado grande contiene 16 cuadrados más pequeños. Estos cuadrados más pequeños están divididos en 25 cuadrículas más pequeñas, lo que resulta en un total de 400 cuadrículas. Cada una de estas cuadrículas tiene una profundidad precisa y conocida, lo que permite el cálculo del volumen de muestra contenida en cada cuadrícula.

## ¿Cómo se realiza?

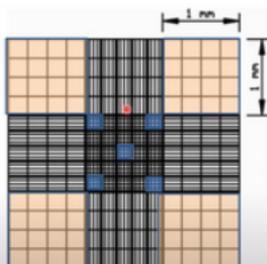
Para realizar un recuento celular utilizando la cámara de Neubauer, se coloca una muestra diluida de la muestra líquida en la cámara y se observa bajo un microscopio. Las células se cuentan manualmente en una o más cuadrículas y se utiliza esa información para calcular la concentración celular en la muestra original.



**Cuadros grandes  
(de las esquinas)**

Conteo de células en general:  
20-100 cel/cuadro

Ej: cultivos celulares,  
espermatozoides a  
concentraciones  
regulares, leucocitos

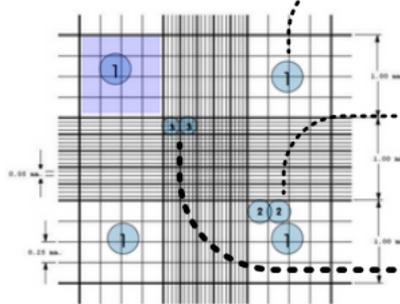


**Cuadritos del cuadro  
central**

Conteos de células  
pequeñas y/o a muy alta  
concentración:  
Espermatozoides,  
eritrocitos

**Conteos  
celulares**

## Calculos



Área = 1 mm x 1 mm = 1 mm<sup>2</sup>      Volumen = 1 mm<sup>2</sup> x 0,1 mm = 0,1 mm<sup>3</sup> = 1 x 10<sup>-4</sup> ml

1  
Concentración celular =  $\frac{\text{Total Células Contadas}}{\text{Número de Cuadros}} \times 10.000$

Área = 0,25 mm x 0,25 mm = 0,0625 mm<sup>2</sup>  
Volumen = 0,0625 mm<sup>2</sup> x 0,1 mm = 6,25 x 10<sup>-3</sup> mm<sup>3</sup> = 6,25 x 10<sup>-4</sup> ml

2  
Concentración celular =  $\frac{\text{Total Células Contadas}}{\text{Número de Cuadros}} \times 160.000$

Área = 0,2 mm x 0,2 mm = 0,04 mm<sup>2</sup>  
Volumen = 0,04 mm<sup>2</sup> x 0,1 mm = 4 x 10<sup>-3</sup> mm<sup>3</sup> = 4 x 10<sup>-4</sup> ml

3  
Concentración celular =  $\frac{\text{Total Células Contadas}}{\text{Número de Cuadros}} \times 250.000$



## Expresión de genes

# *Sporothrix schenckii*

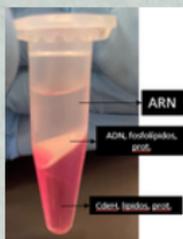


Fig. 1 La extracción de RNA por método de TRIzol. Se forman tres fases una acuosa, una interfase y una orgánica. El ARN se encuentra en la fase acuosa formando puentes de hidrógeno con el agua entre sus bases nitrogenadas libres y H del H<sub>2</sub>O.

Se utilizan geles de agarosa en TBE al 1.5% para fragmentos de productos de PCR y de ADN de doble cadena preparados para enzimas de restricción, extractos de fenol y equilibrados en Tris-HCl 10 mM pH8 y EDTA 1 mM 4 Incluye los colorantes naranja Q y clonaz de sildenil A cada uno de los pozos se le pone entre 4 y 8  $\mu$ l

*S. sch.* es uno de los hongos que como mecanismo la segregación de  $\beta$ -glucanasa que, recorta segmentos de  $\beta$ -glucanás expuesto en la superficie de la pared celular fúngica, de modo que, evita el reconocimiento inmune del hospedero. Por lo que, se evaluó la expresión de 5 genes que codifican para  $\beta$ -glucanasa en fase levaduriforme y micelio.

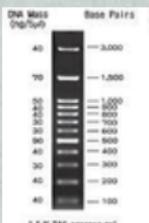


Fig. 11 Tamaño de las bandas del marcador en gel de agarosa en TBE al 1.5%

En *S.Sch.* las bandas miden entre 900pb (2BS) y 600pb (8BS) aprox.

## Obtención de RNA

### Micelio



Colectadas con un sistema de filtración con un embudo Buchner y matraz kitasato, se lava con agua helada estéril, se colecta en tubos eppendorf y se congela con N<sub>2</sub> líquido para extracción de RNA con TRIzol.

### Levaduras



Colectadas por centrifugación a 500xg y 4°C por 5 min. La pastilla obtenida se congela con nitrógeno líquido para extracción de RNA con TRIzol.

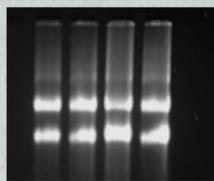


Fig. 2 Gel de agarosa en TAE al 1.5%. Se observan 4 muestras de ARN de micelio. Se puede observar que posiblemente aún se encuentran restos de DNA, o bien, que aún no este bien rehidratado el DNA por lo que se debe realizar un limpieza con DNasa I.

## Limpieza con DNasa I

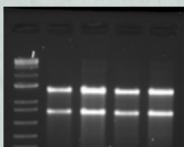


Fig. 3 RNA tratamiento con DNasa I. En un gel de agarosa con muestra de RNA, las bandas se observan más definidas, representan las subunidades ribosomales (28S, 18S)

La limpieza con la enzima DNasa I se realiza para eliminar los restos de DNA y obtener RNA puro. En un tubo libre RNAsas para una reacción de 10ul se agrega:

C1V1 = C2V2  
V1 = C2V2 / C1



- 10g RNA
- 10X Buffer DNasa 1  $\mu$ l
- Enzima DNasa 1  $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O DEPC to 10 $\mu$ l



57°C  
50min



Agregar  
50mW  
EDTA 1 $\mu$ l



65°C  
10min

El ARN se hidroliza con cationes divalentes en ausencia de un agente quelante

## PCR Control

Una PCR control se utiliza para descartar la presencia de DNag, ya que la Taq Polimerasa no sintetiza copias de DNA a partir de RNA, en caso de que la muestra se encuentre libre de DNag.



- RNA
- 10X Taq Buffer
- 10mM dNTP mix
- 50mM MgCl<sub>2</sub>
- Taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ l)
- H<sub>2</sub>O DEPC
- Fw primer (10uW)
- Re primer (10uW)

Se meten al termociclador tomando en cuenta las siguientes condiciones:

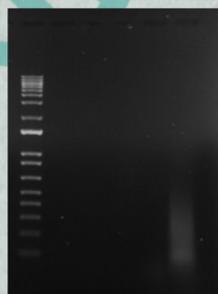
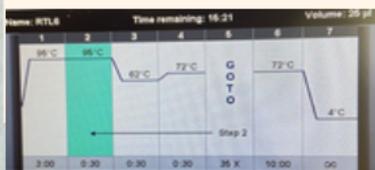


Fig. 4. PCR control. En la presente electroforesis se confirma la ausencia de DNag en las muestras de RNA, ya que no se amplifica ningún gen.

## Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA, se realiza a partir de RNA, gracias a la enzima Transcriptasa Inversa (SuperScript III), que puede llevar a cabo la síntesis de DNA complementario a partir de RNA. Por otro lado, la RNase OUT evita la degradación del RNA, por lo que es un inhibidor no competitivo de ribonucleasas.

- 50uM Oligo dT
- 5ug total RNA
- 10 mM dNTP mix
- DEPC treated water
- 5X First-Strand Buffer
- 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.1M DTT
- RNase OUT
- SuperScript III RT (200U/ $\mu$ l)



20 $\mu$ l

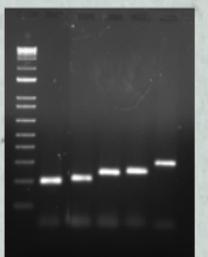


Fig. 5. RT-PCR punto final. Se muestra la expresión semicuantitativa de 5 genes: Crf1, 2E1ng1, 3E1ng2, 4E1ng3, 5E1ngc, a partir de cDNA de micelio, los cuales codifican para  $\beta$ -glucanas

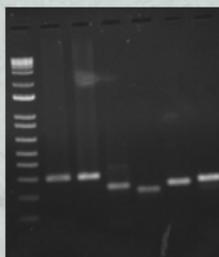


Fig. 5. RT-PCR punto final. Se muestra la expresión semicuantitativa de 5 genes: Crf1, 2E1ng1, 3E1ng2, 4E1ng3, 5E1ngc, a partir de cDNA de levadura, los cuales codifican para  $\beta$ -glucanas

A partir de cDNA, gracias a una PCR punto final, se podrán amplificar varias copias del gen te interés, en este caso 5 de los genes los cuales expresan para la  $\beta$ -glucanasa.

### REFERENCIAS

Warren J, Hernández-Chávez, Luis A, Pérez-G, Gustavo A, Niño V and Hector B, Warren B. Published: 25 September 2021. Fungal Strategies to Evade the Host Immune Response. *Journal of Fungi*.  
DOI: 10.3390/jof9111282 and CMOA, A. WERNER, G. 2021. The Fungal Cell Wall Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum*.

Alondra Natalie Ramirez Olvera  
Lizbeth Josselin Hernández Martínez