



MANUAL DE PARASITOLOGÍA



MÉTODOS PARA LABORATORIOS DE ATENCIÓN PRIMARIA DE SALUD

RINA GIRARD DE KAMINSKY, M.Sc.

**Este Manual es de distribución gratuita
Prohibida su venta**

El Manual ha sido posible gracias a las contribuciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH).

Autora-Editora: Rina Girard de Kamínsky, M.Sc.

Diseño y Revisión: Darían Matute

MANUAL DE PARASITOLOGÍA

**Métodos para Laboratorios de
Atención Primaria de Salud**

2da. Edición, 2003

Rina Girard de Kaminsky, M.Sc.

Sobre la Autora

Creo que es frecuente una publicación de metodología diagnóstica de parásitos humanos para la cual el autor incluya tópicos obtenidos de otras publicaciones pero que nunca fueron usados personalmente por el responsable de la publicación. Este no es el caso de este manual donde la autora Rina Girard de Kaminsky, ha incluido una serie de tópicos importantes para un laboratorista, especialmente si trabaja en un medio tropical donde la frecuencia de parásitos es muy grande. Rina es una experta en este tema debido a una sólida formación académica en dos instituciones mundialmente conocidas por su interés en la enseñanza teórica y práctica en medicina tropical. En la Universidad de Tulane, obtuvo una Maestría en Parasitología bajo el tutelaje de profesores del calibre de Carrol Faust, Paul C. Beaver, Robert Yaeger, Albert Miller, Dale M. Little, Thomas Orihel y Rodney Jung, entre otros. Además, durante dos años tomó cursos de parasitología, micología y microbiología en el muy conocido Instituto de Enfermedades Tropicales de Hamburgo, en Alemania, labor facilitada por su facilidad idiomática que le permite enseñar en español, inglés, francés y alemán. Tiene más de 30 años de experiencia profesional en investigación, docencia y servicio en Universidades de Brasil, Kenia, Túnez, Haití y Honduras, de donde es natural. Tiene especial interesen investigación y sólida experiencia en parasitología clásica y en el diagnóstico de laboratorio de parásitos, con énfasis en aquellos intestinales, lumbinales y tisulares, asi como en otros parásitos tisulares extra intestinales.

En este momento Rina es Profesor Titular, Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH) y Profesor Asociado Adjunto del Departamento de Medicina Tropical, Escuela de Salud Pública, Universidad de Tulane en Nueva Orleans. Fue responsable de desarrollar la Sección de Parasitología del Departamento de Microbiología de la UNAH, Honduras y responsable de las colaboraciones de investigación con distintas instituciones: Universidad de Arizona, Organización Panamericana de la Salud (Washington/Ginebra, Suiza, Universidad de Miami y Fogarty Internationa (USA), Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, y por supuesto, con la Secretaría de Salud de Honduras. La lectura abreviada de su currículo solo ayuda a tener presente que la autora de este manual en español, ha presentado en este su larga experiencia personal en las técnicas diagnósticas de parásitos humanos, muy frecuentes en países tropicales de América y por lo tanto de gran utilidad práctica.

Antonio D 'Alessandro MD, PhD
Profesor Emérito
Departamento de Medicina Tropical
Universidad de Tulane, Nueva Orleans, Estados Unidos.

PREFACIO

Los métodos contenidos en la 2^{da} edición de este Manual fueron presentados, discutidos y ejecutados durante las sesiones prácticas del Curso de Enfermedades Parasitarias Prioritarias en América Latina (CEPPAL) en el mes de agosto de 1994 y 1995 en Tegucigalpa, Honduras. Los mismos fueron seleccionados sobre la base de los conocimientos actualizados de cada uno, referente a costos, eficacia, eficiencia, existencia y facilidad de obtención de reactivos, reproducibilidad, facilidad de ejecución, flexibilidad para adaptarse a trabajo clínico y epidemiológico y recomendación por organismos acreditados.

En 1996 se publicó la primera edición, que ha sido de utilidad en los laboratorios de diagnóstico clínico en atención primaria de salud, o epidemiológico, según las características de cada laboratorio, así como para enseñanza y adiestramiento en servicio de personal de laboratorio. Fue escrita por los Directores del curso con colaboración de Asesores Temporeros de la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.

La presente edición conserva la intención inicial de la primera, de ofrecer al personal de laboratorio información básica sobre métodos aprobados de diagnóstico en parasitología humana. El énfasis ha sido de ponerlo al alcance de laboratorios de atención primaria de salud. El estar escrito en idioma español hace posible su utilidad en países de habla hispana. Se ha tenido presente la importancia de contar con técnicas fáciles, confiables, accesibles en material y reactivos y de comprobada eficacia por ser estándar. Se ha guardado el formato original al mismo tiempo que se lo ha corregido y actualizado en algunas técnicas. Además, se han incluido algunos esquemas de aparatos o técnicas y su contenido se ha reagrupado en 5 partes: Microscopio y Microscopía, Parásitos intestinales lumbinales y tisulares, Parásitos transmitidos por vectores, Ilustraciones y Algoritmos.

Ninguna de ambas ediciones contiene ilustraciones ni fotografías de estadios diagnósticos de los diferentes parásitos. Estos se encuentran ilustrados en forma excelente en los Medios Visuales (Bench Aids) que distribuye la Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza. Las ilustraciones provistas y las descripciones de hallazgos de parásitos pueden ser ampliadas con las de textos y Atlas de referencia. Alguna de la literatura citada parecería poco actualizada; sin embargo, los métodos descritos son los básicos a los cuales se les han hecho pocas modificaciones y siguen vigentes; otros métodos son recientes y todos están implementados para el trabajo de rutina del Hospital-Escuela, Honduras.

Aunque el procedimiento de cada método es de fácil seguimiento, se prefiere que el usuario posea una base firme de trabajo en el laboratorio.

Deseamos reconocer la colaboración y ayuda de profesionales que han escrito algunos métodos, ofrecido consejos o han asistido de alguna manera en la producción y publicación del Manual. La autora está particularmente agradecida, para esta edición, con los Doctores Keith Cáster, OPS/Washington, Estados Unidos; Carlos Samayoa, Representante OPS/Honduras; Antonio D'Alessandro, Universidad de Tulane, Estados Unidos. La Dra. Jackeline

Alger, Ministerio de Salud/Honduras, facilitó los métodos de diagnóstico de malaria.

Esperamos que los usuarios encuentren un formato de fácil lectura y que los métodos sean de utilidad para el diagnóstico y reconocimiento de los parásitos más frecuentes en nuestro medio. Además, que proporcione la oportunidad de mantener un alto nivel de confiabilidad y satisfacción en su trabajo.

*Rina Girard de Kaminsky M.Sc.
Dirección de Investigación Científica
Universidad Nacional Autónoma de Honduras y Hospital-Escuela.
Tegucigalpa, Honduras 2^{da}
Edición, 2003.*

CONTENIDO

Prefacio a la 2 ^{da} Edición	3
Contenido	5
Manual de Procedimientos en el control de calidad	7
Algunos criterios útiles para el diagnóstico de parásito del humano.....	9
I. - Microscopio	
Enfoque interpupilar.....	13
Enfoque ocular	13
Iluminación	12
Estimación del tamaño.....	14
Cuidados	16
II. - Parásitos intestinales luminales y tisulares	
Producto de reproducción de diferentes parásitos intestinales, hepáticos, pulmonares y sanguíneos: Huevos, larvas, quistes, trofozoitos, ooquistes. Cuenta de huevos de geohelminetos.....	19
Estimación de la intensidad de la infección de nemátodos transmitidos por el suelo	23
Cuenta de huevos. Interpretación.....	23
Método directo o frote.....	25
Método de KATO, variación KATZ	27
Método de dilución de Stoll	31
Recobrar parásitos adultos de heces	33
Método de la cinta adhesiva transparente.....	35
Flotación por sulfato de zinc.....	37
Sheather	39
Sedimentación por Formalina-acetato de etilo.....	43
Diferenciación de larvas de nemátodos	47
Harada Mori.....	47
Variación en caja de Petri	49
Método de Baermann.....	51
Migración de larvas en agar	53
Larvas en tejido método de compresión	57
Digestión artificial.....	59
Método para medir ganchos de protoescolices de <i>Echinococcus</i> spp	61
Método de la tinta china para identificación de especies de <i>Taenia</i>	63
Coloración de heces.....	65
Método hematoxilina férrica de Heidenhain.....	65
Método ácido resistente modificado	71
Coloración según Weber.....	75
Coloración modificada con cromotrope.....	77
Alternativa azul de metileno-tricromo.....	79
III. - Parásitos transmitidos por vectores	
Concentración y coloración de microfilarias	83
Método de Knott.....	83
Giemsa.....	83
Hematoxilina de Delafield	84
Diagnóstico microscópico de malaria	87
Otras pruebas diagnósticas utilizadas en malaria.....	93
Diagnóstico microscópico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	95
Métodos indirectos	101
Diagnóstico parasitológico de <i>Leishmania</i> spp	103
Leishmaniasis visceral. Gradación de la densidad parasitaria	111
Diagnóstico serológico.....	113
IV. - Ilustraciones	

Esquema de un microscopio	119
Calibración.....	120
Técnica de Kato-Katz	121
Cinta adhesiva transparente.....	122
Flotación	123
Formalina-acetato de etilo	124
Harada-Mori en tubo y en caja de Petri.....	125
Esquemas de larvas de nemátodos	126
Baermann en vaso de sedimentación	127
Ejemplo, gancho de protoescolix de <i>E. vogeli</i>	128
Centrifugación y coloración según Weber.....	129
Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR).....	130
V.- Algoritmos	
Algoritmo 1: Alternativas en encuestas epidemiológicas	134
Algoritmo 2: Heces frescas en el diagnóstico parasitológico	135
Algoritmo 3: Heces fijadas en el diagnóstico de laboratorio	135
Algoritmo 4: Alternativas para examen de heces diarreicas y líquidas.....	136
Soluciones	
Ácido sulfúrico 0.1 N	72
Agar para migración de larvas.....	54
Albúmina de Mayer	66
Alcohol ácido	78
Alcohol yodado stock.....	66
Alcohol glicerinado al 20%	58
Amortiguadoras para malaria	88
Anticoagulante de citrato al 2%	84
Antígeno de Montenegro.....	113
Azul de metileno alcalino	72
Azul de metileno y cromotropo	79
Búfer ácido para malaria	89
Búfer ácido para Delafield.....	83
Búfer ácido para <i>Leishmania</i>	83
Búfer alcalino para malaria	89
Búfer alcalino para Delafield.....	83
Búfer alcalino para <i>Leishmania</i>	83
Coca's.....	108
Carbol-fucsina	71
Colorante de hematoxilina de Delafield.....	84
Cromotropo.....	77
Cultivo NNN	106
Cultivo de Senejkie's	107
Diferenciador ácido pícrico	67
Formalina al 2%	83
Glúcerina para Kato	27
Hematoxilina para heces	67
Hidróxido de sodio para Stoll.....	31
Líquido para digestión artificial.....	59
Medio de Berelese	106
Mordente sulfato férrico amónico.....	58
Solución amortiguadora pH 7	104
Solución salina buferada.....	108
Solución de Locke	106
índice de parásitos.....	138

COMO PARTE DE UN CONTROL DE CALIDAD

El trabajo técnico en un laboratorio debe estar bajo una supervisión constante a través de procedimientos de control de calidad. Tal supervisión no es posible sin la existencia de un manual de procedimientos que defina y perfile los resultados esperados.

Todo laboratorio debe elaborar un manual de procedimientos validados, que es un elemento clave en el control de calidad y por ende, asegura la calidad de los cuidados de salud.

La preparación de tales manuales debe ser el primer paso en el establecimiento de cualquier laboratorio. Van a variar dependiendo del tamaño y función de cada laboratorio y deben contener información explícita e instrucciones inequívocas sobre aspectos diversos como: recolección de muestras, controles, instrumentos y su calibración, direcciones de cómo proceder, cálculos, valores nominales, limitantes del método, referencias, fecha de revisión, etc.

Para revisar y actualizar un manual de laboratorio, se debe tomar en cuenta lo siguiente:

- Establecer quién tiene la autoridad para llevar a cabo la revisión
- Esto puede variar según la organización administrativa del laboratorio, pero puede ser el Director del laboratorio y/o su asociado, un supervisor calificado, un comité delegado.
- Revisar los procedimientos cada vez que se realice un cambio en la metodología, instrumentos, reactivos etc.
- Revisar cada procedimiento por lo menos una vez al año. En este momento decidir si el procedimiento puede ser reprobado tal como está escrito, si necesita revisión o si está obsoleto.

Puntos esenciales a considerar:

- Conformidad del procedimiento según lineamientos establecidos.
- Conformidad del procedimiento con la metodología actualizada (por ejemplo: refleja lo que se está haciendo en el laboratorio).
- Cambios menores pueden hacerse en el original, firmados y efectuados, con una nota de quién lo hizo.
- Cambios más grandes requieren escribir de nuevo todo el procedimiento.
- La revisión debe hacerse por lo menos anual.
- El que la ejecuta debe ser la misma persona mencionada al inicio.
- Firmar y fechar cada procedimiento cada vez que se realice una revisión.'

Hacerse las siguientes preguntas:

- ¿El manual contiene todos los materiales requeridos?
- ¿Existe evidencia de una revisión reciente?
- ¿Los procedimientos son recientes?
- ¿Contiene el manual procedimientos viejos y obsoletos?

¿El manual de trabajo, los diagramas, algoritmos o tarjetas de archivo están en concordancia con el manual maestro?

La revisión debe documentarse. La persona autorizada debe firmar y fechar el índice actualizado o la página aprobada. Si hay copias, éstas siguen el mismo procedimiento. Debe llevarse un registro de las copias por la persona responsable.

Procedimientos obsoletos o revisados deben ser retirados de circulación y puestos en un archivo para revisión histórica o contra acusaciones y mantenidos por un mínimo de 2 años.

Por otra parte, es en interés de todo laboratorio de participar en controles de calidad, tanto internos como externos. El fin principal es de ofrecer al personal de laboratorio la posibilidad de verificar la calidad de sus observaciones y de esta manera asegurar la mejora continua en su trabajo, para bien del enfermo, ya que la confiabilidad de los resultados es muy importante en el manejo clínico del paciente o bien de la salud pública.

El valor adicional de tales controles radica en la oportunidad de identificar lagunas o deficiencias en el conocimiento y tener la oportunidad de ofrecer educación continua al personal con el fin de corregirlas, sin olvidar la necesidad preventiva de revisar y mantener todos los aparatos e instrumentos utilizados durante el trabajo diario.

El control de calidad debe ser organizado bajo la autoridad del Ministerio de Salud a través de un Laboratorio Nacional de Referencia. Sociedades afines (Ej. Patología Clínica, Colegio Médico, Asociación de Laboratorios) pueden contribuir en el diseño, elaboración o aprobación de un programa de eficiencia de laboratorio. Bajo este programa, todos los laboratorios de diagnóstico clínico o de salud pública deben tener una licencia de operaciones, la cual es renovada cuando se satisfacen los requerimientos de los controles de calidad.

REFERENCIA:

Clinical Laboratory Procedures. National Comité for Clínicl Laboratory Standards. vol.2, 1984.

ALGUNOS CRITERIOS ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO DE PARÁSITOS HUMANOS

Regla de oro en Parasitología - recobrar, identificar y demostrar el parásito, para poder determinar la etiología del proceso de infección o enfermedad.

- a. **Métodos directos:** Identificar parásitos o sus productos de reproducción
- b. **Métodos indirectos:** Obtener con pruebas serológicas y de otro tipo resultados que, unido a la clínica y a otras consideraciones, dan un diagnóstico probable

Solicitud de exámenes (situación clínica) dependerá:

- Tipo de población servida
- Personal técnico disponible
- Metodología disponible
- Costos
- Relevancia clínica de los resultados

Base indispensable de conocimiento para solicitud de exámenes:

- Ciclo de vida de los parásitos locales
- Habitat en el hospedero, usual y ectópica
- Manifestaciones clínicas más específicas o probables
- Maneras de transmisión

Ejemplos de muestra a enviar al laboratorio para demostrar parásitos en general:

- | | | |
|---------|---|-------------------------|
| Heces | - | Sangre |
| Orina | - | Secreciones |
| Espuito | - | Excreciones |
| Pus | - | Otros líquidos |
| LCR | - | Parásito <i>in toto</i> |

Biopsia de tejidos - Aspirados

Ejemplos:

Heces - este examen puede demostrar parásitos localizados en:

<u>Localización</u>	<u>Ejemplo</u>
- Intestinos	<i>Ascaris, Trichuris</i>
- Hígado	<i>Fasciola hepática</i>
- Sangre	<i>Trypanosoma cruzi</i> , malaria
- Pulmones	especies de <i>Paragonimus</i>

Aspirado duodenal - examen útil para demostrar:

<u>Parásito</u>	<u>Estadio</u>
- <i>Cryptosporidium</i> sp.	ooquiste
- <i>Isospora belli</i>	ooquiste
- <i>Giardia lamblia</i>	trofozoíto, quiste
- <i>Strongyloides stercoralis</i>	larva

MÉTODOS DIRECTOS, ejemplos:

- Baermann - extrae larvas.
- Flotación de Sheather - concentra ooquistes de algunos apicomplexa
- Raspado de úlcera perineal - demuestra trofozoítos de ***Entamoeba histolytica*** en amebiasis cutís
- Raspado de úlcera cutánea - evidencia amastigotes de ***Leishmania***
- Lavado bronquial - demuestra estadios de ***Pneumocystis carinii*** en algunas situaciones de inmunocompromiso

Para considerar opciones de examen de heces, ver algoritmos adjuntos, de la página 133 a la 135.

MÉTODOS INDIRECTOS, ejemplos:

- Inmunológicos - hemaglutinación indirecta para tripanosomiasis americana
- Inmunohistoquímicos - microsporidiosis
- Rayos X - de abdomen para visualizar cambios en diagnóstico de angiostrongilosis abdominal
- "Pornografía axial computarizada - neurocisticercosis
- Resonancia magnética - absceso hepático amebiano
- Péptidos sintéticos, otra tecnología biomolecular-diferenciar ***Trypanosoma cruzi*** de ***T. rangeli***

**MICROSCOPIO Y
MICROSCOPIA**

MICROSCOPIO

USO CORRECTO, ILUMINACIÓN, MEDICIÓN Y CUIDADOS

Antes de iniciar las actividades prácticas de cualquier trabajo al microscopio, aquel personal que no lo utiliza de rutina, debe familiarizarse con sus diferentes partes y un enfoque adecuado (**Figura 1, página 119**).

O - Oculares	De- Diafragma del condensador
Ob- Objetivos	Dp- Diafragma de campo o apertura
C - Condensador	Te - Tornillo de condensador
P - Platina	Ma- Enfoque grueso (macro)
Lb - Lente basculante	Mi - Enfoque fino (micro)
E - Botón de encendido	

Siéntese en forma confortable frente a su microscopio. Retire el protector plástico, dóblelo y guárdelo.

Si el microscopio tiene polvo, limpie su exterior con una toalla de papel o un pedazo de gasa, sin tocar las lentes. Después limpie las lentes con papel para lentes, usando movimientos suaves y circulares. Ahora proceda a enfocar correctamente:

ENFOQUE INTERPUPILAR:

El espacio entre los ojos es variable para cada persona. Necesita ajustar los oculares a su distancia interpupilar, para ver por los 2 oculares un solo campo luminoso. Encienda el microscopio a una intensidad confortable. Ahora mire por los oculares. Verá un campo luminoso con el ojo izquierdo y otro con el ojo derecho. Para lograr la distancia interpupilar correcta continúe viendo el campo a través de un ocular mientras acerca o separa los oculares, ya sea usando la rosca entre ambos o tomando los oculares con ambas manos y presionando para juntarlos o separarlos. Cuando la imagen del ojo izquierdo y la imagen del ojo derecho se fusionan o juntan y se ve un solo campo luminoso con ambos ojos, habrá encontrado su distancia correcta.

ENFOQUE OCULAR:

El siguiente paso es el de ajustar los oculares a cada ojo. Si no hace esto, nunca verá una imagen nítida. Enfoque la preparación con el micrométrico lo más claro que pueda, viendo con ambos ojos. Ahora coloque una tarjeta enfrente del ojo izquierdo y vuelva a enfocar lo más claro que pueda, haciendo girar suavemente la rosca micrométrica o la micrométrica. Cuando logre esto, coloque la tarjeta cubriendo el ojo derecho. Al hacer esto, ya no toque ni el macro ni el microenfoque. Para enfocar la imagen, mueva la rosca del ocular izquierdo hacia un lado u otro hasta que vea nítidamente el objeto enfocado. Ahora los oculares ya están ajustados a cada ojo, asegurando así una observación clara y que la vista no se canse ni se esfuerce.

ILUMINACIÓN (Figura 2, página 120);

Una buena iluminación es aquella que ofrece el mejor contraste. Para lograr esto es necesario familiarizarse con los siguientes pasos:

Encienda su microscopio. Abra a su máxima apertura el diafragma de apertura y el del condensador.

Coloque una lámina en la platina o deje la que ya tenía. Ajuste la luz a una intensidad confortable y enfoque.

Viendo por los oculares, disminuya la apertura del diafragma de apertura hasta una pequeña luz. Si esta luz se ve a los lados, arriba o abajo, como lo muestra la **Figura 2a**, quiere decir que el condensador no está centrado. Usando ambos tornillos del condensador, desvuelva despacio y alternativamente, hasta colocar la luz en el centro del campo.

Abra ahora despacio el diafragma de apertura hasta que apenas desaparezca del campo visual.

Ahora se debe ajustar el diafragma del condensador. Para ello saque con cuidado el ocular izquierdo, vea a través del orificio y observe la imagen que se forma al cerrar despacio el diafragma del condensador. Debe obtener una imagen como lo muestra la **Figura 2b**, que es una apertura ideal, que no ocasiona difracción y da una imagen clara y de buen contraste. Vuelva a colocar el ocular izquierdo en su lugar. Ya puede trabajar con su microscopio, alineado y debidamente iluminado.

ESTIMACIÓN DE TAMAÑO:

El tamaño es una característica importante de todas las criaturas vivientes. De allí que es un dato útil en la identificación de animales o plantas.

Para un trabajo exacto se usa un micrómetro calibrado; pueden, a su falta, usarse otros criterios, comparando estructuras de medidas conocidas como glóbulos rojos humanos. Estos miden de 6-7 μm de modo que nos da una idea aproximada de tamaño. Por falta de un micrómetro calibrado, se dispone de oculares que poseen un puntero. Se puede conocer la medida de este puntero, aunque el resultado será una medida aproximada. A medida que usted trabaje procure desarrollar un sentido de tamaño.

CALIBRACIÓN DEL OCULAR MICROMÉTRICO (FIGURA 3, página 120):

Para identificar parásitos correctamente, el microscopista debe ser capaz de medir exactamente los elementos parasitarios, de allí que se hace indispensable el uso de un ocular calibrado.

Los oculares micrométricos son discos de vidrio, baratos, sobre los cuales se ha rayado una escala dividida en unidades de 50 a 100. Estas divisiones tendrán medidas diferentes dependiendo de los objetivos utilizados, por lo que es necesario calcular los valores de las unidades del ocular micrométrico con cada objetivo. Esto se logra sobre imponiendo la escala del ocular a la escala grabada sobre un porta-objetos, la cual sí está grabada con una escala de medidas conocidas, en divisiones de 0.1 y 0.01 mm. Una vez que cada objetivo ha sido calibrado, ni el ocular con el disco micrométrico ni los objetivos pueden ser intercambiados con otros oculares u objetivos. Si es necesario cambiarlos, debe calibrar de nuevo.

PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN:

1. Desatornille la lente por arriba o por abajo del ocular, dependiendo de su manufactura y coloque el disco micrometrado sobre el diafragma. Reponga la lente e inserte el ocular en su lugar. Debe usar papel lente para limpiar el disco y las lentes del ocular.
2. Coloque el porta-objetos calibrado sobre la platina del microscopio y enfoque la escala. Es más fácil iniciar la calibración de los objetivos de menor aumento primero y luego continuar con los demás.
3. Enfoque el micrómetro para ver claramente las líneas grabadas y que pueda distinguir las divisiones de 0.1 y de 0.01 mm.
4. La línea 0 del ocular micrometrado debe coincidir con el 0 del porta-objetos milimetrado.
5. Cuando estas dos líneas están sobre impuestas, sin mover la platina, mire hacia la derecha de los ceros y determine cuándo puede verse nuevas líneas sobre impuestas entre sí. Procure encontrarlas lo más alejado hacia la derecha; ésta distancia va a variar según el objetivo utilizado. A una mayor magnificación, el grosor de las líneas grabadas va a resultar tan grande, que cuando se impongan las líneas podrá hacerlo ya sea hacia la izquierda o hacia la derecha de las líneas individuales.
6. Cunte el número de divisiones en el ocular que hay entre el 0 y las nuevas líneas sobre impuestas. Entonces, en el porta-objetos grabado, cuente el número de divisiones de 0.1 mm que hay entre el 0 y las nuevas líneas sobre impuestas a la derecha.
7. Calcule la porción de un milímetro que se mide con una unidad ocular, según lo ilustrado en el siguiente ejemplo:

$$\begin{array}{rcl}
 33 \text{ unidades del ocular} & = & 0.22 \text{ mm} \\
 1 \text{ unidad del ocular} & - & \frac{0.22 \text{ mm}}{33} = 0.0066 \text{ mm} \\
 & = & 0.0066 \text{ mm} \times \frac{1000 \text{ mm}}{1000 \text{ mm}} \\
 & & = 6.6 \text{ } \mu\text{m}
 \end{array}$$

1 unidad del ocular = 6.6 μm (para ese objetivo determinado)

Cada objetivo del microscopio debe ser calibrado separadamente.

8. Cuando la calibración ha sido completada con todos los objetivos, prepare una tabla sencilla que muestre los valores para cada uno de los objetivos. Se ofrece un ejemplo:

TABLA DE CALIBRACIÓN			
	Unidad	Valores por objetivo	
	10X	40X	100X
1	6.6	2.4	1
2	13.2	4.8	2
3	19.8	7.2	3
4	26.4	9.6	4
Etc.			

CUIDADOS DEL MICROSCOPIO:

1. Procure dejar su microscopio en un mismo sitio. En general, debe evitarse en lo más posible el transporte diario o constante de cualquier aparato.
2. Cuando no esté en uso, mantenga el microscopio cubierto y protegido del polvo. No toque el instrumento con manos sucias o grasosas.
3. Economice la vida de la lámpara, asegurándose de ejecutar la iluminación correcta tal como se le ha enseñado. Si el diafragma del condensador está cerrado, ya podrá darle toda la intensidad a la lámpara, gastándola innecesariamente, que no logrará mejor iluminación. Si no hace contraste, tampoco verá nada.
4. No permita que líquidos, ácidos o aceites ensucien el microscopio.
5. Nunca utilice lentes de mayor aumento sin cubrir la preparación con un cubre objetos.
6. Nunca deje el objetivo de inmersión lleno de aceite. Use papel de lente, con movimientos suaves y circulares para limpiarlo luego de usarlo.
7. Si falta uno o varios objetivos, tape inmediatamente el agujero con un tapón de rosca especial para ello o con esparadrapo si no hay otra cosa.
8. Muchos recomiendan xilol para limpiar las lentes mal cuidadas, con aceite o sucio resecado sobre ellas. Es preferible, sin embargo, usar un poco de éter en vez de xilol para evitar despegar las lentes ya que el xilol es disolvente de pegamento. Utilice un aplicador con algodón en la punta humedecido en éter. Páselo por las lentes grasosas y limpie inmediatamente con papel de lentes limpio.

REFERENCIAS:

El inciso sobre calibración fue traducido literalmente de:

Ash L y Orihel TC. **Parasites: aguide laboratory procedures and identification**. ASCP PRESS, American

**PARÁSITOS INTESTINALES
LUMINALES Y TISULARES**

PRODUCTO DE REPRODUCCIÓN DE DIFERENTES PARÁSITOS INTESTINALES, HEPÁTICOS, PULMONARES y SANGUÍNEOS: HUEVOS, LARVAS, QUISTES, TROFOZOITOS, OOQUISTES. CUENTA DE HUEVOS DE GEOHELMINTOS.

EXAMEN DIRECTO EN SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA Y EN SOLUCIÓN DE LUGOL

PROPÓSITO:

- a) en solución salina fisiológica
Reconocer trofozoítos de protozoos y otros estadios de diagnóstico de helmintos y protozoos y elementos que aparecen en situaciones anormales. El mejor método para detectar trofozoítos en una amebiasis invasora por *Entamoeba histolytica*. Para ejecutar cuenta de huevos de algunos helmintos para estimar intensidad de la infección.
- b) en solución de Lugol
Colorear en forma temporal trofozoítos y quistes de protozoos. Inmovilizar larvas.

MUESTRA REQUERIDA:

Heces frescas recolectadas en un frasco de vidrio, plástico o de cartón, de boca ancha, con tapadera y correctamente etiquetado con la identificación del paciente.

CUANDO LA MUESTRA ES DIARREICA O LÍQUIDA:

Debe tomarse una muestra del fondo del frasco, o centrifugar una porción y examinar el sedimento. Si la muestra contiene moco, hacer otra preparación tomando muestra del moco.

Cuando la muestra contiene moco con o sin sangre, tomar de este moco para hacer otra preparación, ya que aquí podrían encontrarse los elementos patógenos en mayor cantidad. Ejemplo: larvas de *S. stercoralis*, trofozoítos o quistes de *G. lamblia*, ooquistes de *apicomplexa intestinales*, trofozoítos de *f. histolytica hematófaga* en caso de disentería, trofozoítos y quistes de *Balantidium coli*, huevos de *T. trichiura* atrapados en el moco.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Solución salina fisiológica

Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000 mL

Mezclar y guardar en frasco rotulado y tapado. Para usar dispensar en frascos goteros rotulados.

Solución de Lugol. Solución madre

Iodo en cristales	2.5 g
Ioduro de potasio	5.0 g
Agua destilada	50 mL

Mezclar en un matraz hasta disolución completa de los cristales. Guardar en frasco oscuro rotulado «solución madre (o stock) de Lugol». Para utilizar, diluir 0.5 mL de esta solución stock en 5.0 mL de agua destilada y mantener en frasco gotero color ámbar rotulado.

MATERIALES:

- Porta-objetos, 7.5 X 2.5 cm (3 X 2 pulgadas) limpio y seco
- Cubre-objetos, 22 X 22 mm, N° 1 ó N° 2
- Aplicadores de madera
- Solución salina fisiológica (0.85% cloruro de sodio)
- Solución de Lugol
- Frasco con desinfectante para descartar material (clorox, fenol, lugol)

PROCEDIMIENTO:

Identificar el porta-objetos con la muestra a examinar.

Colocar 1-2 gotas de solución salina en un extremo del porta-objetos y 1-2 gotas de Lugol en el otro extremo.

Con un aplicador tomar una muestra de heces y hacer una emulsión uniforme, primero en la gota de solución salina, y luego en la solución de Lugol. Calcular más o menos 1.5-2 mg de heces.

Cubrir cada preparación con un cubre-objetos.

Observar, primero con el objetivo de 10 X, en forma sistemática toda la preparación en solución salina. Para confirmar estructuras, usar objetivo 40 X. Anotar hallazgos. Regresar a 10 X y continuar el examen hasta terminar.

Proceder de igual manera con la preparación en solución de Lugol, buscando quistes de protozoos para su identificación, la cual debe hacer con objetivo 100 X. Para ello colocar una gota pequeña de aceite de inmersión sobre el cubre-objetos y observar con el objetivo correspondiente.

Informar otras estructuras, cuando estén presentes, ya que indican alguna patología: leucocitos, eritrocitos, macrófagos, cristales de Charcot-Leyden.

Ejecutar cuenta de huevos de: ***Ascaris lumbricoides***, ***Trichuris trichiura*** o *Uncinaria* cuando amerite e informar el número de cada especie por separado indicando que la cuenta es en 2 mg de heces.

Las larvas requieren diferenciación específica: ***Strongyloides stercoralis***: primordio genital grande, cápsula bucal corta.

Huevos de ***Paragonimus*** sp. por infección pulmonar son operculados de color café y miden 80-118 μm x 48-60 μm . No embrionados. Se recolectan también de esputo y aspirado pleural.

Huevos de ***Fasciola hepática***, son también operculados, miden 130-150 μm x 63-90 μm . No embrionados. En infección espuria los huevos desaparecen de las heces en pocos días.

Huevos de *Schistosoma mansoni*, miden 120 x 45 µm, hasta 170 x 65 µm y tienen una espina grande lateral cerca de un extremo.

Ooquistes de *Cydospora cayetanensis*, deben ser redondos, refringentes, con una masa interna bien organizada, miden entre 8 y 10 µm.

Ooquistes de *Isospora belli*, tienen forma alargada, cascara fina, transparente y miden entre 20 y 30 µm por 10-13 µm. Contienen un esporoblasto en el interior del ooquiste.

Ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, miden 4-6 µm, redondos, con un granulo brillante u oscuro en el interior, visibles pero no fácilmente identificables. Es necesario colorearlos por ácido-resistente modificado y diferenciarlos de otras estructuras.

Descartar materiales usados en el frasco con desinfectante.

CAUSAS DE ERROR O RESULTADOS POCO SATISFACTORIOS:

Esperar más de una hora antes de buscar trofozoítos de protozoos

Preparación muy gruesa o muy fina

Demasiada fibra, arenilla, burbujas

Demasiada iluminación, poca iluminación

Solución de Lugol muy fuerte o muy diluida

No examinar la preparación en forma sistemática

Preparación reseca

Informe incompleto

El no encontrar trofozoítos en una muestra líquida, diarreica o con moco y sangre que no es fresca, no tiene ningún significado.

PARA ASEGURAR UN CONTROL DE CALIDAD:

Verificar que la solución salina esté limpia, sin contaminación de bacterias, hongos o protozoos de vida libre.

Verificar que la solución de Lugol tenga la concentración adecuada.

REFERENCIA:

Proctor E. Laboratory diagnosis of amebiasis. In: Clinics in Laboratory Medicine, volume 11, No. 4, 1991. Yezid Gutiérrez and Maurice D, Little, Guest Editors W.B. Saunders Co. Philadelphia.

Gonzales Ruiz A, Haque R, Aguirre A, Castañon G, Hall A, Guhl F, Ruiz Palacios G, Miles MA and Warhurst DC. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. Journal of Clinical Pathology 1994,47:236-239.

ESTIMADO DE LA INTENSIDAD DE INFECCIÓN

CUENTA DE HUEVOS DE NEMÁTODOS TRANSMITIDOS POR EL SUELO.

PROPÓSITO:

Estimar la intensidad de una infección intestinal por *Ascarís lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y uncinarias del humano en forma práctica, en una cantidad conocida de heces. Evaluar la efectividad de tratamiento terapéutico. Se asume que la producción de huevos estará en relación directa con el número de hembras fecundas que deponen huevos. Una variable importante es el propósito para determinar esta intensidad: puede ser clínica, para encuestas, evaluar terapéutica, etc.

MÉTODOS:

Los más utilizados son tres (3):

1. **MÉTODO DIRECTO**, en frote (2 mg) de heces;
2. **MÉTODO DE CONCENTRACIÓN POR KATO, variación KATZ**, en 41.7 mg de heces;
3. **CUENTA DIRECTO DE GUSANOS ADULTOS EXPULSADOS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO**, el cual es más preciso si el tratamiento es efectivo y si se cumplen las instrucciones.

MÉTODO DE DILUCIÓN DE STOLL, en 1 g de heces; no se ha estandarizado y ya no se usa.

INTERPRETACIÓN DE DATOS DE CUENTA DE HUEVOS:

Estimados de intensidad de infecciones son muy variables y dependerán de: edad del individuo, estado nutricional y dieta del individuo parasitado, duración de la infección, número de gusanos, especie de uncinaria, presencia de otros parásitos, fibra, grasas, moco; proficiencia técnica del examinador, interés. Para fines clínicos: cualquier tipo de infección por *Ascarís* debe tratarse; infecciones por *Trichuris* y *Necator* con cuentas de 5 huevos/2 mg de heces o menos no tienen importancia clínica (leves); una cuenta de 5 huevos/2 mg para *Ancylostoma* ya podría ser importante clínicamente; cuentas de más de 25 huevos/2 mg ó 2,500 huevos/ca g para *Necator* y 40 huevos/2 mg ó 20,000 huevos/ca g para *Trichuris* (severas) producen síntomas clínicos importantes. Entre las leves y las severas están las infecciones moderadas, que se tratan. La tendencia actual es tratar todas las infecciones.

Interpretación de cuentas de huevos de Geohelminfos según métodos de laboratorio. Umbrales de intensidad para la clasificación de la infección de nematodos transmitidos por el suelo (NTS) o Geohelminfos y especies de *Schistosoma*, método de Kato-Katz-huevos por gramo de heces.

Especie	Intensidad leve	Intensidad moderada	Intensidad grande
<i>A. lumbricoides</i>	1 -4,999 hpg	5,000-49,999 hpg	> 50,000 hpg
<i>T. trichiura</i>	1-999 hpg	1,000-9,999 hpg	> 10,000 hpg
Uncinarias*	1-1,999 hpg	2,000-3,999 hpg	>4,000 hpg
<i>S.mansoni</i>	1-99 hpg	100-399 hpg	>400 hpg
<i>S. japonicum</i>			

* Depende de la especie de Uncinaria del humano

hpg= huevos por gramo de heces

1. METODO DIRECTO en Frote de heces

PRINCIPIO:

Este método es una simplificación del método estándar de Beaver en 2 mg de heces en el que se utiliza una célula foto-eléctrica adaptada y calibrada que mide con precisión 2 mg de heces en una preparación en solución salina. La simplificación deriva del conocimiento que las preparaciones directas que se utilizan en la rutina para el examen de heces contienen entre 1.5 mg y 2.5 mg especialmente las preparadas por técnicos con experiencia.

MUESTRA REQUERIDA:

Heces frescas, recolectadas en frasco (vidrio, plástico o cartón) limpio, de boca ancha, sin contaminación de agua, orina, tierra etc.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Solución salina fisiológica	
Cloruro de sodio	0.85 g.
Agua destilada	100 mL

Mezclar hasta disolución completa de los cristales. Guardar en frasco rotulado. Para uso diario mantener en frasco gotero rotulado.

MATERIALES:

- Porta-objetos de 3 X 1 pulgada (7,5 x 2.5 cm) ó 3 X 2 pulgadas {7.5 x 5cm)
- Cubre-objetos de 22 X 22 mm, #1 ó #2
- Aplicadores de madera
- Solución salina fisiológica (0.85%)
- Marcador
- Contador manual
- Frasco con solución desinfectante para descartar material

PROCEDIMIENTO:

- Identificar el porta-objetos con la muestra de heces a examinar
- Colocar 1 - 2 gotas de solución salina en cada extremo del porta-objetos
- Con un aplicador, tomar una porción de heces y emulsificaren cada una de las gotas de solución salina
- Cubrir cada preparación con un cubre-objetos
- Contar en forma individual los huevos según la especie: **de Ascaris, Trichuris** y/o uncinaria presentes en cada preparación. Sacar la media

Informar por especie de parásito: No. de huevos/frote de heces o bien No. de huevos/
2 mg de heces

Descartar material usado en el frasco con desinfectante.

Causas de error:

Preparación muy gruesa o muy fina

Observación no sistemática de la preparación

Falta de práctica en ejecutar conteos

Huevos no distribuidos al azar en la preparación, o aglomerados por la presencia de mucho moco

Heces líquidas

REFERENCIAS:

Beaver, PC. The standarization of fecal smears for estimating egg production and worm burden. Journal of Parasitology 1950, 36:451-456.

Beaver, PC. Quantitative hookworm diagnosis by direct smear. Journal of Parasitology 1949,35:125-135.

2. MÉTODO DE KATO (VARIACIÓN KATZ), en 41.7 mg de heces

PRINCIPIO:

Aclarar con glicerina un frote grueso de heces no diluidas. El método, originalmente introducido por japoneses para hacer encuestas epidemiológicas de schistosomiasis, ha sido mejorado y modificado varias veces.

La variación KATZ entrega una cantidad conocida de heces, que depende del tamaño del templete utilizado, con la condición que sean heces formadas. El tamaño del templete varia; para asegurar resultados comparables, el templete debe estandarizarse en el país a una sola medida. El que se describe aquí entrega 41.7 mg de heces. Huevos de *Taenia* sp o de *Hymenolepis nana* se informan sin contar. La Organización Mundial de la Salud considera este método como el de elección y el más adecuado en encuestas, monitoreo y evaluación de programas de control de nemátodos transmitidos por el suelo y schistosomiasis.

VENTAJAS:

Las heces no se diluyen, se utiliza materiales baratos y accesibles, puede transportarse una vez preparado en el campo, puede guardarse varios meses para verificar resultados, puede estandarizarse para encuestas en diferentes regiones geográficas por diferentes investigadores.

DESVENTAJAS:

Tiene varias limitantes: sólo puede utilizar heces frescas; no es adecuada para heces diarreicas, líquidas o mucoides; no se aplica para la detección de protozoos ni larvas de nemátodos; huevos frágiles como los de uncinaria y a menudo de *Hymenolepis nana* se vuelven irreconocibles en pocas horas; no es indicado para heces que contengan mucha fibra o grasa.

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE GLICERINA Y AGUA:

Glicerina pura	100 mL
Agua destilada	100 mL
Verde de malaquita al 3%	1 mL
(Solución acuosa)	

Mezclar bien en frasco de boca ancha con tapadera e introducir los cuadrados de celofán para sumergir en esta solución 24 horas o más antes de usar. (El verde de malaquita no es indispensable en caso que no se cuente con él).

Un templete de 9 mm X 1 mm entrega 50 mg de heces. El factor de multiplicación para determinar huevos por gramo será de 20.

Un templete de 6 mm de diámetro X 1.5 mm de grosor entrega 41.7 mg de heces. El factor de multiplicación será de 24.

MATERIALES:*

Cuadrados de celofán que miden 22 X 30 mm. Sumergir durante 24 horas o más en la solución de glicerina

Espátulas plásticas de madera o palos de paletas o de helados

Templete de plástico del tamaño seleccionado, en este caso de 6 mm de diámetro X 1.5 mm de grosor

Cuadrados de 4 cm X lado de tela metálica o nylon de trama 210 o de nitrel de 250/mi

Papel absorbente

Papel de periódico

Pinzas

Frasco con desinfectante para descartar material

Porta-objetos 7.2 x 2.5 cm (3 X 1 pulgada) ó 7.5 x 5 cm (3 X 2 pulgadas)

Marcador

Baja-lenguas o palo de paleta o de helados, que es más barato

Contador manual

PROCEDIMIENTO:

Extender el papel periódico o de estraza sobre la mesa de trabajo

Identificar el porta-objetos con la muestra a examinar. Colocar sobre éste el templete de plástico

Con el palo de paleta tomar una cantidad de heces y colocarla sobre una superficie plana (tapadera del frasco, papel periódico)

Colocar sobre estas heces un cuadrado de tela metálica, plástica o nylon que hace las veces de colador

Raspar la superficie de la tela con el espátula plástica tomando suficientes heces coladas para llenar el agujero del templete. Descartar el espátula si es de madera (Figura 4 a, b, y c, pag. 121)

Remover el templete, descartar éste y la tela en desinfectante y cubrir el redondel de heces con un cuadrado de celofán empapado en glicerina

Invertir el porta-objetos con esta preparación sobre una hoja de papel absorbente y hacer presión con el pulgar hasta extender las heces por todo el cuadrado (Figura 4 d, e, pag. 121)

Darle vuelta y colocar sobre una superficie protegida de insectos (mosca, cucaracha) y agua. Esperar que aclare. Esto dependerá de la temperatura y humedad del ambiente, entre 30 min y 45 min. Si se desea interrumpir el aclaramiento, invertirla lámina sobre una superficie plana lo necesario hasta continuar el proceso (Figura 4 f, pag. 121)

Observar al microscopio óptico con objetivo de 10 X. Contar sistemáticamente y en forma individual todos los huevos de ***Ascaris***, ***Trichuris***, uncinaria en toda la preparación

Multiplicar el resultado por 24 e informar «No. de huevos/gramo de heces». Descartar material usado en desinfectante

Los huevos de ***Taenia*** se confirmarán si se observan los ganchos de la oncósfera con objetivo X40

REFERENCIAS:

Martin LK, Beaver PC. Evaluation of Kato thick-smear technique for quantitative diagnosis of helminth infections. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1978, 17: 382-391

Montresor A, Crompton DWT, Hall A, Bundy DAP, and Savioli L. Guidelines for the evaluation of soiltransmitted helminthiasis and schistosomiasis at the community level, WHO 1998, Geneva, Switzerland.

3. RECOBRAR Y CONTAR PARÁSITOS ADULTOS EXPULSADOS DESPUÉS DE TRATAMIENTO

PRINCIPIO:

Recobrar los gusanos adultos, hembras y machos presentes en una infección intestinal para determinar la intensidad de la infección, o para comprobar la efectividad de un antihelmíntico. Se requiere la colaboración fiel del (los) participante(s) durante todo el tiempo que dure la recolección y contar con un antihelmíntico efectivo.

PROCEDIMIENTO:

Informar al personal (de hospital si es clínico; al voluntario si es de encuestas) para que colecte heces de 24 horas durante 4-5 días después de iniciado el tratamiento. La forma de hacerlo dependerá de los recursos e ingenio de cada investigador.

Lavar diariamente y por separado las heces de 24 horas recogidas en bolsas plásticas con el nombre de cada individuo, utilizando pascones o un tamiz y bandejas esmeriladas o de acero inoxidable y recobrar los parásitos de este lavado. Ayudarse con pinceles finos para recoger los parásitos más pequeños.

En caso de *Ascaris lumbricoides*;

Medirlos, secarlos y pesarlos (opcional); fijarlos con formalina caliente al 5%, en frascos apropiados.

En caso de *Trichuris trichiura* y *uncinarias*:

Contarlos y separarlos por sexo si se desea y fijarlos. Beaver et al comentan que gusanos pequeños se estiran en ácido acético glacial, se lavan y se fijan, guardándolos en alcohol etílico al 70% con 5% de glicerol. Otro fijador que da buenos resultados para todo tipo de gusanos es una mezcla a partes iguales de formalina al 10% y alcohol etílico de 95%, al que se agrega 5% de ácido acético (5 partes de ácido acético y 95 partes de formalina-alcohol).

En situación de campo, los datos iniciales del estimado de la intensidad de la infección por cuenta de huevos más la cuenta de adultos proveerá datos epidemiológicos más correctos que documenten la relación entre la cuenta de huevos y el número de gusanos adultos. Esta carga parasitaria variará según las diferentes regiones del país, las distintas condiciones epidemiológicas y condiciones de la población.

REFERENCIA:

Beaver PC, Jung RC, and Cupp E. Clinical Parasitology. 9th edition, Lea and Febiger, 1985.

Kaminsky R. Morfología comparada entre *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* de casos hondureños. Ciencia y Tecnología 1999,5: 38-44.

MÉTODO DE DILUCIÓN DE STOLL**PRINCIPIO:**

La cantidad de heces es medida por desplazamiento; al final del proceso se cuentan los huevos en una alícuota de la dilución. El diluyente, hidróxido de sodio, saponifica la grasa de las heces y ayuda a liberar los huevos de impurezas.

La mayor desventaja es el equipo que requiere y el tiempo de preparación. Impráctico en encuestas. No se ha estandarizado y ha caído en desuso.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:**Hidróxido de sodio**

Hidróxido de sodio	4 g
Agua destilada	1,000 mL

Disolver inicialmente el hidróxido de sodio en un volumen pequeño del agua destilada. Completar después a 1,000 mL. Guardar en frasco tapado y rotulado.

MATERIALES:

Frasco de Stoll, marcado 2 veces: a 56 mL de volumen y a 60 mL de volumen; en su defecto, probeta graduada con tapón de hule, que tenga las dos marcas, a 56 mL y a 60 mL.

Solución de hidróxido de sodio

Pipetas graduadas a 0.15 mL (dispensador automático para serología)

Porta-objetos 7.5 X 2.5 cm ó 7.5 X 5 cm

Cubre-objetos 22 X 40 mm

Aplicadores de madera

Frascos con desinfectante para descartar material

Perlas de vidrio

Contador manual

Marcador

Frascos con desinfectante para descartar material sucio.

PROCEDIMIENTO:

Identificar el frasco de Stoll con la muestra a examinar

Añadir hidróxido de sodio hasta la marca 56 mL en el frasco para ello

Con cuidado agregar heces hasta subir el nivel del líquido a la marca 60 mL

Agregar las perlas de vidrio, tapar y agitar vigorosamente. Si las heces son muy duras, deberá dejarse 24 horas agitando esporádicamente

CUENTA DE HUEVOS DE NEMÁTODOS TRASMITIDOS POR EL SUELO

Con la pipeta Stoll remover 0.15 mL del centro de la suspensión inmediatamente después de agitar y antes que los huevos comiencen a sedimentarse

Colocar ésta suspensión sobre un porta-objetos y cubrir con un cubre-objetos

Contar todos los huevos presentes en toda la preparación. Multiplicar el resultado por 100 y reportar No. de huevos/g o No. de huevos/ mi de heces, sin factor de corrección

Para reportar con factor de corrección, debe considerarse la consistencia de las heces y multiplicar por 2 para heces blandas; por 3 para heces diarreicas. Cuentas en heces líquidas no son confiables.

REFERENCIAS:

Stoll NR, Hausheer WC. Concerning two options in dilution egg counting; small drop and displacement. American Journal of Hygiene 1926, 6: (suppl) 134-145.

HUEVOS DE *TAENIA* SP Y DE *ENTEROBIUS VERMICULARIS*

MÉTODO DE LA CINTA TRANSPARENTE ADHESIVA

PROPÓSITO:

Recobrar huevos de *Taenia* sp. o de *Enterobius vermicularis* de la región anal y perianal de individuos infectados. Hembras de *E. vermicularis* migran del ciego e intestino grueso a la región exterior del ano, adonde depositan huevos casi infectantes, razón por la cual casi nunca se ven en las heces. Los proglótidos grávidos de *Taenia saginata* y a veces de *T. solium* que se desprenden de la estróbila y forzan el esfínter anal, dejan rastros de huevos en la región perianal mientras tienen movimientos de extensión o retracción. Para diagnosticar infecciones por *E. vermicularis*, la cinta transparente adhesiva es el método indicado; para identificar individuos infectados con *Taenia* sp. este método, en combinación con otros métodos y la observación clínica, aumenta la probabilidad de diagnóstico (**Figura 5, pág. 122**).

PREPARACIÓN DEL PACIENTE:

La toma de esta muestra es fácil de realizar aún por personas de poca preparación o analfabetas, siempre que se provea una explicación clara y sencilla. Para este o cualquier otro método que se utilice, la muestra debe tomarse antes que el paciente se lave, bañe o defaque, durante la noche o inmediatamente al levantarse por la mañana (*E. vermicularis*) o en cualquier momento (*Taenia*) antes del examen.

NOTA: En ocasiones se pueden ver los gusanos adultos al separar los glúteos o sobre las heces al defecar. Si esto sucede, deberán llevarse al laboratorio para la confirmación morfológica. Como instrucción a la madre, se le indica de recogerlos y colocarlos en alcohol o vinagre en un bote limpio y llevarlos al laboratorio.

MATERIALES:

- Porta-objetos de 7.5 X 2.5 cm
- Baja-lenguas o palo de paleta
- Cinta transparente adhesiva de 2 cm de ancho
- Xilol
- Etiquetas
- Pipeta Pasteur y bulbo o perilla de goma
- Frasco con desinfectante para descartar material

PROCEDIMIENTO:

- Colocar una tira de cinta transparente adhesiva sobre un porta-objetos limpio y seco, dejando un extremo doblado por debajo de la lámina y en el otro pegar una etiqueta y escribir la identificación del paciente (Figura 5 a, pág. 122).
- Al momento de tomar la muestra, pelar la cinta suavemente del porta-objetos, tomándola por la parte etiquetada.
- Colocar el porta-objetos sobre un baja-lenguas o palo de paleta y doblar la cinta sobre un extremo de éste, con la parte adhesiva hacia fuera (Figura 5 b).
- Con el paciente en decúbito, apartar los glúteos con una mano y apretar la cinta adhesiva firmemente a un lado y otro de los pliegues perianales (Figura 5 c).
- Volver a colocar la cinta sobre el porta-objetos y descartar el baja-lenguas (Figura 5 d). La muestra puede transportarse o guardarse protegida, hasta el momento del examen.
- Para examinar, desprender la cinta transparente hasta la parte expuesta (Figura 5 e), agregar 1-2 gotas de xilol a la lámina y apretar de nuevo la cinta en su lugar. El xilol (puede ser tolueno) aclara la preparación, elimina las burbujas de aire y hace más visibles los huevos. Examinar inmediatamente al microscopio.

CARACTERÍSTICAS DE LOS HUEVOS DE TAENIA Y DE ENTEROBIUS VERMICULARIS:

Los huevos de *Taenia* se reconocen por su forma redonda, de igual tamaño (31 a 43 μm), pero se ven café, densos y en unos pocos ejemplares se pueden visualizar los ganchos de la oncósfera. Utilizar mayor aumento para ver detalles.

Los huevos de *Enterobius vermicularis* se observan de cáscara transparente, alargados u ovoides, con un lado más aplanado; tienen un embrión en su interior y miden entre 50-60 μm por 20-30 μm .

REFERENCIAS:

Beaver, DC. Methods for pinworm diagnosis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1949,29:577-587.

Kaminsky, RG Taeniasis-cysticercosis in Honduras. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1991,85:531-534.

QUISTES DE PROTOZOOS Y HUEVOS DE HELMINTOS

MÉTODO DE FLOTACIÓN POR SULFATO DE ZINC

PROPÓSITO:

Concentrar huevos de ciertos helmintos y quistes de protozoos cuando las infecciones son muy leves y no se detectan en preparaciones directas.

MUESTRA REQUERIDA:

Heces frescas recolectadas en frasco {vidrio, plástico o cartón) de boca ancha, con tapadera, limpio, sin contaminantes (agua del inodoro, orina, tierra etc.) debidamente identificado.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO:

Disolver 330 g de cristales de sulfato de zinc en 670 mL de agua destilada.

Para verificar la densidad, verter dentro de un cilindro de 1,000 mL de capacidad e introducir el hidrómetro, dejándolo flotar libremente, sin tocar las paredes del cilindro. Debe leerse 1.18. Agregar más agua si está más denso, o más cristales si está menos denso. Se recomienda verificar la densidad cada vez antes de usar o una vez por semana. Cuando la muestra de heces fue fijada, usar una solución con densidad 1.20.

EJERCER PRECAUCIÓN PARA NO QUEBRAR EL HIDRÓMETRO

MATERIALES:

Hidrómetro (Curtis Matheson Scientific Inc) para medir gravedad específica, rango 1,000-2,000)

Solución de sulfato de zinc, densidad 1.18 (para heces frescas)

Cuadrados de gasa de 16 X 16 cm, en 2 dobleces

Embudos de 5 cm de diámetro

Aplicadores

Tubos de ensayo, vasos de papel o vasos plásticos pequeños para hacer una suspensión de heces

Porta objetos, 7.5 x 2.5 cm (3 X 1 pulgada) ó 7.5 x 5 cm (3 X 2 pulgadas)

Cubre-objetos 22 X 22 mm, No. 1 ó No. 2

Solución de Lugol

Asa bacteriológica de 5-7 mm de diámetro

Gradilla para tubos

Solución salina fisiológica

PROCEDIMIENTO:

Identificar la muestra con el vaso y el tubo de ensayo a trabajar.

Con un aplicador, tomar 1-1.5 g de heces y hacer una suspensión en unos pocos ml_ de agua destilada* en un vaso o tubo.

Filtrar a través de gasa humedecida a un tubo de ensayo.

Centrifugar a 1,500-2,000 rpm por 2 minutos. Descartar el sobrenadante.

Agregar 2-3 mL de solución de sulfato de zinc y agitar con un aplicador hasta suspender totalmente el sedimento. Agregar más solución de sulfato de zinc hasta 1 cm abajo del borde del tubo de ensayo, sin dejar de agitar.

Centrifugar a 2,000 por 2 minutos. Los tubos deben tener posición vertical en la centrifuga, no inclinada.

Sin sacar el tubo de la centrifuga, remover varias asadas de la película superficial y colocarlas sobre un porta-objetos. Esterilizar el asa por flameo. (**Figura 5**, Pág. 123)

Cubrir con un cubre-objetos. Examinar sistemáticamente la preparación. Para colorear los quistes, remover con cuidado el cubre-objetos y añadir una gota pequeña de Lugol.

Para identificar los quistes se procede a examinarlos con el objetivo X100, para lo cual debe colocarse antes una pequeña gota de aceite sobre el cubre-objetos.

Puede ejecutarse este método cuando se reciben heces fijadas, para lo cual la solución de sulfato de zinc debe tener una densidad de 1.20. Para trabajar la muestra, mezclar bien las heces fijadas, filtrar si necesario y continuar con el procedimiento como se ha descrito.

CAUSAS DE ERROR O RESULTADOS POCO SATISFATORIOS:

- En general, si no se sigue el método fielmente -
Solución de sulfato de zinc de otra gravedad específica
- Esperar mucho tiempo después de preparar la muestra, antes de observarla al microscopio (más de 20 minutos)
- Deformación de los quistes de protozoos, que dificulta su identificación
- A veces no flotan los huevos infértiles *de Ascaris*
- No es el método adecuado para huevos de céstodos ni de tremátodos
Las larvas se encogen y no se puede reconocer su morfología específica

REFERENCIAS:

Bartlett, M., Harper K, Smith N, Verbanac P and Smith S. Comparative evaluation of a modified zinc sulfate flotation technique. *Journal of Clinical Microbiology* 1978, 7: 524-528.

OOQUISTES DE ISOSPORA BELLI

FLOTACIÓN POR SHEATHER

PROPÓSITO:

Separar, concentrar y recobrar ooquistes de *Isospora belli* de las heces para facilitar el diagnóstico de isosporiasis en el laboratorio. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora cayetanensis* pueden también concentrarse; sin embargo, para asegurar el diagnóstico de estas dos especies es preferible además, procesar la muestra por otros métodos (coloración, concentración por Webery medición de ooquistes). **Veralgoritmo No. 4, página 136**, para heces diarreicas y líquidas.

IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO:

El hallazgo de *Isospora belli* ha cobrado importancia desde 1983 en que se recobró de 3 homosexuales con diarrea crónica, pérdida de peso y una inmunodeficiencia severa. Aunque se le ha informado en el pasado en brotes de gastroenteritis en personas inmunonormales, cada vez más se le relaciona con estados inmuno-deficientes y SIDA.

El hallazgo de *Isospora belli* requiere informe inmediato al médico. El Servicio de Parasitología del Hospital-Escuela, Tegucigalpa, Honduras, acostumbra agregar una nota diciendo: "Investigar causa de posible inmunocompromiso".

MUESTRA REQUERIDA:

Heces frescas recolectadas en frasco {vidrio, plástico, cartón) de boca ancha, con tapadera, limpio y debidamente identificado. Aspirado duodenal.

- Heces líquidas**
- a) Tomar una muestra del fondo del frasco con una pipeta Pasteur; o
 - b) Mezclar las heces con la pipeta Pasteur y aspirar una cantidad; o
 - c) Mezclar las heces, verter 2-3 mL en un tubo de ensayo rotulado, centrifugar, descartar el sobrenadante al frasco con la muestra original de heces o en un recipiente con desinfectante y continuar trabajando con el sedimento.
- Heces con moco**
- a) Tomar una porción del moco y examinar al microscopio como frote directo; o,
 - b) Utilizar un mucolítico (10 gotas de KOH al 10%) para disolver el moco y liberar ooquistes que estuvieran atrapados. Dejar actuar el mucolítico a temperatura ambiente durante 15 minutos, agitando con unaplicador. Una vez disuelto, agregar agua destilada, mezclar, centrifugar, decantar y continuar la técnica utilizando el sedimento.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:**Solución concentrada fenolada de azúcar**

Azúcar en cristales	500 g
Agua destilada	320 mL
Fenol en cristales.	6.5 g

Disolver el azúcar en el agua destilada, usando calor sin dejar llegar a ebullición. Filtrar por gasa. Agregar el fenol y agitar hasta disolución. Guardar en frasco tapado y rotulado. Para trabajar es más fácil mantener la solución de trabajo en un frasco con dispensador.

MATERIALES:

Vasitos de plástico para preparar suspensión
Tubos de ensayo de 13 X 100 mm
Cubre-objetos 22 X 22 mm, No.1 ó No.2
Porta-objetos de 3 X 1 pulgadas (7.5 X 2.5 cm) o de 3 X 2 pulgadas (7.5 cm X 5 cm)
Asa bacteriológica, 5-7 mm de diámetro
Marcador
Aplicadores sin algodón
Gasa quirúrgica
Solución fenolada de azúcar
Mechero de gas o lámpara de alcohol
Embudo de 5 cm de diámetro
Agua destilada
Frasco con desinfectante para descartar material
Parafilm o tapón de hule para tubos de ensayo

PROCEDIMIENTO:

Identificar los tubos de ensayo con la muestra a examinar.

Hacer una suspensión de una pequeña porción de las heces (± 1 mL ó 1 g) en un vasito plástico o tubo con la ayuda de un aplicador.

Colocar gasa en 2 dobleces dentro del embudo introduciendo éste en otro tubo de ensayo rotulado y filtrar la suspensión de heces para remover fibras y partículas grandes. Tapar con parafilm o tapón de hule.

Equilibrar el tubo en balanza de 2 platos.

Centrifugar a 1,500 rpm por 2 minutos. Destapar. Decantar el sobrenadante.

Añadir un poco de solución fenolada azucarada al sedimento y agitar vigorosamente con un aplicador. Completar con más solución hasta 2 cm bajo el borde del tubo sin dejar de agitar. Tapar con parafilm o tapón de hule.

Equilibrar el tubo en balanza de 2 platos.

Centrifugara 1000 rpm durante 10 minutos.

Remover el tapón con sumo cuidado para no agitar. Tomar 2-3 asadas de la superficie del menisco y colocar sobre un porta-objetos. Flamear el asa en el mechero.

Cubrir la preparación con un cubre-objetos y examinar en el microscopio óptico toda la preparación.

Buscar los ooquistes con objetivo 10X a diferentes profundidades; a menudo flotan y se colocan justo debajo del cubre-objetos.

Para confirmar, utilizar mayor magnificación. Puede usar esta preparación para colorear; basta remover el cubre-objetos, dejar secar y colorear.

Descartar el material utilizado en frasco con desinfectante.

CARACTERÍSTICAS DE LA FLOTACIÓN:

Los ooquistes de apicomplexa pueden deformarse un poco; pueden tomar un color rosa pálido en su interior. Habrá que diferenciar de levaduras, *Blastocystis hominis*, otras estructuras.

Existen otros métodos de flotación en los que se utiliza un detergente (Tween 80) y gradientes discontinuos de solución de azúcar de densidades 1:2 y 1:4 o Percoll (Arrowood M. y Sterling J. Journal of Parasitology 1987, **73**:314-319), recomendado para trabajos de investigación. Deberá experimentar en el laboratorio hasta perfeccionar la técnica antes de implementarla.

REFERENCIA:

Sheather AL. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. Journal of Comparative Technology 1923, 36:266-275.

HUEVOS Y LARVAS DE HELMINTOS; OOQUISTES Y QUISTES DE PROTOZOOS

CONCENTRACIÓN POR FORMALINA - ACETATO DE ETILO

PROPÓSITO:

Concentrar huevos y larvas de helmintos y ooquistes y quistes de protozoos de las heces. Se recurre a este método cuando el examen directo es negativo, cuando la excreción de quistes/ooquistes es baja e intermitente o para descartar infecciones leves en general, sobre todo si otros métodos (sulfato de zinc por Ej.) no han ofrecido resultados esperados. El método original utilizaba éter, pero esta sustancia se ha sustituido por acetato de etilo por ser menos inflamable y explosiva que el éter. Algunos sugieren centrifugar por 10 minutos en vez de dos minutos para recobrar ooquistes de apicomplexa, pero encontramos que se forma demasiado sedimento que impide realizar el examen parasitológico (**Figura 7, página 124**).

VENTAJAS:

Puede utilizarse con heces frescas o heces fijadas previamente en formalina o en MIF; los quistes de protozoos no se deforman; puede demorarse en examinar el sedimento más que en métodos por flotación; es adecuado tanto para huevos de nemátodos como de céstodos y tremátodos; produce menos errores técnicos que otras concentraciones.

DESVENTAJAS:

Los huevos infértiles de *Ascaris* y en ocasiones quistes de *Giardia* pueden flotar y descartarse inadvertidamente con el tapón de detritus; utiliza tubos de ensayo de vidrio (cuando se usa éter), ya que los tubos de plástico son dañados por éste; no es adecuado para concentrar trofozoítos de protozoos.

MUESTRA A EXAMINAR:

Heces frescas recolectadas en frasco limpio y seco, de boca ancha, identificado correctamente.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Formalina al 10%

Formaldehído	10 mL
Solución salina 0.85%	90 mL (Puede usar agua destilada en vez de solución salina).

MATERIALES:

- Vasitos de plástico o cartón (30 mL de capacidad)
- Tubos de centrifuga de ensayo 13 X 100 mm
- Aplicadores
- Marcadores
- Embudos de 5 cm de diámetro
- Gasa quirúrgica en rectángulos de 16 X 16 cm en 2 dobleces
- Parafilm o tapones de hule
- Solución de formalina al 10%
- Acetato de etilo
- Aplicadores con algodón en un extremo
- Porta-objetos de 7.5 X 2.5 cm (3 X 1 pulgada) o de 7.5 X 5 cm (3 X 2 pulgadas)
- Cubre-objetos
- Gradilla para tubos
- Pipeta graduada de 5 mL
- Balanza de 2 platos para equilibrar tubos
- Solución de Lugol
- Acetato de etilo
- Frascos con desinfectante para descartar material

PROCEDIMIENTO:

- Identificar frascos, tubos y láminas con la muestra a examinar.
- Transferir 1-2 g de heces a un vaso de plástico o cartón y agregar 10 mL de formalina.
- Desmenuzar y suspender completamente las heces con ayuda de aplicadores.
- Descartar aplicadores. Dejar fijar mínimo 30 minutos.
- Filtrar por 2 dobleces de gasa a un tubo cónico o de ensayo ayudado por embudo. Descartar gasa. Tapar tubos
- Equilibrar los tubos en balanza de 2 platos junto con los tapones.
- Centrifugara 1,500 rpm por 2 minutos; destapar.
- Descartar el sobrenadante.
- Agregar más formalina al sedimento, agitando éste con un aplicador, hasta ± la mitad del tubo.
- Agregar 2-3 mL de acetato de etilo.
- Tapar el tubo con parafilm o tapón de hule y agitar vigorosamente 15 segundos.
- Centrifugara 1,500 rpm por 2 minutos.
- Al final de la centrifugación se obtienen 4 capas (**Figura 7 a, pág.124**): sedimento, formalina, tapón de detritus y acetato de etilo. Destapar con cuidado y con un aplicador desprender el tapón de detritus todo alrededor y decantar el sobrenadante de un solo movimiento.

En el fondo quedará el sedimento a estudiar (**Figura 7 c, pág. 124**).

Con un aplicador con algodón limpiar las paredes interiores del tubo (véase figura 6 b).

Transferir el sedimento a un porta-objetos (**Figura 7 d, pág. 124**), cubrir con un cubre-objetos y examinar toda preparación con objetivo 10X. Pasar a mayores magnificaciones cuando sea necesario.

Para colorear quistes, agregar una gota de solución de Lugol.

Descartar material utilizado en desinfectante.

CONTROL DE CALIDAD:

Procesar una muestra de heces de diagnóstico conocido y comparar resultados.

REFERENCIAS:

Ash L. and Orihel T. Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press. American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 1987.

García L and Bruckner D. Diagnostic Medical Parasitology, 2nd. Edition, American Society for Microbiology Washington, D.C. 1993.

DIFERENCIACIÓN DE LARVAS DE NEMÁTODOS Y VIABILIDAD DE ALGUNOS HUEVOS

MÉTODO DE HARADA-MORI

PROPÓSITO:

Para estudiar la distribución regional o geográfica de las uncinarias de humanos **Necator americanus** y **Ancylostoma duodenale**; para la diferenciación entre larvas de uncinaria y de los «huevos parecidos a los de uncinaria» (**Trichostrongylus**, **Temidens**, **Strongyloides fulleborni**); en la diferenciación entre larvas de uncinaria y otras larvas, para determinar la viabilidad de los huevos y/o larvas en estudios sobre efectividad anti-helmíntica, para cultivar estadios de vida libre de **Strongyloides**, para embrionar huevos de tremátodos (**Paragonimus** y **Fasciola**) y de céstodos (**Diphyllobothrium** y **Spirometra**), para estadios similares en parasitología veterinaria.

Estas preparaciones pueden transportarse del campo al laboratorio, cuidando de no agitarlos, derramarlos ni permitir que se sequen (**Figuras 8 y 9, página 125**).

MUESTRA REQUERIDA:

Heces frescas, sin refrigerar, recolectadas en frasco (vidrio, plástico o cartón) limpio, de boca ancha, con tapadera, debidamente identificado, sin contaminación.

VARIACIONES:

Existen 2 variaciones: una en tubo de ensayo y otra en preparación inclinada en caja de Petri. Se describirá la original en tubo de ensayo y se mencionará lo más importante en la que utiliza caja de Petri.

Nota: Las larvas recobradas pueden ser infectantes. Aplicar medidas de seguridad: usar guantes, limpiar inmediatamente cualquier cultivo derramado con una solución de clorox, Lugol o fenol, descartar material en frascos con desinfectante.

MATERIALES:

Tubos de ensayo de preferencia cónica, de 15 mL de capacidad, en su defecto, tubos de ensayo de 25 X 175 mm

Tiras de papel filtro (Whatman #2 u otro similar) cortadas 2 mm menos anchas que el diámetro del tubo y 2 cm más largas, con un extremo más afinado.

Agua destilada, en una pizeta

Baja-lenguas, palos de paleta o aplicadores de madera

- Gradilla o soporte para tubos
- Guantes
- Lente de aumento o lupa de mano (opcional)
- Pipetas Pasteur
- Bulbo de goma o perilla para pipetas
- Lápiz de grafito
- Cajas de Petri de 5 cm de diámetro
- Porta-objetos de 7.5 x 2.5 cm (3 X 1 pulgada)
- Cubre-objetos 22 X 22 No.1 ó No.2
- Frasco con desinfectante para descartar material

PROCEDIMIENTO EN TUBO DE ENSAYO (Figura 8, página 125);

- Con un lápiz de grafito, escribir la identificación de la muestra en el extremo más delgado de la tira de papel filtro.
- Con un aplicador o palo de paleta tomar y extender unos 0.5-1.0 g de heces sobre el tercio medio de la tira; descartar aplicador.
- Insertar esta tira con la parte escrita dentro del tubo de ensayo. Quedará una porción extendida fuera del tubo por la que pasarán elementos solubles de las heces.
- Con todo cuidado agregar agua destilada hasta que el nivel llegue por debajo del extendido de heces. Tener cuidado de no mojar las heces.
- (Aunque no es necesario tapar los tubos, en lugares muy calientes se prefiere hacerlo para evitar la evaporación rápida del agua).
- Colocar los tubos así preparados en una gradilla y mantener en lugar seguro a temperatura ambiente.
- Revisar diariamente el nivel de agua. Reemplazar aquella perdida por evaporación, con mucho cuidado. Para verificar si hay larvas móviles en el sedimento:
- Colocarse los guantes.
- Obtener una porción del sedimento con una pipeta Pasteur, colocarlo en la caja de Petri y observar al microscopio estereoscópico.
- Para estudiar la morfología diferencial, deberá aspirar larvas con la pipeta y colocar las larvas entre porta y pubre, calentar suavemente o agregar solución de Lugol para inmovilizarlas; observar al microscopio óptico. Identificar por morfología.
- Descartar material en frasco con desinfectante. Descartar guantes.

VARIACIÓN EN CAJA DE PETRI (Figura 9, página 125).

El propósito es el mismo que el método en tubo de ensayo, excepto que aquí puede utilizar mayor cantidad de heces y puede observar el sedimento directamente al microscopio, para determinar la presencia de larvas. La identificación específica requiere observar en detalle la morfología de las larvas. Puede utilizar una caja de Petri de 9 cm, o una de 14 cm de diámetro, según cuanto material desee obtener y una tira de papel filtro del tamaño de un porta objetos de 3 X 2 pulgadas u otro soporte conveniente para heces. La identificación específica requiere observar en detalle la morfología de las larvas.

PROCEDIMIENTO:

Extender las heces sobre la tira de papel, la que se coloca sobre el porta-objetos u soporte.

Colocar esta preparación en la caja de Petri soportada en un extremo por aplicadores o por una varilla de vidrio para lograr una inclinación.

Agregar agua destilada a la caja de Petri asegurando que el agua ascienda por capilaridad en la tira de papel con heces.

Tapar y dejar a temperatura ambiente por 2-3 días. Asegurar que la preparación no se seque.

Al cabo de 2-3 días, colocarse los guantes.

Colocar la preparación en el microscopio estereoscópico y buscar larvas en el agua. Si no se observan,

Con una pipeta Pasteur obtener una porción del agua de la caja y examinar entre porta y cubre en un microscopio óptico buscando larvas. O bien, verter el líquido en un tubo de ensayo, centrifugar y recobrar las larvas del sedimento. Identificarlas según características morfológicas específicas.

Todo material se descarta en la solución desinfectante.

Consultar con los diagramas provistos para identificar larvas.

Para morfología diferencial, consultar **Figura 10**, pág. 126.

REFERENCIAS:

Little, M.D. 1980. Differentiation of nematode larvae in fecal coprocultures: guidelines for routine practice in medical laboratories. Scientific Group on intestinal protozoa and helminthic infections. Int. Par. SG/Inf/80.3 Organización Mundial de la Salud, Ginebra.

Tulane University, School of Public Health and Tropical Medicine, Department of Tropical Medicine. Parasitologic Methods, 1992.

Beaver PC, Malek E, and Little MD. Development of *Spirometra* and *Paragonimus* eggs in Harada-mori cultures. Journal of Parasitology 1964, 50:664-666.

EXTRACCIÓN DE LARVAS

MÉTODO DE BAERMANN

PROPOSITO:

Recobrar larvas de nemátodos y en algunos casos gusanos adultos, de las heces, suelo, tejidos, etc. Es el método de elección más eficiente para recobrar larvas de infecciones por ***Strongyloides stercoralis***.

Existen 2 variaciones: una que utiliza un embudo de vidrio y otra que utiliza un vaso de sedimentación o de cerveza. El principio del método es exactamente igual en ambos: recobrar larvas sedimentadas en el fondo del embudo o del vaso. Se considerará aquí el método en vaso de sedimentación (**Figura 11, pág. 127**).

IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO:

Detectar una estrongiloidiasis latente en aquellos pacientes en riesgo a quienes se les provoca o desarrollan una inmunodeficiencia; en personas desnutridas, alcohólicas, quemadas severas, que recibirán radiaciones. Para verificación terapéutica. Se aumenta la probabilidad de diagnóstico con exámenes repetidos durante varios días o semanas.

NOTA: *Es posible encontrar larvas de primer estadio de **Angiostrongylus Costaricensis** en heces de algunos individuos infectados. Son menos móviles que las de **Strongyloides**, miden 260-290 μ m de largo y poseen una muesca en la terminación de la cola, característica de larvas de **Metastrongilídeos**.*

MUESTRA REQUERIDA:

Heces frescas, recolectadas en frasco (vidrio, plástico, cartón), limpio, de boca ancha, con tapadera, correctamente identificado. No se deben refrigerar, ya que esto inmoviliza las larvas y les impide migrar al agua.

MATERIALES:

- Vaso de sedimentación de 250 mL de capacidad
- Círculo o cuadrado de papel filtro
- Círculo o cuadrado de gasa quirúrgica en 4 dobleces
- Baja-lenguas o palos de paleta
- Marcador

Pipetas Pasteur, tallo de 9 cm de largo
Bulbo de hule para las pipetas
Agua corriente a 37° C
Cajas de Petri de 5 cm de diámetro
Porta-objetos de 7.5 X 5 cm (3 X 2 pulgadas)
Cubre-objetos de 22 X 22 mm No. 1 o No. 2
Frasco con desinfectante para descartar material

PROCEDIMIENTO:

Identificar el vaso con la muestra a examinar.
Verter el agua a 37°C dentro del vaso de sedimentación más o menos hasta 3 cm antes del borde.
Tomar un redondel de papel filtro y con un baja-lenguas o palo de paleta, extender unos 5 g de heces frescas en capa delgada sobre éste, descartar baja-lenguas.
Cubrir esta preparación con la gasa.
Colocar esta preparación con la gasa hacia abajo, dentro del vaso, procurando que las heces queden sumergidas en el agua (**Figura 11**, pág. 127).
Esperar una hora. Las larvas migrarán de las heces al agua y caerán al fondo del vaso.
Después de la hora, preparar la caja de Petri identificándola. Colocar el bulbo de hule en la pipeta Pasteur. Con un aplicador de madera apartar suavemente la gasa, apretar el bulbo entre índice y pulgar e introducir la pipeta hasta el fondo del vaso. Absorber sedimento del fondo sin removerlo.
Colocar este sedimento en la caja de Petri. Esta operación puede repetirse 2-4 veces.
Examinar bajo microscopio estereoscópico, buscando larvas en el fondo de la caja.
Para identificarlas específicamente, aspirar algunas con la pipeta Pasteur, colocarlas sobre un porta-objetos, cubrir con un cubre-objetos y buscarlas con objetivo 10X primero. Si están muy móviles, calentar suavemente la preparación o agregar por capilaridad una gota de solución de Lugol. Para determinar los detalles morfológicos, utilizar objetivo de 40X.
Reconocer las características: Cápsula bucal corta, primordio genital grande.
Descartar material en frasco con desinfectante.

REFERENCIAS:

- Lumbreras, H. Strongiloidosis. I. Evaluación de la técnica de Baermann modificada en copa en el estudio de la estrogiloidosis. *Revista Médica Peruana* 1967, 22:119-126.
- Kaminsky R. Evaluation of three methods for the identification of *Strongyloides stercoralis* infection. *Journal of Parasitology* 1993, 79:277-280.

LARVAS DE STRONGYLOIDES STERCORALIS

MIGRACIÓN DE LARVAS EN AGAR

PROPÓSITO:

Aumentar la sensibilidad de detección por métodos no agresivos una infección por *Strongyloides stercoralis*. Incidentalmente podrían recobrase larvas de *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale* si la infección está presente.

IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO:

Detectar una estrongiloidiasis latente en aquellos pacientes a riesgo a quienes se provoca o desarrollan una inmunodeficiencia; en personas desnutridas, alcohólicas, quemadas severas, cirróticos, que reciben radiación, etc. Estudios epidemiológicos.

VENTAJAS:

Sensibilidad de diagnóstico aumentada, adecuado en casos problema o para diagnosticar la infección en niños en quienes no puedan realizarse exámenes más agresivos (aspirado duodenal, biopsia).

DESVENTAJAS:

Necesidad de más equipo de laboratorio, más tiempo para preparar el método, mayor tiempo de espera antes de ofrecer un resultado, menor cantidad de heces de donde se podrían extraer las larvas, necesidad de personal de laboratorio muy calificado, trabajo laborioso, impropio en lugares con una rutina voluminosa y pocos empleados poco calificados, material potencialmente infectante.

MUESTRA REQUERIDA:

Heces frescas, recolectadas en frasco (vidrio, plástico, cartón) limpio, de boca ancha, con tapadera, correctamente identificado. No se debe refrigerar la muestra, ya que esto inmoviliza las larvas.

MATERIALES:

- Cajas de Petri de vidrio o plástico, tamaño estándar (10 cm de diámetro)
- Cajas de Petri de 5 cm de diámetro Agar simple Extracto de res

- Peptona
- Cloruro de sodio
- Erlen-Meyer de capacidad según la cantidad de medio a preparar
- Mechero de gas
- Bolsas plásticas
- Baja-lenguas de madera o palos chatos de paleta o aplicadores de madera
- Formalina al 10% en una pizeta
- Porta objetos de 7.5 X 5.0 cm (3 X 2 pulgadas)
- Cubre-objetos de 22 X 22 mm
- Pipetas Pasteur tallo corto
- Bulbo de goma o perilla
- Incubadora (opcional) a 37°C
- Microscopio estereoscópico
- Microscopio óptico
- Guantes desechables
- Tubos de centrifuga de 13 X 100 mm
- Centrífuga
- Cuaderno para anotar y lápiz
- Frascos con desinfectante para descartar material

PREPARACIÓN DEL MEDIO (suficiente para 10 placas):

Agar	1.5 g
Peptona	1.0 g
Extracto de res	0.5 g
Cloruro de sodio	0.5 g

Agregar 100 mL de agua destilada. Llevar a baño María hasta completa disolución de las sustancias. Esterilizaren autoclave a 121°C, 21 libras de presión, durante 15 minutos. Verter en capa fina (10 mL/caja de Petri), dejar endurecer toda la noche y guardar en bolsa plástica sellada a 4° C. Antes de usar cada placa, dejar un rato a temperatura ambiente.

PREPARACIÓN DEL CAMPO DE TRABAJO:

Tener a mano y listo: Microscopio estereoscópico Pipetas Pasteur y bulbo o perilla Cajas de Petri de 5 cm de diámetro Formalina al 10% en una pizeta Tubos de ensayo de 13 X 100 mm, previamente rotulados

Solución desinfectante: clorox, solución yodada, etc
Cuaderno para anotar y lápiz

ATENCIÓN: *Material potencial mente infectante. Utilizar guantes durante todo momento de la observación de las muestras. La literatura japonesa ofrece otras ideas, pero en nuestra experiencia el uso de guantes y el tener solución desinfectante a mano es adecuado. Limpiar con desinfectante inmediatamente cualquier líquido derramado. Se necesita determinar circunstancias de bioseguridad en la adecuación del método para estudios epidemiológicos.*

PROCEDIMIENTO:

- Identificar la placa de agar con la muestra de heces a examinar.
- Con la ayuda de baja-lenguas, palo de paleta o aplicadores de madera, colocar 1 g de heces en el centro de la placa. Si las heces están duras o formadas, ablandar con unas gotas de agua destilada estéril. Tratar de que las heces queden extendidas lo más posible y en contacto con el medio de agar.
- Tapar la placa.
- Incubar a 37°C. Pueden asimismo dejarse en un lugar protegido a temperatura ambiente, pero el tiempo de observación se prolonga.
- Incubar 24 horas.
- Antes de sacar las placas de la incubadora, ponerse los guantes. Sacar las placas y llevar a la mesa de trabajo.
- Colocar una placa en el microscopio estereoscópico y sin destapar buscar caminos de larvas y/o larvas en la superficie del medio. Si se forma agua de condensación en la tapadera, limpiar ésta con papel absorbente y descartar en desinfectante. Volver a tapar y continuar.
- Si no se observan caminos ni larvas, dejar en incubación otras 24 h. Al cabo de ese tiempo, volver a examinar en microscopio estereoscópico.
- Anotar resultados. Verter formalina al 10% sobre la superficie del agar, sin verterla sobre las heces.
- Inclinar la placa y con una pipeta Pasteur aspirar la formalina y colocar en un tubo de ensayo previamente identificado.
- Centrifugar a 1,500 rpm durante 2 minutos.
- Decantar o extraer cuidadosamente el sobrenadante.
- Recobrar el sedimento con otra pipeta y colocaren un porta-objetos, cubrir y observar al microscopio óptico.
- Identificar larvas presentes por morfología específica bajo objetivo 40 X: cápsula bucal corta y primordio genital grande para larvas rabdiformes; esófago largo y punta de la cola en forma de M para larvas filariformes de ***S. stercoralis***.

En ocasiones se han observado larvas dentro del medio. Enfocar bien al buscar para no perderlas en caso que no se encuentren en la superficie.

No basta con observar la presencia de surcos. Es necesario recobrar las larvas y diferenciarlas.

REFERENCIAS:

- Arakaki T, Maasaki S, Fukunori K, Astushí S, Ryuji A and Tsuyoshi I. Efficacy of the agar plate culture in detection of ***Strongyloides stercoralis*** infection. *Journal of Parasitology* 1990,16:425-428.
- Kaminsky R. Evaluation of three methods of laboratory diagnosis of ***Strongyloides stercoralis*** infection. *Journal of Parasitology* 1993,79:277-280.

LARVAS EN TEJIDOS

1. MÉTODO DE COMPRESIÓN

PROPÓSITO:

Confirmar una infección por larvas en tejidos. Originalmente se diseñó para demostrar larvas de *Trichinella spiralis* en músculo y diafragma sin fijación previa de cerdos en países donde este parásito significaba un problema en salud. Para infecciones muy leves con este parásito se recomienda considerar una digestión de tejidos explicada en este Manual. Algunos autores sugieren un xenodiagnóstico, en donde se alimentan ratas de laboratorio libres de la infección con el tejido sospechoso, examinándose el animal un mes después. Se describe una modificación que se puede utilizar para estudiar ganchos rostellares de larvas de *Taenia* spp. y de *Echinococcus* spp.

MATERIALES:

Porta-objetos 7.5 X 5.0 cm (3 X 2 pulgadas)
Papel absorbente
Aplicadores y alfileres entomológicos
Microscopio estereoscópico
Microscopio óptico

PROCEDIMIENTO:

Dependiendo de la cantidad de tejido no fijado a examinar, utilizar un triquinoscopio (diafragma entero de cerdo) o 2 porta-objetos de 7.5 X 2.5 cm (3 X 2 pulgadas) para colocar 0.5 g o menos de tejido.

Colocar la porción de tejido, libre de sangre y secada con papel absorbente en medio de los dos porta-objetos y haciendo presión en los extremos.

Comprimir el tejido.

Observaren un microscopio estereoscópico o uno óptico para determinar la presencia de larvas de *Trichinella spiralis*.

CARACTERÍSTICAS:

Si la infección es reciente, las larvas estarán no encapsuladas pero diferenciadas.

Infecciones de meses de duración ya presentan larvas encapsuladas. La cápsula puede medir 1 mm o más, alargada, con el eje siguiendo la longitud de la fibra muscular.

Para estudios de ganchos rostellares en larvas no fijadas de *Taenia* spp. y de *Echinococcus* spp. se puede utilizar la modificación a continuación.

MATERIALES:

Tijeras finas
Bisturí - hoja y mango
Caja de Petri
Porta objetos de 7.5 X 5.0 cm (3 X 2 pulgadas)
Plancha caliente (como se utilizan en histopatología)
Solución de ácido clorhídrico al 1 %
Alcohol etílico al 70% glicerinado al 20%
Medio de Berelese
Aplicadores de madera o alfileres entomológicos

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE BERELESE:

Goma arábica	4 g
Agua destilada	4 mL
Glicerina	2.5 mL
Hidrato de doral	35 g
Ácido acético glacial	1.5 mL

Mezclar, guardar en frasco tapado y rotulado.

PROCEDIMIENTO:

Remover con cuidado el quiste del tejido.

Abrir el quiste con un bisturí sobre una caja de Petri de y exponer el cuello del protoescolex.

Colocar éste entre 2 porta-objetos y comprimir apretando suavemente.

Transferir de esta manera a una solución de ácido clorhídrico al 1 % para disolver los corpúsculos calcáreos durante unos minutos.

Sumergir en una solución de alcohol al 70% con glicerina al 20%, colocar sobre una plancha caliente (40° - 50°C) para que el alcohol se evapore. El tejido se vuelve transparente.

Transferir el escolex aclarado a una gota de un medio de montaje (Berelese) sobre un porta-objetos, cubrir con un cubre-objetos y oprimir suavemente, lo que esparce los ganchos y facilita su medición y cuenta.

REFERENCIAS:

Beaver PC, Jung RC, and Cupp E. Clinical Parasitology. 9th Edition. Lea and Febiger, (pg. 239), 1985.
Sacks, R. 1974. Further studies on cysticercosis and Echinococcosis of African game animals. I. On identifying muscle cysticerci by the number of rostellar hooks.

LARVAS EN TEJIDOS

2. DIGESTIÓN ARTIFICIAL

PROPÓSITO:

Recobrar larvas y adultos de helmintos o quistes tisulares de protozoos de tejidos humanos o de animales (*Sarcocystis*), por un proceso que utiliza un líquido parecido al jugo gástrico, el cual digiere los tejidos y deja los parásitos libres.

PARÁSITOS:

Aquí se describe el método específicamente para recobrar larvas de *T. spiralis* (músculo) y *A. costaricensis* (babosas). Pueden recobrase otros parásitos tisulares como *Onchocerca* de nódulos, otras filarias, *Capillaria* en hígado, huevos de tremátodos en tejidos, etc ten algunos casos no se pasa el tejido por licuadora). También es un método útil para recobrar larvas de nemátodos post infección en animales de experimentación.

MUESTRA REQUERIDA:

Biopsia o tejidos (Ej: babosas, cerebro, pulmón, hígado, etc) sin fijar.

VENTAJAS:

Puede examinarse una mayor cantidad de tejido o animales enteros (pequeños roedores p.g), con lo que se obtiene una concentración de larvas; puede recobrar quistes tisulares de protozoos y larvas o adultos que vivan en tejidos. Los parásitos se recobran vivos cuando lo están, no dañados y libres de tejidos del hospedero, lo que permite utilizarlos para diversos propósitos: identificación, diagnóstico, infección experimental, preparación de antígeno, etc.

DESVENTAJAS:

No es adecuado para estadios larvados muy recientes ni para estadios calcificados, los cuales son digeridos, perdiéndose infecciones muy recientes o muy viejas.

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN

Líquido de digestión artificial:

Pepsina en polvo	5 g
Ácido clorhídrico (HCl) puro	7 mL
Agua destilada, cantidad suficiente para	1,000 mL

Mezclar primero el ácido clorhídrico con el agua destilada; agregar la pepsina y mezclar hasta disolución completa. Utilizar inmediatamente; si se guarda en refrigeración, puede durar pocos días solamente.

MATERIALES:

- Pinzas
- Bisturí
- Cajas de Petri
- Líquido de digestión artificial
- Gasa quirúrgica en cuadrados
- Licuadora (opcional)
- Balanza
- Frascos de vidrio de boca ancha
- Incubadora a 37°C
- Agua destilada
- Pipetas Pasteur con bulbo o perilla de goma
- Vasos de sedimentación
- Frascos con desinfectante para descartar material

PROCEDIMIENTO:

Pesar el tejido en cuestión para determinar la cantidad de líquido de digestión necesario. Desmenuzar el tejido o cortar en pedazos pequeños con bisturí, o introducir en la licuadora. Agregar el líquido de digestión artificial, 20-30 mL por cada gramo de tejido. Licuar. Verter en un frasco de vidrio e incubara 37°C varias horas o toda la noche, o a 45°C por 30 minutos, agitando periódicamente con una varilla de vidrio.

Sacar de la incubadora, diluir con 2-3 volúmenes de agua destilada a 37°C y verter esto en un vaso de sedimentación de capacidad adecuada.

Esperar que sedimento como mínimo 1 hora.

Para examinar el sedimento, obtener una muestra del fondo del vaso con una pipeta Pasteur y colocar éste en una caja de Petri, esperar un minuto.

Examinar bajo microscopio estereoscópico. Para identificar las larvas a nivel de especie tomar algunas con una pipeta, colocar entre porta y cubre y examinar al microscopio óptico, reconociendo morfología característica.

Si se desea recobrar todas las larvas, centrifugar todo el sedimento y recobrarlas del fondo del centrifugado.

Características morfológicas de larvas de *T. spiralis* recobradas de músculo: En infecciones mayores de 15 días, las larvas miden 1 mm de largo por 30 μm de ancho, ya están sexualmente diferenciadas. Identificar la presencia de esticosoma; ano terminal; en larvas macho el recto mide 50 μm de largo, el polo posterior de la gónada es redondo. En larvas hembra el recto sólo mide 25 μm de largo y el polo posterior de la gónada es puntiagudo.

Características de larvas de *T. costaricensis* recobradas de babosas. Las larvas L3 miden 480 μm de largo por unas 28 μm de ancho. La parte anterior es redondeada y presenta 2 rabdiones prominentes. El esófago mide 164 μm de largo, es decir, casi la mitad del total de la larva. La cola presenta una indentación en su lado dorsal.

REFERENCIAS:

- Kaminsky R, Caballero R, y Andrews K. Presencia de *Angiostrongylus costaricensis* en Honduras y sus relaciones agroecológicas y humanas. *Parasitología al Día* 1995,19: 81-90.
- Gajadhar A, Forbes L, and Rajic A. 1996. The double separation funnel technique for the detection of *Trichinella* larvae in pork, versión 1.0, Official Protocol, Canadian Food Inspección Agency, Ottawa, Canadá.
- Kozek W. *Trichinella spiralis*: Morphologic characteristics of male and female intestine-infecting larvae. *Experimental Parasitology* 1975,37:380-387.

GANCHOS DE PROTOESCÓLICES DE *ECHINOCOCCUS* SPP.

MÉTODO DE MEDICIÓN Y MORFOLOGÍA

PROPÓSITO:

Medir ganchos rostelares para diferenciar entre larvas de especies de *Echinococcus*, recobradas de pacientes, de animales silvestres, domésticos o de animales de experimentación, para identificar correctamente la especie (**Figura 12, página 128**).

REACTIVOS:

Solución salina fisiológica.

0.85 g de cloruro de sodio en 100 mL de agua destilada.

MATERIALES:

Porta-objetos de 7.5 X 2.5 cm (3 X 1 pulgadas) o 7.5 X 5 cm (3 X 2 pulgadas)

Cubre-objetos 22 X 22 mm. preferible #2 Lápiz de grafito con borrador o caucho en el extremo posterior Microscopio óptico calibrado

PROCEDIMIENTO:

Identificar al microscopio la presencia de cápsulas prolíferas o protoescólicas, colocarlos en una gota de solución salina con una pipeta Pasteur.

Cubrir con el cubre-objetos.

Aplicar presión suave con el borrador de un lápiz moviéndolo en forma circular para desintegrar los protoescólicas fijados en formalina. Si el material es fresco, este procedimiento es mucho más fácil para liberar los ganchos.

Observar al microscopio en busca de ganchos sueltos. Si no los hay repetir la operación de desintegración.

Una vez que se vean ganchos sueltos, si están en posición oblicua, cambiarlos a una posición plana con una leve presión en el cubre-objetos o el borde del mismo.

Centrar un gancho y aplicar aceite de inmersión. Usaren las medidas el objetivo de inmersión o 90X y oculares 10 X.

Medir la longitud total (**Figura 12, pág. 128**).

Medir la longitud del mango.

Restar la segunda de la primera, lo que da la longitud del talón y hoja.

Transformar longitud de la reglita ocular en micrones usando el factor conocido en la calibración.

Calcular la proporción del mango versus la hoja-talón dividiendo el número de mm del mango por el de la hoja talón y expresarlo en porcentaje.

Estudiar la morfología de la hoja del gancho: muy curva en *E. vogeli* y casi recta en *E. oligarthus*. Ver fotografías Pág. 128.

Medidas:

***E. vogeli*:** El largo promedio de los ganchos grandes es de 42 mieras (rango 38-46 μm). La hoja es curva y la hoja/talón constituye 2/3 del largo total.

***E. oligarthus*:** El largo promedio de los ganchos grandes es de 33 mieras (rango 29-35 μm); tienen el lomo de la hoja casi recto y la hoja/talón constituyen casi la mitad del largo del gancho.

Por otro lado los ganchos rostelares de *E. granulosus* y de *E. multilocularis* son mucho más pequeños que los de *E. vogeli* y de *E. oligarthus*. El tamaño promedio del

primero es 22.5 mieras (rango 22-23 μm) y 27.4 mieras (rango 27-28.5 μm) el del segundo. La forma de los ganchos de estas dos especies es diferente de las dos especies neotropicales, Tienen hojas más cortas y los mangos, en proporción, son más largos.

Echinococcus multilocularis está distribuido sólo en Eurasia, es decir en la zona holártica.

Ver fotografías Pág. 128.

REFERENCIA:

Rausch RL, Rausch V, and D'Alessandro A. Discrimination of the larval stage of *Echinococcus oligarthus* (Diesing 1863) and *E. vogeli* Rausch and Bernstein, 1972 (Cestoda:Taeniidae). American journal of Tropical Medicine and Hygiene 1978,27:1195-1202.

ESPECIACIÓN DE TAENIA SP.

MÉTODO DE LA TINTA CHINA

PROPÓSITO:

Identificar específicamente proglótidos de *Taenia* expulsados por individuos infectados. No se puede enfatizar suficiente la importancia de identificar infecciones por *T. solium*, por el peligro que representa para el individuo, su familia y la comunidad la diseminación de los huevos de este parásito y el riesgo de adquirir una cisticercosis, tanto humana como animal. Aunque cualquier expulsión de proglótidos debe considerarse como si fueran de *T. solium* mientras no se identifique la especie, es necesario identificar, registrar y tratar los casos verdaderos.

MUESTRA REQUERIDA:

Proglótidos grávidos sin fijar, colocados en un frasco tapado e identificado con el nombre, edad, sexo y procedencia del individuo. Pueden mantenerse en refrigeración por un fin de semana, pero deben llevarse al laboratorio lo más pronto posible.

VENTAJAS:

Se ofrece un diagnóstico rápido; pueden guardarse sellados e identificados para demostración y referencia.

DESVENTAJAS:

Material infectante al humano cuando es *T. solium*; requiere manipulación cuidadosa, puede contaminar fácilmente el área del laboratorio. Puede no inyectarse bien el proglótido, o éste puede estar semimacerado y no revelar claramente el número de ramas uterinas necesarias para diagnóstico.

Alternativa: Los proglótidos lavados y limpios sin fijar, se pueden aclarar en alcohol al 70% y glicerina o bien con Lactofenol. El resultado demora mientras los proglótidos se aclaran. Para la diferenciación entre especies, puede decirse que si las ramas uterinas son muchas es *Taenia saginata* y si son pocas es *T. solium*.

MATERIALES:

- Jeringa y aguja de tuberculina
- Tinta china
- Papel absorbente
- Agua destilada
- Aplicadores
- Caja de petri
- Porta-objetos de 7.5 x 5 cm {3 x 2 pulgadas}
- Cinta adhesiva opaca
- Frasco con desinfectante o agua hirviendo

PROCEDIMIENTO:

-Si el o los proglótidos están sucios con heces, colocarlos con ayuda de aplicadores en una caja de Petri y lavar por agitación suave con agua destilada.

-Colocar un proglótido sobre 3-4 dobleces de papel absorbente y secarlo por ambos lados.

-Aspirar algunas gotas de tinta china en la jeringa de tuberculina.

Inyectar el proglótido afianzado sobre el papel absorbente, introduciendo la aguja en la rama uterina central del proglótido como si fuera inyección subcutánea.

-Secar con otro papel el exceso de tinta y humedad y colocar el proglótido entre 2 porta-objetos.

-Ejercer presión para apretar el proglótido al mismo tiempo que otra persona sella alrededor de la preparación con cinta adhesiva.

-Contar las ramas uterinas coloreadas con la tinta china con una lente de aumento. Número de ramas para *T. solium*: 5, 7, 9 ó 13. Número de ramas para *T. saginata*: más de 15.

-Cuando hay duda en situaciones de cuenta intermedia solicitar más proglótidos sin fijar o el parásito que se expulsará con tratamiento específico, recolectado directamente en una bolsa plástica o en un frasco grande limpio y seco.

Cuando los proglótidos se reciben fijados, se colorean con carmín, que es una coloración permanente.

Descartar todo material utilizado en frasco con desinfectante o en agua hirviendo. Desinfectar la mesa de trabajo. Lavarse bien las manos.

TROFOZOÍTOS Y QUISTES DE PROTOZOOS

COLORACIÓN PERMANENTE CON HEMATOXILINA FÉRRICA DE HEIDENHAIN

PROPÓSITO:

Método clásico para colorear e identificar estadios de protozoos comunes en heces del humano, sobretodo cuando sólo hay trofozoítos y las infecciones son mixtas. Las descripciones en los libros sobre la morfología y características de cada estadio y de cada especie están basadas en organismos coloreados por este método.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS:

Las ventajas y desventajas de este método van a depender de:

1. Costo-efectividad.
2. Adiestramiento de personal.

Es un método caro porque exige reactivos de primera clase, sobre todo el fijador y los deshidratantes (alcohol, xileno); requiere un tiempo de preparación y coloración de las muestras (mínimo 2 horas) y exige un personal de laboratorio con conocimiento sólido sobre principios celulares y morfología diferencial de los organismos. Sin embargo, para la especiación de protozoos es la más adecuada, la preparación puede guardarse para control, referencia, confirmación por terceras personas y material de estudio.

NOTA: Desde la década anterior, con la redescipción de las especies de Entamoeba histolytica y de Entamoeba dispar, la identificación por morfología de Entamoeba histolytica no es aceptada. Se prefiere utilizar métodos inmunológicos o de biología molecular. Podría hacerse una excepción en presencia de trofozoítos hematófagos recobrados de casos clínicos agudos (disentérica o amebiasis extraintestinal). Por otra parte, esta coloración en manos adiestradas ofrece la diferenciación más confiable de otras especies de protozoos patógenos y no patógenos del humano.

Hay 3 momentos claves en la ejecución de este método:

1. Fijación
2. Diferenciación
3. Deshidratación

Al final los resultados dependerán de que se haya hecho una pronta y correcta recolección y fijación de la muestra. No se debe perder tiempo examinando una muestra mal fijada y peor teñida.

Para una discusión más completa y acertada sobre el tema, consultar las referencias citadas. Para una coloración rápida (8-10 minutos) consultar la referencia de Flournoy y colaboradores.

MUESTRA REQUERIDA:

Evitar purgantes de aceite mineral o la administración de medios radiológicos de contraste por lo menos 2 semanas antes de tomar la muestra. Cualquier terapia con antibióticos reduce la posibilidad de encontrar organismos.

Heces recolectadas en un frasco (vidrio, plástico, cartón) limpio, seco, con tapadera, sin contaminación (agua, tierra, orina).

Cuando haya moco y sangre, recoger de esta parte.

Evitar colocar la muestra a temperaturas extremas. Deben ser fijadas al momento de evacuarlas o llevarlas al laboratorio en los próximos 30-60 minutos.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Shaudinn modificado

Solución saturada acuosa de cloruro de mercurio	62.5 mL
Alcohol etílico al 95%	31.2 mL
Ácido acético glacial	5.0 mL
Glicerol	1.5 mL

Mezclar la solución saturada de cloruro de mercurio con el alcohol etílico. Puede guardarse en frasco rotulado. El ácido acético y el glicerol sólo se mezclan al momento de usar el fijador. Fijar una muestra de heces en este fijador en relación de 10:1 (10 ml de fijador para 1 g ó 1 ml de heces). Las heces deben estar totalmente suspendidas en el fijador, para lo cual se utiliza un aplicador.

Albúmina de Mayen

Mezclar una clara de huevo en partes iguales con glicerol.

Guardar en frasco tapado, rotulado, en el refrigerador. Para preparar las láminas, agregar en partes iguales al sedimento del centrifugado de heces. Ver «Procedimiento».

Alcohol yodado. Solución madre:

Agregar suficientes cristales de iodo a un volumen X de alcohol al 70% en un frasco oscuro con buen tapón. Se obtendrá una solución oscura. Rotular y guardar.

Para trabajar, agregar un poco de esta solución a un volumen X de alcohol al 70%, hasta obtener una solución color té o color coñac (ámbar).

Mordente:

Cristales de sulfato férrico amónico

(Fe ₂ (SO ₄) ₃ (NH ₄) ₂ SO ₄ + 24H ₂ O)	2 g.
Agua destilada	100 mL.

Mezclar, preparar fresco cada día. No puede guardarse.

Colorante de hematoxilina. Solución madre.

Cristales de hematoxilina	10 g
Alcohol etílico de 95%	100 mL

Mezclar y dejar madurar varias semanas (entre 5-6) en un frasco con tapón de algodón, a la luz, a temperatura ambiente. Para trabajar: agregar 0.5 mL de esta solución a 95 mL de agua destilada.

Ácido Pítrico:

Ácido pícrico en cristales	2 g
Agua destilada	100 mL

Mezclar y agitar, dejar reposar varios días en un frasco rotulado, agitando de vez en cuando. Si todos los cristales se disuelven, añadir más cristales de ácido pícrico. Utilizar del líquido sobrenadante para diferenciar, tomando la cantidad necesaria con una pipeta.

Alcohol al 70%

Alcohol etílico puro	70 mL
Agua destilada	30 mL

Mezclar y guardar en frasco rotulado y bien tapado.

Alcoholes de otras gradaciones se preparan en forma similar, agregando la diferencia correspondiente de agua. Para los 2 últimos cambios en alcohol 100%, utilizar alcohol etílico puro.

MATERIALES:

- Porta-objetos 7.5 X 2.5 cm. (3 X 2 pulgadas)
- Cubre-objetos 22 X 30 mm ó 22 X 22 mm No.1
- Tubos de ensayo para centrifugar (13 X 100 mm }
- Viales para fijar las heces
- Gasa quirúrgica
- Lápiz de diamante para rotular porta objetos
- Embudos de 5 cm de diámetro
- Aplicadores
- Albúmina de Mayer
- Fijador Schaudinn modificado
- Alcohol yodado
- Mordente
- Colorante de hematoxilina
- Solución de diferenciación
- Alcohol etílico al 70%, 80%, al 95%
- Alcohol absoluto
- Xileno o tolueno
- Permout
- Frascos con desinfectante para descartar material.

PROCEDIMIENTO:

-Fijar una muestra de heces o de moco con sangre recién obtenida en el fijador en relación 10:1 (10 mL de fijador para 1 g ó 1 mL de heces). **Las heces deben estar totalmente suspendidas en el fijador, para lo cual se mezcla con un aplicador.**

-Antes de proceder con la coloración la muestra debe permanecer 6 horas como mínimo en el fijador. El examinar láminas mal fijadas y peor teñidas es una pérdida de tiempo.

-Identificar tubos y láminas con la muestra a procesar.

-Agitar el frasco conteniendo la muestra fijada y verter 1 mL a un tubo de centrifuga.

-Si hubiere partículas muy gruesas, en este momento puede filtrarse por un embudo con gasa en 2 dobleces. Descartar la gasa y poner el embudo en solución desinfectante.

-Llenar el tubo con agua destilada y centrifugar 2 min. a 2,000 rpm.

-Descartar el sobrenadante. Este paso puede repetirse otra vez para eliminar fijador en exceso. Agregar al sedimento un volumen igual de albúmina de Mayer, mezclar y extender finamente 1-2 gotas de esto sobre un porta-objetos rotulado. También puede colocar sobre el porta-objetos 1-2 gotas de sedimento de heces, agregar 1-2 gotas de albúmina de Mayer, mezclar y extender finamente. Permitir que la preparación se seque unos minutos, dependiendo de la temperatura ambiente. Si no lo seca suficiente, el extendido se desprende; si lo deja secar demasiado, los protozoos se deforman.

Introducir en las siguientes soluciones por el tiempo indicado:

- Alcohol 50% 5 min
- Alcohol 70% yodado 2- 5 min
- Alcohol 70% 2-5 min
- Alcohol 50% 3-5 min
- Lavar en agua corriente 3-10 min
- Solución mordente sulfato férrico amónico 10 min
- Lavar en agua corriente 3 min
- Hematoxilina acuosa 10 min
- Lavar en agua corriente 2 min
- Ácido pícrico saturado 10-15 min
- Lavar en agua corriente 15-30 min
- Deshidratar por una batería de alcoholes
 en incremento 70%, 95%, y 2 cambios
 en 100% 2 min en c/u
- Xilol 2 min

Colocar 1-2 gotas de permount, cubrir con cubre-objetos, dejar secar y observar con objetivo de inmersión.

CONTROL DE CALIDAD:

Preparar extendidos finos de heces que contengan estadios de protozoos de determinada especie previamente identificada o de cultivos de protozoos; una coloración bien hecha depende de una fijación correcta y destaca claramente las características del núcleo y las inclusiones citoplásmicas. Guardar toda muestra de heces y toda lámina positiva, debidamente identificada, para referencia y control.

El personal que examina las láminas debe tener conocimientos actualizados y sólidos sobre morfología diferencial de protozoos. El laboratorio debe contar con material de consulta y referencia: fotografías, microfotografías, atlas, libros de texto.

PROBLEMAS Y SU CORRECCIÓN:

Para mantener las soluciones lo más limpias posibles, escurrir la lámina tocando brevemente un papel absorbente o una gasa con el extremo inferior de la misma antes de pasar a otra solución.

Presencia de numerosos cristales amarillos u oscuros indica que el alcohol yodado no removió los cristales y que requiere más tiempo en dicha solución.

Evitar la evaporación de los alcoholes manteniendo los frascos bien tapados.

Si el xilol se pone lechoso al introducir una lámina, esto indica que la lámina todavía contiene agua. Los pasos anteriores no han deshidratado correctamente.

Debe cambiar por lo menos el alcohol del paso anterior y el xilol y secar bien los frascos coplin antes de verter el nuevo.

El extendido no debe dejarse secar en ningún momento durante la coloración.

Los extendidos pueden permanecer toda la noche en cualquier cambio de alcohol al 70% o xilol. Para los otros cambios mantener el tiempo indicado.

REFERENCIAS:

Scholten T. y Yang S. Evaluation of unpreserved and preserved stools for the detection and identification of intestinal parasites. *American Journal of Clinical Pathology* 1974,62: 563-567.

Flournoy DJ, McNabbSJM, Dodd ED.. Rapid trichromestain. *Journal of Clinical Microbiology* 1982, 16:573-574.

Parasitologic Methods. Dept of Tropical Medicine, School of Public Health and Tropical Medicine, Tulane University 1996.

CRYPTOSPORIDIUMSPP.; OTROS APICOMPLEXA INTESTINALES

MÉTODO ACIDO RESISTENTE MODIFICADO

PROPÓSITO:

Poner en evidencia por medio de una coloración, los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. excretados por individuos infectados. Ooquistes de otros apicomplexa como *Isospora belli* y *Cydospora cayetanensis* también pueden colorearse con este método.

NOTA: *Weber y colaboradores hacen notar que según su experiencia, la coloración ácido-resistente modificada (ARM) presentó en forma significativa la más baja sensibilidad diagnóstica para ooquistes de Cryptosporidium spp. Ellos recomiendan una combinación de un método de concentración seguido de una coloración, sobretodo cuando se requiere un diagnóstico epidemiológico o clínico de una infección temprana o de personas excretoras asintomáticas. Además, podría resultar muy útil durante estudios terapéuticos contra criptosporidiosis.*

MUESTRA A EXAMINAR:

Heces frescas o fijadas en formalina al 10%, por lo general (según investigaciones en Honduras) de pacientes con gastroenteritis, niños inmunonormales entre 0-5 años de edad y pacientes de cualquier edad que presenten diarrea crónica y deficiencia inmunológica por cualquier razón. En algunas circunstancias {personas viviendo con SIDA}, puede utilizarse esputo, bilis, impronta de biopsia de mucosas.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Carbol-fucsina

Fucsina básica	4 g
Etanol al 95%	20 mL
Fenol (líquido o cristales)	8 g
Agua destilada	100 mL

Disolver los cristales de fucsina básica en el alcohol etílico, en un matraz de 250 mL de capacidad, agitar con una varilla de vidrio hasta disolución completa de la fucsina. Añadir el fenol, seguir mezclando y completar a 100 mL con agua destilada. Guardaren frasco tapado y rotulado. Solución lista para trabajar.

Alcohol etílico al 50%

Alcohol etílico puro	50 mL
Agua destilada	50 mL

Mezclar y guardar en frasco tapado y rotulado.

Diferenciador

Ácido sulfúrico concentrado	1.25 mL
Agua destilada c.s.p.	500 mL

Mezclar y guardar en frasco rotulado. Solución al 0.1 N lista para trabajar.

Azul de metileno alcalino

Azul de metileno en cristales	0.3 g
Alcohol etílico al 95%	30 mL

Mezclar hasta disolución de los cristales. Para alcalinizar, mezclar con 100 mL de solución acuosa de hidróxido de potasio (KOH) al 0.01%. Guardar en frasco tapado y rotulado. Solución lista para utilizar.

MATERIALES:

- Porta-objetos de 7.5 X 2.5 cm (3 X 1 pulgada)
- Aplicadores de madera
- Pipetas Pasteur con perilla
- Metanol puro
- Gasa quirúrgica en cuadrados o papel absorbente
- Aceite de inmersión
- Papel para limpiar lentes de microscopio

PROCEDIMIENTO:

- Identificar el porta-objetos con la muestra a examinar
- Heces formadas o blandas, sin moco:
 - tomar una porción cualquiera de las heces con un aplicador y hacer un extendido fino en el tercio medio del porta-objetos. Dejar secar
- Heces diarreicas con moco:
 - tomar del moco para hacer el extendido fino. Dejar secar
- Heces líquidas:
 - si hay moco, tomar de éste para hacer un extendido fino. Si no hay, mezclar las heces con una pipeta Pasteur y tomar una pequeña cantidad para hacer un extendido fino sobre un porta-objetos. O bien sin mezclar, aspirar una porción pequeña del sedimento y extender. Dejar secar
- Heces fijadas en formalina:
 - al 10% mezclar las heces y hacer un extendido fino sobre un porta-objetos. Dejar secar
- Fijar con metanol puro 30 segundos. Dejar secar -
- Introducir en carbol fucsina 5 minutos

- Ecurrir sobre gasa, introducir en alcohol etílico 3-5 segundos
- Enjuagar en agua corriente, escurrir sobre gasa
- Introducir en diferenciador ácido sulfúrico 01 N durante 8-10 segundos. Este es un paso crítico, por lo que debe asegurarse del tiempo necesario según sus reactivos
- Lavar en agua corriente por ambos lados, escurrir sobre gasa
- Introducir en azul de metileno alcalino 1 minuto Lavar, dejar secar y observar al microscopio óptico.

Para examinar la lámina, algunos autores recomiendan colocar una película muy fina de aceite sobre la coloración para buscar ooquistes rápidamente con el objetivo 40 X. Una vez que se encuentren cuerpos parecidos a ooquistes teñidos, asegúrese! diagnóstico cambiando para el objetivo de inmersión y medir los ooquistes, anotando su morfología.

CARACTERÍSTICAS DE LA COLORACIÓN:

Los ooquistes de *Cryptosporidium* se tiñen de rojo brillante, que se destacan sobre un fondo azul en coloraciones adecuadas. Su tamaño (4-6 μm) y su forma redonda son uniformes. A menudo se observa una vacuola y un granulo denso dentro del ooquiste, otras veces no se observa esto. Se diferencian de levaduras porque estas son más pequeñas, redondas o alargadas, a veces se observa la gemación y se tiñen de azul oscuro denso o de rosado. Los ooquistes del *belti* miden entre 18-25 μm , tienen forma de cigarro o de huso, el esporoblasto se colorea de rojo intenso, pero no siempre. Los ooquistes de *C. cayetanensis* miden de 8-10 μm , son redondos, no se colorean uniforme ni intensamente, algunos permaneces sin color, su contenido aparece granuloso o no revela ninguno; en ocasiones la pared del ooquiste se observa arrugada.

CONTROL DE CALIDAD:

Mantener una muestra de heces positiva fijada. Cada vez que se inicie un lote nuevo de cualquiera de los reactivos, colorear una preparación de esta muestra y verificar la calidad de la coloración. Asegurarse de rotularla como CONTROL para evitar confusiones.

Periódicamente colorear una preparación conocida positiva junto con las muestras de pacientes, debidamente rotulada, para verificar la calidad de la coloración.

OBSERVACIONES:

La expulsión de ooquistes en pacientes infectados es intermitente, por lo que es necesario repetir el examen durante algunos días. La cantidad de ooquistes presente puede ser escasa, por lo que se hace necesario concentrar la muestra y colorear el concentrado (ver método de Weber, a continuación). Heces de cualquier consistencia pueden contener ooquistes, no solamente las diarreicas o líquidas. Guardar las láminas positivas, debidamente rotuladas, para referencia y control.

REFERENCIAS:

Current W, and García L. Cryptosporidiosis. In: Clinics in Laboratory Medicine 1991, 11:(4). W.B. Saunders. Yezid Gutiérrez and Maurice Little Guest Editors, Philadelphia, 11 (4): 873-878

CRYPTOSPORIDIUMSPP.

MÉTODO DE CONCENTRACIÓN Y COLORACIÓN SEGÚN WEBER

PROPÓSITO:

Proveer una mejor sensibilidad en la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en toda muestra de heces. Esta nueva técnica: 1) descarta grasas y detritus de las heces, 2) separa los ooquistes del resto de las heces, 3) proporciona un sedimento con ooquistes concentrados, con el cual se preparan láminas para colorear y 4) permite recorrer más rápidamente las preparaciones coloreadas (**Figura 13, página 129**).

VENTAJAS:

Mejora la sensibilidad del diagnóstico de criptosporidiosis, colocando el umbral de detección* de ooquistes mucho más alto, sobretodo en pacientes asintomáticos, o que inician la infección; para encuestas epidemiológicas y para confirmar efectividad terapéutica.

DESVENTAJAS:

Más tiempo de centrifugación, más número de centrifugaciones, mayor pipeteo. Requiere de acetato de etilo. Debe probarse el método primero antes de decidir sobre su implementación.

MUESTRA A EXAMINAR:

Heces formadas (las mejores) o de otra consistencia, recolectadas en un frasco de boca ancha, con tapadera, limpio y seco, debidamente identificado.

PREPARACIÓN DE REACTIVO:

Solución saturada de cloruro de sodio

Mezclar suficiente cloruro de sodio en agua destilada hasta obtener una solución saturada. O bien, medir con un hidrómetro la gravedad específica de 1.20.

MATERIALES:

- Formalina al 10%
- Acetato de etilo
- Aplicadores de madera

Umbral de detección es el número mínimo de ooquistes que se pueden detectar en una muestra de heces, que en este método es de 5,000 por gramo.

- Pipeta Pasteur con perilla de hule o pipetas plásticas desechables
- Tubos cónicos de 15 mL de capacidad
- Solución saturada de cloruro de sodio
- Porta-objetos de 7.5 X 2.5 cm (3 X 1 pulgada)
- Cubre-objetos
- Agua deionizada
- Batería de coloración ácido-resistente modificada
- Balanza de dos platos para equilibrar tubos
- Frasco con desinfectante para descartar material

PROCEDIMIENTO:

- Identificar tubos y láminas con la muestra a examinar
- Suspender una pequeña cantidad de heces en formalina al 10% y emulsionar bien
- Agregar 4 mL de esta suspensión de heces, 6 mL de formalina al 10% y 3 mL de acetato de etilo en el tubo cónico previamente identificado. Equilibrar
- Mezclar vigorosamente por agitación durante 30 segundos
- Centrifugar a 500 rpm durante 5 minutos
- Decantar las 3 primeras capas formadas (de arriba hacia abajo)
- Resuspender el sedimento en 5 mL de agua deionizada
- Verter 5 mL de solución saturada de cloruro de sodio en otro tubo cónico
- Colocar el sedimento SOBRE la solución de cloruro de sodio por medio de una pipeta. Equilibrar (**Figura 13, pág. 129**)
- Centrifugar a 500 rpm durante 10 minutos
- Descartar los primeros 3.5-4 mL de la capa superior líquida
- El resto del sobrenadante y unos 0.5 mL de la siguiente capa se sacan con una Pipeta y se agregan unos 13 mL de agua deionizada. (**Figura 13**)
- Equilibrar
- Centrifugara igual velocidad por 10 minutos
- Decantar el sobrenadante
- Con alícuotas de 10 μ L del sedimento obtenido se hacen preparaciones para ver al microscopio, luego de cubrir con un cubre-objetos (**Figura 13**)
- Puede observarse al microscopio y reconocer ooquistes en fresco. Sin embargo, para asegurar el diagnóstico, deberá hacer una coloración ARM u otra de su preferencia.

REFERENCIAS:

- Weber R, Bryan RT, and Juranek D. (mproved stool concentraron procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts ín fecal specimens. Journal of Clinical Microbiology 1992, 30:2869-2873.

MICROSPORIDIA

COLORACIÓN MODIFICADA CON CROMOTROPO

PROPÓSITO:

Detectar esporas de microsporidia en materia fecal u otro tipo por microscopía óptica como un nuevo método no invasivo y práctico, cuando se sospecha esta infección en pacientes con diarrea crónica viviendo con SIDA o VIH positivos, desnutridos o en otros en quienes se sospeche la infección.

MUESTRA REQUERIDA:

Heces líquidas fijadas en formalina al 10% en la proporción 1:3
Aspirado duodenal fijado en formalina al 10%.
Orina

VENTAJAS:

Es un método fácil, rápido, no agresivo ni invasivo para el paciente, asiste en el diagnóstico de este grupo de parásitos en heces que de otro modo se informarían negativas, no requiere de ninguna concentración, pueden buscarse en aspirado duodenal, permite monitorear los ensayos con diferentes ajustes terapéuticos y mejorar la habilidad de seguir el curso natural de la enfermedad.

DESVENTAJAS:

Es indispensable tener láminas control positivas; requiere de colorantes y de alcohol puros, que aumentan el costo, algunos autores indican que es necesario confirmar el diagnóstico con microscopía electrónica, requiere de personal adiestrado en la técnica. Pueden haber falsos negativos, sobretodo cuando la excreción de esporas es baja.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Colorante de cromotrope

Cromotrope 2R	6.0 g
Fast green	0.15 g
Ácido fosfotungstónico	0.7 g
Ácido acético	3.0 g

Mezclarlos 3 primeros ingredientes con el ácido acético y dejar en reposo 30 minutos.

Agregar agua destilada 100 mL

Mezclar bien. Solución lista para usar. Guardar en frasco tapado y rotulado.

Alcohol ácido

Ácido acético	2.25 mL
Alcohol etílico al 90%	497.75 mL

Mezclar. Listo para usar. Guardar en frasco tapado y rotulado.

MATERIALES:

- Porta-objetos de 7.5 X 2.5 cm (3 X 1 pulgada)
- Cubre-objetos 22 X 22 mm, No.1
- Aplicadores
- Metanol absoluto
- Permount
- Alcohol etílico puro de 95%
- Alcohol etílico puro de 100%
- Xilol (o tolueno, sustituto)
- Frascos coplin de coloración

PROCEDIMIENTO:

- Identificar la lámina con la muestra a diagnosticar
- Hacer un extendido muy fino con la suspensión de heces. Dejar secar
- Fijar en metanol puro durante 5 minutos
- Colorear con cromotrope durante 90 minutos
- Enjuagaren alcohol ácido 10 segundos
- Enjuagar brevemente en alcohol al 95%
- Deshidratar en alcohol al 95%, 5 minutos
- Deshidratar en alcohol 100%, 10 minutos
- Xilol (o sustituto) 10 minutos
- Cubrir con una gota de permount y un cubre-objetos
- Examinar bajo inmersión

RESULTADO DE LA COLORACIÓN:

Esporas de *Enterocytozoon bieneusi* se observan de forma ovoide, refráctiles, con la pared teñida de rosado brillante. Algunas esporas pueden aparecer transparentes, o de color rosado rojizo, con un tamaño aproximado de 1.5 µm X 0.9 µm. Esporas de *Encephalitozoon intestinalis* miden 2.2 X 1.2 µm. Las bacterias y el material de fondo se tiñen de verde. A veces levaduras y otras estructuras toman la tinción y se diferencian por su tamaño más grande y color más intenso.

REFERENCIA:

Weber R, Bryan R, Owen R, Wilcox M, Gorelkin L, Visvevara G. Improved light microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The New England Journal of Medicine 1992;326: 161-166.

MICROSPORIDIA

MÉTODO AZUL DE METILENO-TRICROMO

PROPÓSITO:

Para el diagnóstico de microsporidias intestinales en heces de personas viviendo con SIDA y otras. La coloración se adaptó para países en desarrollo. Es más rápida sin perder eficiencia y no requiere de equipo adicional. Puede ser aplicada en laboratorios de parasitología clínica con mucho volumen de trabajo y puede facilitar el trabajo epidemiológico de microsporidiasis. Puede haber falsos negativos.

MUESTRA:

Heces frescas o fijadas.

PREPARACIÓN DE COLORANTES:

Azul de metileno:

Azul de Metileno en polvo	0.3 g
Etanol 95%	30 mL

Hidróxido de potasio 0.01 % {0.05 g de KOH en 500 mL de agua destilada)
 Disolver el azul de metileno en el etanol, agregar el hidróxido de potasio y mezclar bien. Guardar en frasco oscuro, rotulado, a temperatura ambiente. Dura semanas.

Tricromo:

Cromotrope 2R	6.0 g
Azul de metileno	0.3 g
Ácido fosfotungstónico	0.7 g
Ácido acético glacial	3.0 mL

Mezclar los primeros 3 ingredientes en un frasco de vidrio de 250 mL de capacidad. Agregar el ácido acético glacial y dejar en reposo 30 minutos. Agregar 100 mL de agua destilada, mezclando con una varilla de vidrio para disolver los cristales. Guardar en frasco oscuro protegido de luz intensa.

Alcohol ácido:

Ácido acético glacial	4.5 mL
Etanol 90%	995.5 mL

Mezclar y guardar en frasco rotulado.

MATERIALES:

Porta-objetos de 7.5 X 2.5 cm (3 X 1 pulgada)
Cubre objetos
Aplicadores de madera
Lápiz de diamante para identificar
Frascos Coplin para coloración
Alcohol ácido
Etanol 95%
Etanol 100%
Xilol
Aceite de inmersión

PROCEDIMIENTO:

Preparar un extendido muy fino de una muestra de heces previamente fijada en formalina salina al 10% (proporción 1:3). Dejar secar.

Fijar en metanol absoluto durante 3 minutos.

Colorear con azul de metileno 3 minutos. Enjuagar en agua corriente.

Colorear con tricromo por 10 minutos.

Enjuagar en alcohol ácido 5 segundos.

Enjuagar en etanol al 95% 1 minuto.

Deshidratar en alcohol al 95% y al 100%, 1 minuto cada uno.

Deshidratar en xilol o su equivalente por 10 minutos.

Cubrir con permount, dejar secar y examinar bajo objetivo de inmersión.

CARACTERÍSTICAS DE LA COLORACIÓN:

Las esporas de microsporidias aparecen como cuerpos ovoides, refráctiles, de color púrpura-rosado brillante. Puede verse en algunas una faja oscura cruzando la espora en diagonal. *Enterocytozoon bienewisi* mide 1.5 X 1.0 µm y las de *Encephalitozoon intestinalis* 2.2 X 1.2 µm. Las bacterias y levaduras se tiñen de azul.

REFERENCIA:

Sianongo S, McDonald V, and Kelly P. A method for diagnosis of microsporidiosis adapted for use in developing countries. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2001,95:605-607.

**PARÁSITOS TRANSMITIDOS
POR VECTORES Y OTROS**

CONCENTRACIÓN Y COLORACIÓN DE MICROFILARIAS DE *WUCHERERIA BANCROFTI* Y *BRUGIA MALAYI*

MÉTODO DE KNOTT

PROPÓSITO:

Demostrar microfilarias en sangre circulante, sobre todo cuando la densidad de las mismas es muy baja. La formalina al 2% hemolisa los glóbulos rojos, facilitando la observación de las microfilarias inmóviles. Para diferenciar entre especies es necesario colorear la preparación.

MUESTRAS REQUERIDAS:

Sangre recolectada por punción venosa y colocada en: a) un tubo con citrato como anticoagulante para analizarla después; b) directamente en un tubo con 10 mL de formalina al 2% para trabajo inmediato. Otros anticoagulantes como heparina o EDTA pueden utilizarse con iguales resultados. Linfa y orina.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Formalina al 2%

Formalina	2 mL
Agua destilada	98 mL

Mezclar bien. Utilizar 10 mL por cada 1 mL de sangre.

(i)Colorante de Giemsa

Colorante de Giemsa diluido 1:50 con agua buferada pH 7.2 (Ver Malaria para la preparación del buffer, página 88).

Bufer alcalino, solución madre:

Na ₂ HPO ₄ (fosfato de sodio dibásico)	9.5 g.
Agua destilada	1,000 mL

Mezclar bien y guardar en frasco tapado y rotulado.

Bufer ácido, solución madre:

NaH ₂ PO ₄ (fosfato de sodio monobásico)	9.2 g.
Agua destilada	1,000 mL

Mezclar bien y guardar en frasco tapado y rotulado.

Para preparar el agua buferada, mezclar (as soluciones de acuerdo al cuadro abajo (para 200 mL de búffer). Para preparar buffer de pH diferente, consultar la tabla abajo.

pH	Solución de fosfato sodio dibásico (mL)	Solución de fosfato de sodio monobásico (mL)	Agua destilada (mL)
6.8	10.0	10.0	180
7.0	12.2	7.8	180
7.2	14.3	5.7	180

(ii) Colorante de hematoxilina de Delafield

Cristales de hematoxilina	4 g.
Alcohol etílico al 95%	125 mL
Solución saturada de sulfato de aluminio y amonio; [AlNH ₄ (SO ₄) ₂ · 12H ₂ O]	400 mL
Glicerina pura	100 mL
Solución acuosa al 0.1 % de ácido clorhídrico líquido	
Amonio líquido - gotas	

Disolver los cristales de hematoxilina en 25 mL de alcohol etílico al 95%. Añadir esto a 400 mL de solución saturada de sulfato de aluminio y amonio. Colocar en frasco con tapón de algodón y exponer a la luz y aire por 3-5 días. Filtrar y añadir 100 mL de glicerina y 100 mL de alcohol etílico al 95%. Tapar y dejar reposar a la luz varios días. Filtrar y guardar en frasco bien tapado y rotulado.

Anticoagulante de citrato al 2%:

Citrato de sodio	2 g.
Solución salina 0.85%	98 mL Mezclar bien. Tomar 1 mL por cada 5 mL de sangre.

MATERIALES;

Pipetas Pasteur
 Bulbo de goma para pipetas
 Porta-objetos de 7.5 X 2.5 cm (3 X 1 pulgada) nuevos y limpios
 Colorante de Giemsa (para utilizar en i)
 Colorante de hematoxilina de Delafield (para utilizar en ii)
 Permout
 Xilol
 Cubre-objetos 22 X 30 mm. No.1
 Tubos cónicos de centrifuga, 15 mL de capacidad, o tubos de 13 X 100 mm de fondo redondo

PROCEDIMIENTO:

Rotular cada tubo con los datos más importantes de cada paciente a examinar.

- Obtener 1 mL de sangre por punción venosa, o 1 mL de la sangre con anticoagulante y mezclar en el tubo rotulado con 10 mL de formalina al 2% para iniciar hemolisis. Mezclar muy bien.
- Centrifugar a 1,500 rpm por 2 minutos.
- Decantar el sobrenadante cuidando de no revolver el sedimento en el fondo del tubo.
- Con una pipeta Pasteur tomar una muestra del sedimento, colocar una porción sobre un porta-objetos, cubrir con cubre-objetos y examinar al microscopio con objetivo 10X.
- Con la otra porción del sedimento, hacer un extendido fino en lámina previamente identificada y dejar secar completamente a temperatura ambiente.
- Colorear con (i) Giemsa para distinguir las diferentes células y poros y con (ii) hematoxilina Delafield para reconocer la vaina cuando presente.

(i) Coloración con Giemsa

Para un tiempo de coloración de 45 minutos: mezclar una parte del colorante Giemsa con 50 partes de agua buferada (pH 6.8 al 7.2).

Para un tiempo de coloración de 20 minutos: mezclar una parte de colorante de Giemsa en 20 partes de agua buferada { pH 6.8 al 7.2).

Fijar el extendido fino ya seco en metano! durante 30 segundos.

Dejar secar.

Introducir en frasco con colorante de Giemsa, esperar el tiempo, indicado según la dilución preparada.

Lavar la preparación en agua buferada o agua corriente. Dejar secar. Examinar al microscopio óptico.

Reacción:

El cuerpo de la microfilaria, la célula excretora y las células Rseñen de azul púrpuro; el poro excretor y el poro anal se verán rosados o rojos. La vaina de *W. bancrofti* se verá rosado suave o a veces no severa. La vaina de **Brugia** tendrá un color rosado brillante; la de **Loa loa** no se tiñe con Giemsa.

(ii) Coloración con hematoxilina de Delafield

Fijar la preparación del sedimento en alcohol etílico 95% caliente (60°C) durante 10-15 minutos.

Ecurrir el alcohol y colocar la preparación en hematoxilina de Delafield, en un coplin o en bandeja inclinada, durante 10-15 minutos.

Lavar la preparación en agua corriente.

Diferenciar introduciendo la preparación en solución acuosa al 0.1 % ácido clorhídrico durante un minuto.

Azulear la preparación en agua con algunas gotas de amonio durante 5 minutos.

Enjuagar en agua corriente 2 minutos.

Deshidratar en varios cambios de alcohol (del 50% al 90%) por 2 minutos por cambio. Colocar la preparación en 2 cambios de alcohol etílico absoluto durante 5 minutos por cambio.

Deshidratar en 2 cambios de xilol, 5 minutos por cambio. Colocar una gota de Permunt y cubrir con cubre-objetos No. 1. Dejar secar. Examinar al microscopio a 10X o más.

Reacción:

Esta es la coloración más eficiente para demostrar la vaina (en el caso de microfilarias con vaina).

REFERENCIA:

Tulane University, School of Public Health and Tropical Medicine, Department of Tropical Medicine. Parasitologic Methods. 1996.

DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE LA MALARIA

GOTA GRUESA Y EXTENDIDO FINO

PROPÓSITO:

Colorear estadios de *Plasmodium* spp. en sangre circulante de pacientes infectados, enfermos y portadores, para ofrecer un diagnóstico de laboratorio oportuno y confiable.

PRINCIPIO:

Es posible preparar dos tipos de muestra de sangre para el diagnóstico de la malaria: 1} el extendido fino que consiste de una sola capa de células, extendidas en un porta-objetos, y 2) la gota gruesa que consiste de varias capas de células en una extensión menor. La identificación de los parásitos se basa en 1) la apariencia de los mismos, ya sea intracelulares en el eritrocito {extendido fino) o libres (gota gruesa) y, más importante 2) en la coloración de los componentes del parásito. Una vez hecho el diagnóstico de malaria, el uso combinado de ambas muestras también permite identificar la especie de *Plasmodium* y hacer un cálculo de la intensidad de la infección (parasitemia). Además, es necesario conocer los elementos formes de la sangre que se observan en los dos tipos de muestra: leucocitos polimorfonucleares y mononucleares, plaquetas y eritrocitos (extendido) o restos de eritrocitos (gota gruesa). A continuación se presentan dos coloraciones que pueden utilizarse, la de Giemsa (gota gruesa y extendido fino) y la de Wright (extendido fino).

VENTAJAS:

La microscopía es un método sensible y específico para identificación de especies y estadios de *Plasmodium*. Puede además proporcionar información sobre la viabilidad de los parásitos y esto, sumado a la estimación de la parasitemia, es útil para evaluar la respuesta al tratamiento. Debido a la relativa sencillez de la técnica, es posible entrenar personal comunitario para la toma de muestras, su almacenamiento y transporte posterior para su procesamiento y lectura por personal capacitado. La gota gruesa es 20-30 veces más densa que el extendido y por lo tanto más sensible. El umbral teórico de detección de la gota gruesa es cuatro parásitos/ul de sangre (100 campos/objetivo de inmersión = 0.25 ul de sangre). El extendido fino permite la especiación de *Plasmodium*, ya que el glóbulo rojo ha sido fijado y el parásito en su interior mantiene intactos los componentes de cada fase y características específicas.

DESVENTAJAS:

La toma de la muestra y su procesamiento puede ser relativamente sencillo, así como la lectura de las láminas coloreadas por un microscopista capacitado, pero el factor humano hace que la calidad de la técnica sea variable. De esa manera se puede observar personal con la misma capacitación desempeñando sus funciones con diferentes niveles de responsabilidad. Aún un microscopista responsable y muy capacitado tiene un límite de láminas por día que puede examinar con precisión. Además, se necesita un microscopio

con objetivo de inmersión, en buen estado y con buen mantenimiento. La calidad y reproducibilidad del colorante son factores críticos.

NOTA: *En la actualidad están disponibles una variedad de técnicas que son más sensibles o más rápidas que la microscopía, por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa, basada en la amplificación de ADN de Plasmodium, y las pruebas rápidas a base de cintas reactivas o dipsticks, sustentadas en la captación de antígeno del parásito por anticuerpos monoclonales impregnados en una cinta de nitrocelulosa. Aunque estas técnicas no poseen las características operativas que les permita sustituir el diagnóstico microscópico, en ciertas condiciones clínicas y epidemiológicas pueden fortalecer el diagnóstico de la malaria desde el punto de vista individual o de salud pública.*

MUESTRA:

Sangre periférica del dedo (pinchazo con lanceta) o sangre venosa recién tomada son las mejores muestras. También es posible usar sangre anticoagulada, pero en el caso de la gota gruesa la muestra se debe dejar secar por más tiempo (10 minutos adicionales) o intensificar el proceso de secado con calor (plancha a aproximadamente 60°C). Se recomienda preparar en un mismo portaobjetos la gota gruesa y el extendido fino, y colorearlos simultáneamente utilizando la coloración de Giemsa.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

1] Coloración de Giemsa

Solución de Giemsa

Giemsa en polvo (certificado)	0.6 g
Glicerina pura	50.0 mL
Alcohol metílico puro, absoluto	50.0 mL

Mezclar el Giemsa en polvo poco a poco con la glicerina en un mortero. Recoger en un erlenmeyer que contenga cuentas de vidrio y disolver a baño maría a 55-60°C por dos horas, agitar suavemente a intervalos de 30 minutos. Con el alcohol metílico se lava los restos de reactivo que quedaron en el mortero y se recogen en una botella. Esperar que la mezcla del baño maría se enfríe para agregarle el alcohol. Mezclar y agitar bien, filtrar (papel Whatman No. 1) en una botella oscura que contenga cuentas de vidrio y que pueda cerrarse herméticamente. Almacenar durante al menos 2 semanas antes de usarlo. Mantenerse siempre bien tapado. Cuando se prepara una mayor cantidad, se recomienda fraccionar el colorante en varias botellas, bien rotuladas y enumeradas.

Solución amortiguadora

Na ₂ HPO ₄ (Solución alcalina)	9.5 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver la sal (fosfato sódico dibásico) en una pequeña cantidad de agua destilada. Una vez disuelta agregar agua hasta completar 1000 mL. Mezclar bien y guardar en frasco rotulado.

NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O) (Solución ácida)	9.2 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver la sal (fosfato sódico monobásico) en una pequeña cantidad de agua destilada. Una vez disuelta agregar agua hasta completar 1000 mL. Mezclar bien e identificar. Esta sal se puede sustituir por fosfato potásico (KH₂PO₄).

La solución amortiguadora se prepara a partir de estas dos soluciones mezcladas en proporciones que producen un pH en el rango de 7.0 a 7.2. En el siguiente cuadro se señalan las proporciones.

pH	Solución Alcalina	solución Ácida	Agua destilada(mL)
	Na ₂ HPO ₄ (mL)	Na ₂ HPO ₄ (mL)	
6.8	49.6	50.4	900
7.0	61.0	39.0	900
7.2	72.0	28.0	900

Para preparar 50 mL de solución amortiguadora pH 7.0, las proporciones son: 3 mL de solución alcalina y 2 mL de solución ácida y completar a 50 mL con agua destilada.

2] Coloración de Wright

Solución de Wright

Wright en polvo (certificado)	0.9 g
Alcohol metílico puro, absoluto	500.0 mL

Mezclar el Wright poco a poco con el metanol en un mortero, e ir recogiendo en una botella que cierre herméticamente. Almacenar por al menos cinco días, agitando la botella diariamente. Permita que el precipitado se asiente y recoja el sobrenadante de manera fraccionada en botellas oscuras, bien identificadas y enumeradas. La solución que está en uso se debe colocar en una botella con gotero. Para colorear utilizar solución amortiguadora de pH 6.8.

MATERIALES:

- Bloque de madera o plástico con hendiduras para secar porta-objetos
- Recipiente o plato cóncavo para colorear
- Porta-objetos limpios y libres de grasa
- Lápiz carbón
- Lanceta, algodón (o gasa) y alcohol al 70%
- Alcohol metílico puro, absoluto
- Agua destilada
- Botellas de vidrio, cilindros graduados, cuentas de vidrio
- Soluciones amortiguadoras

- Solución de Giemsa o bien
- Solución de Wright
- Contador manual

PROCEDIMIENTO:

Preparación de la Gota Gruesa

1. Tener todos los materiales listos. Es importante que el porta-objetos se encuentre limpio, libre de grasa que interfiera con la adhesión de la sangre al porta-objetos (o con el deslizamiento de la misma en el caso del extendido).
2. Frotar enérgicamente la yema del dedo del paciente (se prefiere el tercer dedo de la mano izquierda, talón en caso de niños pequeños o lóbulo de la oreja) con algodón humedecido con alcohol al 70%. Secar con algodón seco. El dedo se sostiene enérgicamente (importante en caso de niños) y se pincha en forma rápida. La primera gota de sangre se seca con algodón seco.
3. Se utilizan dos porta-objetos. En el centro de uno de ellos se deposita la gota de sangre que se obtiene por presión leve en el dedo. Sobre la superficie de trabajo y usando la esquina del segundo porta-objetos extender la sangre de manera que forme un rectángulo de grosor uniforme.
4. Dejar secar la muestra y si es posible, intensificar el proceso de secado agregando calor.

Coloración de Giemsa

Solución de trabajo: 1 gota de solución de Giemsa por cada mililitro de solución amortiguadora o 1 ml de solución de Giemsa en 20 ml de solución amortiguadora para colorear unas 10 láminas porta-objeto (~ 2ml/lámina). **No es posible colorear una gota gruesa con coloración de Wright.**

5. Colocar el porta-objetos en un recipiente de coloración o con la muestra hacia la concavidad del plato de colorear. Deslizar la solución de trabajo recién preparada por debajo del porta-objetos hasta que se llene la depresión, eliminando las burbujas. Colorear durante 8 minutos.
6. El exceso de colorante se lava sumergiendo con delicadeza el porta-objetos en un recipiente con agua corriente. Sí el agua corriente no es de buena calidad, utilizar agua destilada.
7. La muestra se puede secar con aire o calor moderado. Observar con aceite de inmersión.

Preparación de un Extendido Fino

8. Observar pasos 1 y 2. Después de preparar la gota gruesa, se puede realizar un extendido fino en la otra mitad del mismo porta-objetos o utilizar un porta-objetos nuevo. Cuando el extendido fino se seca, se puede utilizar su extremo grueso para identificar la muestra con un lápiz carbón o de grafito.
9. Se utilizan dos porta-objetos. Al colocar la gota de sangre en uno de ellos, el borde angosto del segundo porta-objetos se coloca en un ángulo de 30 grados, se mueve hacia atrás hasta que toca la gota de sangre y entonces se desliza hacia adelante para que la sangre que está atrás se extienda. La gota de sangre debe ser pequeña de tal manera que sea totalmente extendida antes de llegar al final del porta-objetos. Este extremo del extendido fino debe tener el grosor de una sola capa de eritrocitos.

Coloración de Giemsa

Utilizar la solución de trabajo descrita arriba.

10. El extendido fino seco se fija cubriéndolo con 2-3 gotas de alcohol metílico, dejándolo secar nuevamente. Cuando se prepare la gota gruesa y el extendido fino en un mismo porta-objetos, una vez que ambos ya están secos, proceder a fijar el extendido fino. Para ello, colocar el porta-objetos en posición vertical en el bloque para secar con la gota gruesa hacia arriba y el extendido hacia abajo y con ayuda de una pipeta Pasteur, verter algunas gotas de alcohol metílico puro sobre el extendido fino.
11. Colorear la lámina en plato cóncavo, como en el paso 5.
12. Lavar el exceso de colorante como en el paso 6.
13. La muestra se puede secar con aire o calor moderado. Observar con aceite de inmersión.

Coloración de Wright

14. No es necesario fijar con metanol el extendido fino puesto que la solución de Wright contiene suficiente cantidad de metanol para fijar y colorear la muestra simultáneamente.
15. Agregue cuantas gotas del colorante sean necesarias para cubrir la muestra. Coloree por 1-3 minutos (el tiempo óptimo de coloración variará con cada botella de colorante).
16. Agregue un número igual de gotas de solución amortiguadora pH 6.8 sobre la muestra, asegurándose que el colorante y la solución de mezclan (puede ayudar soplando sobre la superficie). Colorear durante 4-8 minutos.
17. Lavar agregando suavemente agua corriente con una pizeta. Dejar secar y observar con aceite de inmersión.

INTERPRETACIÓN:

Parásitos: Se deben observar tres componentes en todos los estadios, excepto en los anillos los cuales no contienen pigmento: el citoplasma azul, la cromatina rojo/morado, y los granulos amarillo-café del pigmento malárico.

Considerar la apariencia de los parásitos (gota gruesa y extendido fino).

Estadios presentes

Tamaño relativo y número de puntos de cromatina en los anillos

Forma de los trofozoítos maduros: ameboide, en banda

Número de merozoítos en los esquizontes

Forma de los gametocitos

Presencia de pigmento malárico

Considerar morfología de eritrocitos (extendido fino).

Tamaño y forma del eritrocito parasitado comparado con los eritrocitos no parasitados

Punteado sobre la superficie de eritrocitos parasitados

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA MUESTRA Y LA COLORACIÓN

El examen de las muestras debe comenzar sistemáticamente por el análisis de los elementos de la sangre y de los parásitos, con respecto a la forma y a la coloración. **Extendido fino.** Grosor: una sola capa de células. Coloración: eritrocitos, azul a Rosado; plaquetas, Rosado

intenso a morado; núcleo de leucocitos, azul intenso a morado; granulos de leucocitos: Rosado, azul y morado en la misma célula (neutrófilos), rojo (eosinófilos); citoplasma de leucocitos, azul pálido a azul. **Gota gruesa.** Grosor: de 10 a 20 leucocitos por campo de inmersión. Coloración: fondo de la muestra debe ser claro; restos de eritrocitos, azul; plaquetas y leucocitos, como descritos para el extendido fino.

CÁLCULO DE LA PARASITEMIA:

Este es un cálculo semicuantitativo. Se asumen concentraciones constantes de los eritrocitos (5, 000,000/ul de sangre) y de los leucocitos (8,000/ul); en ocasiones se podrá contar con el conteo real de células del paciente. Se cuentan y se informan los conteos de estadios asexuales y sexuales (gametocitos) de forma independiente. Los eritrocitos infectados por más de un parásito se cuentan como uno. Usar un contador manual.

Extendido fino: Parásitos/10,000 eritrocitos. Calibración del microscopio: Localizar una porción del extendido en que los campos microscópicos sean homogéneos en cuanto al número de eritrocitos (generalmente donde éstos están uno a lado del otro); contar el número de eritrocitos en un campo. Dividir 10,000 por el número de eritrocitos contados en el campo y el resultado es el número de campos que se deben examinar. Ejemplo: 280 eritrocitos/campo, se deben contar 35.7- 36 campos. Si se contaron 160 parásitos de estadio asexual/36 campos- 160 parásitos/10,000 eritrocitos = 1.6 parásitos/100 eritrocitos = 1.6% parasitemia. Si hay 5,000,000 de eritrocitos en 1 uL de sangre, al dividirlo por 10,000 nos da un factor de dilución de 500. Entonces, 160 parásitos X 500= 80,000 parásitos/uL de sangre.

Gota gruesa: Se cuentan leucocitos y parásitos simultáneamente. El conteo se detiene cuando se cuentan 100 leucocitos y se han identificado 10 parásitos, o más. En el caso de haber identificado menos de 10 parásitos el conteo se detiene al alcanzar 500 leucocitos (por supuesto, si un campo se está aún examinando cuando se alcanzó cualquiera de estas cifras, se debe terminar de examinarlo). Se aplica entonces la fórmula: parásitos contados X 8,000 leucocitos Adividido por) leucocitos contados y el resultado se redondea a los dos dígitos primeros (16 = 16, 168 = 160, 1685 = 1600). Ejemplo: Si se contaron 82 parásitos y 100 leucocitos, $82 \times 8,000/100 = 6,560$ - 6,500 parásitos/ul de sangre.

SISTEMA DE CRUCES:

1] Método más simple aplicado a la gota gruesa (OMS):

+	=	1-10 parásitos/100 campos
++	=	11 -100 parásitos/100 campos
+++	=	1-10 parásitos/campo
++++	=	más de 10 parásitos/campo

2] Otro sistema de cruces que permite mayor número de categorías:

1-40	=	1 -40 parásitos en 100 campos
1/2 +	=	41-60 parásitos en 100 campos
+	=	60-100 parásitos en campos
++	=	2-20 parásitos por campo
+++	=	> 20 parásitos por campo
++++	=	incontables por campo

Otras pruebas diagnósticas utilizadas en malaria.

Se denominan Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR*), aquellas en donde se ha sustituido el diagnóstico microscópico por la detección de antígenos derivados de parásitos de la malaria en sangre hemolisada, utilizando métodos inmunocromatográficos. Tienen las ventajas de ofrecer resultados en 15 minutos, no requieren de equipo especial ni de electricidad, pueden detectar *P. falciparum*, aún cuando el parásito se encuentre atrapado en tejidos, facilitan el adiestramiento del personal, aún aquel voluntario, en pocas horas, son fáciles de ejecutar, la sensibilidad es uniforme y alta en presencia de infecciones con 100 parásitos/ μ L o más (> 90%).

La decisión de escoger otras opciones de diagnóstico, diferentes de la microscopía, dependerán de condiciones endémicas, geográficas, económicas, de infraestructura y la accesibilidad de los diferentes métodos. Las pruebas RDT viene en estuches comerciales cuyo costo oscila entre US\$0.60 - 2.50 por cada prueba y básicamente consisten de:

- a) Tomar una muestra de sangre capilar (dedo de la mano, talón del pié en niños pequeños, etc.), sobre una tira o cinta reactiva (dipstick) preparada y provista por el fabricante;
- b) Mezclar dicha muestra con una solución buffer que tiene un compuesto para hemolizar la sangre y un anticuerpo específico sobre la cinta, marcado con una sustancia detectable a simple vista;
- c) La sangre lisa y los otros reactivos migran por capilaridad en lacinia, permitiendo que el o los antígenos presentes en la sangre se unan con los anticuerpos en la cinta reactiva;
- d) Al añadir un buffer de lavado para remover la hemoglobina, se visualizan las líneas de anticuerpo en lacinia, para la captura del antígeno que se busca. Esto se ejemplariza en la **Figura 14** de la pág. 130.

Como toda prueba de laboratorio para el diagnóstico de parásitos, las RDT tienen también sus desventajas:

- a) La sensibilidad es problemática en áreas no inmunes, sobretodo en lugares donde hay malaria y existen otras especies de *Plasmodium*.
- b) En casos de parasitemias bajas como en casos subclínicos, la sensibilidad se reduce por los portadores asintomáticos.
- c) El reconocimiento de gametocitos de *Plasmodium* por medio de las tiras reactivas tienen un significado clínico y epidemiológico importante y requiere de interpretación.
- d) Ofrecen estimados crudos sobre la densidad parasitaria y no son cuantitativas.
- e) La persistencia de antigenemia, cuando ya desapareció la parasitemia periférica, en algunos casos reduce su utilidad para poder monitorear la respuesta a drogas.
- f) Una prueba RDT negativa exige una confirmación microscópica.
- g) Su costo es más elevado.

Existen otros métodos de diagnóstico no microscópico de la malaria; sin embargo, no se adaptan para aplicar en el campo o para el manejo clínico rutinario de la enfermedad.

- Algunos, como el QBC, que utiliza fluorocromos como naranja de acridina en extendidos o en capilares con sangre, es muy costosa y requiere de mucho equipo especial.
- Las técnicas por PCR son más sensibles y específicas, pero son más demoradas, requieren personal y equipo altamente especializado y condiciones de laboratorio que no se prestan para trabajo de campo.

- La detección de anticuerpos por métodos serológicos mide únicamente la presencia de anticuerpos de exposiciones anteriores, pero que no indican una infección actual. Actualmente el método recomendado, y la regla de oro en uso, para el diagnóstico rutinario de malaria sigue siendo la detección del parásito en preparaciones de gota gruesa y extendido fino, coloreadas por Giemsa. También se sabe que este método es difícil, demorado y requiere de personal muy bien adiestrado, requiere de reactivos y suministros constantes, de un microscopio en excelente estado y un control de calidad. El acceso a pruebas RDT ha permitido reforzar el diagnóstico y por ende un tratamiento más temprano y acertado al ofrecer otras opciones, las cuales son aplicables en situaciones especiales, tales como las enumeradas y detalladas en la consulta informal de la OMS/USAID, mencionada al inicio y que se listan a continuación:
- Son recomendadas en comunidades remotas o en poblaciones muy móviles, donde no existe un diagnóstico de laboratorio y donde los pacientes no tienen un acceso adecuado a facilidades de salud.
- El RDT se puede utilizar cuando en una región existe la resistencia a drogas y éstas deben ser utilizadas o hacer combinaciones de las mismas, siendo más costosas que las pruebas diagnósticas.
- Un diagnóstico y tratamientos tempranos es importante en situaciones de baja transmisión de malaria, donde las personas están a riesgo de desarrollar malaria severa por sus bajos niveles de inmunidad.
- En situaciones de emergencia, tales como condiciones ambientales catastróficas o conflictos bélicos que crean facilidades para la introducción y diseminación de la malaria.
- Cuando se producen cambios ambientales o migración de poblaciones que favorecen el apareamiento de epidemias, las pruebas RDT pueden ayudar a reforzar el diagnóstico microscópico y para ayudar a un rápido diagnóstico clínico.
- En aquellos viajeros, sobretodo, hacia países endémicos, que por ser no inmunes a la malaria pueden desarrollar enfermedad fatal rápidamente.
- En militares y otros desplazados a zonas de conflicto, en donde no se encuentra un laboratorio o falta el personal especializado.

REFERENCIAS:

- López-Antuñano FJ y G Schmunis, eds. Diagnóstico de Malaria. Organización Panamericana de la Salud 1988; Publicación Científica No. 512.
- Ash LR and TC Orihel: Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press, Chicago, 1991.
- Alger J. Diagnóstico microscópico de la malaria: gota gruesa y extendido fino. Revista Médica Hondureña 1999; 67:216-218.
- Alger J. Densidad parasitaria en Malaria: métodos de determinación y su interpretación. Revista Médica Hondureña 2001; 69:118-120.
- Palmer CJ, Lindo S, Klaskala wl, Quesada J, Kaminsky R, BaumMand Ager A. Evaluation of optiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. Journal of Clinical Microbiology 1998, 36:203-206.
- World Health Organization 2000.WHO/MAL/2000.1091. New perspectives in malaria diagnosis. World Health Organizatiobn, Geneva, Switzerland.

TRYPANOSOMA CRUZI

DIAGNOSTICO PARASITOLÓGICO

MÉTODO DIRECTO PARA EXAMEN MICROSCÓPICO DE SANGRE

PROPÓSITO:

Identificar tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* en sangre circulante durante el período agudo de la enfermedad (primeras 6-8 semanas después de la infección).

PRECAUCIÓN:

Todo personal de laboratorio que trabaja con muestras procedentes de pacientes sospechosos de tener tripanosomiasis americana o muestras de cultivos de *T. cruzi* debe tomar medidas de seguridad y buena práctica de laboratorio.

Los tripomastigotes son altamente infectantes y algunas cepas del parásito son más virulentas que otras.

OPCIONES PARA EXAMEN MICROSCÓPICO DE LA SANGRE:

Se puede examinar la sangre por: Cota gruesa Extendido fino Concentración de Strout Preparación de capa de leucocitos

La ejecución de las dos últimas opciones 3 y 4 requieren tener acceso a una buena centrífuga o una microcentrífuga.

El Laboratorio Central del Ministerio de Salud (jefe: Dra. María Luisa Matute) proporcionó la técnica que ellos utilizan para la detección de *T. cruzi*, que se ofrece al final.

NOTA; *El examen más sencillo es el de examinar una gota de sangre en fresco del individuo sospechoso (tomada por punción capilar) entre porta y cubre o coloreada, todos los días por algunos días, para reconocer tripanosomas móviles.*

1.- GOTA GRUESA Y EXTENDIDO FINO.

MUESTRA REÓQUERIDA:

Seguir las mismas indicaciones que para un diagnóstico de malaria, en cuanto a la preparación y coloración de la gota gruesa y extendido fino (Página 90). Una vez preparados éstos, examinar la muestra bajo objetivo de inmersión buscando tripomastigotes en forma de C o de U que miden alrededor de 21 micras, tres veces el diámetro de un eritrocito.

2.- MÉTODO DE STROUT:**Muestra requerida:**

5 mL de sangre del paciente a investigar, recogida en tubo de ensayo sin anticoagulante.

MATERIALES:

- Batería para coloración de Giemsa. (Ver laboratorio para diagnóstico de Malaria, página 88)
- Pipetas Pasteur
- Bulbo para pipetas
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- Porta objetos limpios
- Centrífuga
- Aplicadores de madera

PROCEDIMIENTO:

- Cuando se forma el coágulo, removerlo con un aplicador y centrifugar el suero a poca velocidad (1,000 rpm) por 5 minutos para separar los glóbulos rojos.
- Con una Pipeta Pasteur, pasar el sobrenadante a un tubo de ensayo limpio.
- Centrifugar el suero a mayor velocidad (6,000 rpm) por 5-10 minutos para concentrar los parásitos en el sedimento.
- Con una pipeta Pasteur remover el sobrenadante a otro tubo o descartarlo en un frasco con desinfectante y con el sedimento se puede:
 - a) examinar una gota entre porta y cubre, buscando tripomastigotes activos o
 - b) hacer extendidos en porta-objetos limpios y secos y colorearlos con Giemsa (igual método que para malaria, pagina 90). Una vez coloreados
- Examinar las coloraciones al microscopio con objetivo de inmersión y buscar formas de tripomastigote.

3.- PREPARACIÓN DE CAPA DE LEUCOCITOS: WINTROBE O TUBO CAPILAR.**MATERIALES:**

- Tubo de Wintrobe
- mL de sangre citratada
- Pipeta capilar para llenar el tubo de Wintrobe
- Porta objetos limpios y secos

- Pipetas Pasteur y perilla de goma para pipeta
- Batería para coloración de Giemsa. (Ver coloración de Giemsa para malaria, página 88)
- Centrifuga corriente o microcentrifuga, según el método a realizar.

PROCEDIMIENTO USANDO TUBO DE WINTROBE:

- Con ayuda de la pipeta llenar el tubo de Wintrobe con la sangre citratada
Centrifugar por 30 minutos a 1,000 rpm
- se formarán 3 capas: la primera, arriba, de plasma; en medio una capa de leucocitos y la tercera, de sangre
- Con una pipeta Pasteur y mano firme, remover la capa de leucocitos del tubo de Wintrobe
- Colocar una gota en un porta-objetos
- Colocar otras dos gotas en otros dos porta-objetos
- Examinar una de ellas en fresco, al microscopio, entre porta-objetos y cubre-objetos
- para observar tripanosomas móviles
- Extender las otras gotas finamente, dejar secar, fijar con metanol y seguir la coloración con Giemsa. Una vez secas
- Examinar con aceite de inmersión e identificar los tripanosomas en forma de C, con un núcleo rojo-violeta en la mitad del cuerpo y un cinetoplasto voluminoso en el extremo posterior. En regiones donde haya *T. rangeli*, éste se diferencia de *T. cruzi* por tener un cinetoplasto más pequeño colocado un poco antes del extremo posterior y por medir entre 26 y 34 /im.

MÉTODO EN TUBO CAPILAR:

- Cuando se trata de un niño pequeño o cuando se desea una punción capilar, se puede recoger sangre por punción del dedo, llenando 3 tubos capilares con anticoagulante.
- Los tubos se centrifugan en la microcentrifuga a 5,000 rpm durante 10 minutos. Antes de extraer la capa de leucocitos, observar la interfase entre capa de leucocitos y suero en los 3 tubos al microscopio colocados sobre un porta-objetos de 3 X 2 pulgadas bajo objetivo de 40 X. Si hay tripanosomas, se observará alguna motilidad en esa zona.
- Quebrar con cuidado, con una lima triangular y usando guantes, el capilar a nivel de la capa de células blancas, colocar la capa de leucocitos sobre un porta-objetos limpio y cubrir con un cubre-objetos. Examinar buscando parásitos móviles usando objetivo 40 X e iluminación reducida durante 10 minutos como mínimo.
- Hacer un extendido de los leucocitos una vez que se observó en directo.
- Dejar secar, fijar en metanol.
- Colorear por Giemsa y examinar al microscopio con objetivo de inmersión, buscando tripomastigotes de *T. cruzi*.

Características de formas de *T. cruzi* en coloración con Giemsa

Cuando se recobran tripomastigotes en sangre circulante o de heces de chinche, pueden medir 20 micras de largo, con un núcleo central rojo en un citoplasma delicado azul, flagelo libre y cinetoplasto en el extremo opuesto al flagelo libre, grande y redondeado, color rojo púrpura. Los parásitos pueden presentar forma de C o estar un poco más estirados.

Técnica para detectar tripanosomas en sangre mediante la observación microscópica del hematócrito.

(Colaboración del Laboratorio Central, Ministerio de Salud, Honduras, Jefe: Dra. María Luisa Matute).

Llenar de 2 a 5 tubos de hematócrito con sangre con anticoagulante.

Centrifugar en centrífuga de hematócrito.

Colocar los tubos sobre un porta-objetos, **colocar encima de ellos** en la zona de interfase (células y plasma) 2 ó 3 gotas de aceite de inmersión.

Poner sobre el aceite un cubre-objetos.

Observar con el objetivo de 10 X la zona de interfase. Los tripanosomas podrán ser observados con su movimiento característico en el plasma **por encima** la capa de leucocitos.

En los casos en que se encuentren tripanosomas, éstos deben ser teñidos con Wright o Giemsa para determinar si se trata de *T. cruzi* o de *T. rangeli*. La parasitemia por *T. cruzi* o *T. rangeli* puede ser determinada en un extendido sanguíneo o en una gota gruesa, pero la técnica del hematócrito es mucho más sensible y requiere menos tiempo de observación.

Nota: *En el Hospital-Escuela se centrifuga en el mismo tubo recolector de sangre con anticoagulante (13 X 100 mm o menor), a 2,000 rpm durante 5 minutos. Con una pipeta Pasteur se recobra la capa leucocitaria (buffy coat) que se forma en medio, entre la sangre (parte inferior) y el plasma (parte superior). Con una parte de la capa leucocitaria se hacen extendidos para colorear por Giemsa y con otra parte se siembra en tubos Mycosel para crecer **Histoplasma capsulatum**, hongo patógeno que puede estar presente en coinfección con SIDA u otras patologías.*

MÉTODOS PARASITOLÓGICOS MAS COMPLEJOS

PROPÓSITO:

Para recobrar tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* en infección crónica durante exacerbación y período febril. Son métodos más complejos que requieren de una infraestructura especial y de personal de laboratorio altamente calificado. Se explicarán los pasos más sobresaliente de las técnicas. Consultar referencias apropiadas para más detalles en caso que se puedan implementar en el laboratorio.

2.0 Xenodiagnóstico

2.1 Hemocultivo

XENODIAGNÓSTICO:

El xenodiagnóstico es talvez el método más sensible para diagnosticar estadios crónicos de la enfermedad de Chagas. Requiere del mantenimiento en el laboratorio de una colonia detriatomideos limpios. Recientemente la técnica utiliza 40 ninfas del vector, distribuidas en 4 cajas, las cuales se colocan en el antebrazo del paciente para que chupen sangre. Se espera un período de 30-60 días después de ésta alimentación para examinar sus heces o en el intestino disectado. Este proceso se ha modificado aun más al sembrar el intestino disectado positivo en un medio LIT con ampicilina 6.6 mg/ml, para aislar cepas de *T. cruzi*. El *T. rangeli* existe en la hemolinfa del vector, pero a veces puede encontrarse en el contenido intestinal, por lo que se debe realizar su diferenciación.

HEMOCULTIVO:

Este método ofrece otras ventajas sobre el xenodiagnóstico:

1. Puede utilizarse para determinar la sensibilidad de una droga contra *T. cruzi* en ensayos clínicos de enfermos chagásicos.
2. Es una alternativa cuando el paciente es alérgico a la picadura del vector.
3. No se necesita mantener un insectario de triatomíneos.

Se requieren 30 mL de sangre con heparina como anticoagulante, tomados en forma aséptica, de pacientes con serología positiva de Chagas. Se distribuyen en 6 tubos con medio LIT (Liver Infusión Tryptose), incubando a temperatura ambiente. La más alta positividad del cultivo se obtiene a los 45 días, pero el material se mantiene y examina por un período hasta de 150 días.

Informar los hallazgos como positivo o negativo por *T. cruzi*.

En lugares geográficos donde existe *T. rangeli*, deberá asegurarse de la identidad de la especie antes de dar el informe.

TRYPANOSOMA CRUZI

MÉTODO INDIRECTO POR SEROLOGIA

PROPOSITO:

Identificar pacientes con enfermedad crónica por *T. cruzi*.

La aplicación de métodos indirectos requiere un laboratorio con personal calificado y una excelente infraestructura de soporte. Consultar fuentes adecuadas de referencia, ya que ese no es el propósito de este Manual.

SERODIAGNÓSTICO:

La detección de anticuerpos específicos en el suero de pacientes ha sido uno de los soportes más importantes para el diagnóstico de Chagas desde su introducción en 1913 por Guerreiro y Machado. Las pruebas serológicas se utilizan debido a las dificultades del diagnóstico parasitológico y clínico. Además, las pruebas serológicas son útiles para tamizar donadores en Bancos de Sangre, para evaluar el progreso del tratamiento y para realizar encuestas. Las pruebas utilizadas actualmente son: hemoaglutinación indirecta e inmunofluorescencia indirecta, pero existen otras aceptadas. En la segunda referencia citada se discute en 5 capítulos los diferentes aspectos del diagnóstico serológico de Chagas (no son del propósito de este manual).

REFERENCIAS:

García L. and Bruckner D. Diagnostic Medical Parasitology 2nd edition, American Society of Microbiology, Washington DC, 1993.

Wendel S, Brener Z, Camargo MG. y Rassi A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brasil 92, Sao Paulo, Brazil.

Genes and Antisens of Parasites. A laboratory manual. C.M. Morel, Editor, 2nd. Ed., Fundacao Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brazil, 1984.

LEISHMANIA spp.

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

PROPÓSITO:

Es un diagnóstico de certeza donde se evidencia la presencia directa del parásito en diferente material humano, según la enfermedad; ejemplo: aspirado de médula ósea para leishmaniasis visceral, raspado de úlcera para leishmaniasis cutánea. Se pueden utilizar varios métodos, como: frote, cultivo y biopsia.

FROTE (de úlcera, de aspirado, de biopsia).

VENTAJAS:

Es un método rápido, de bajo costo, alta sensibilidad y específico como un procedimiento primario. Es el método de elección para el diagnóstico confirmatorio de la leishmaniasis cutánea por la facilidad de la toma de la muestra (raspado de las lesiones cutáneas) a nivel de campo por personal de atención primaria de salud. Su análisis se hace por coloración y observación microscópica. Es también un excelente método para el diagnóstico de leishmaniasis visceral.

MUESTRA:

Raspado de las paredes de un corte de unos dos cm. paralelo a la lesión y por fuera de ella, o aspirado de los bordes indurados de la úlcera (leishmaniasis cutánea); aspirado de médula ósea o de otros órganos (hepático, ganglionar; en raras ocasiones esplénico) (leishmaniasis visceral); recobrado de pacientes o de material post-mortem.

NOTA: *En leishmaniasis visceral la toma de la muestra es un método invasivo que sólo puede ser realizado por médicos, requiriendo además, equipo especial, experiencia y condiciones de nivel hospitalario.*

En leishmaniasis muco cutánea, el frote no es muy utilizado porque la sensibilidad diagnóstica se reduce, debido a que el número de parásitos en las lesiones mucosas es muy bajo. La toma de la muestra implica la obtención de una biopsia por un especialista.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

Solución de Giemsa

Giemsa en polvo (certificado)	0.75 g
Alcohol metílico puro, absoluto	65.00 mL
Glicerina pura	35.00 mL

Mezclar el polvo de Giemsa poco a poco con alcohol metílico puro en un mortero y agregar suavemente la glicerina. Verter en un frasco limpio y rotulado que contenga perlas de vidrio, agitar bien diariamente, durante al menos una semana antes de usarlo. Mantener siempre el frasco bien tapado. Filtrar y almacenar por alícuotas en botellas pequeñas fechadas que se utilizarán una a la vez para evitar contaminación. Si ya tiene preparado Giemsa para colorear preparaciones de malaria, puede usar ese mismo.

Para usar, diluir la solución Giemsa madre 1:50 con solución amortiguadora.

Solución Amortiguadora pH = 7.0

Na ₂ HPO ₄ anhidro	4.0 g
KH ₂ PO ₄	5.0 g

Mezclar bien en un mortero. Pesar un gramo de esta mezcla y disolverlo en un litro de agua destilada. Mantener tapada y rotulada en frasco limpio. Guardar el resto de la mezcla de polvos en frasco seco y rotulado.

MATERIALES:

- Porta-objetos de 3x1 pulgada, limpios y secos.
- Bisturí usado estéril.
- Algodón o gasa quirúrgica.
- alcohol al 70% (para limpiar el área antes de tomar la muestra).
- Frasco Coplin o caja de Petri para colorear.
- Solución de Giemsa.
- Solución amortiguadora pH 7.0.
- Metanol absoluto.

PROCEDIMIENTO:

Seleccionar la lesión (úlceras o pápulas) de donde se tomará la muestra. Limpiar el área con algodón o gasa y metanol al 70%. Se limpia sin tocar las costras ni el fondo de la úlcera. Dejar secar.

Con la hoja del bisturí sumergida antes en alcohol y flameada, hacer una pequeña incisión por fuera del borde externo de la úlcera en las zonas más activas de la misma (o por el centro de la lesión en leishmaniasis cutánea atípica), que sangre lo menos posible. Raspar la superficie cortada para obtener linfa y tejido inflamado y esparcirlos suavemente sobre los porta-objetos limpios y secos. Cuando se trata de una médula ósea, extender el aspirado en varios porta-objetos, como si fuera extendido fino para malaria.

Si es un fragmento de tejido-biopsia - se hacen varias improntas sobre un porta-objetos. Si hay mucha sangre, colocar primero la biopsia sobre una gasa para absorber el exceso de sangre antes de hacer las improntas. Dejar secar. Fijar 2 minutos en metanol puro absoluto depositando 2 ó 3 gotas de metanol con el cuenta-gotas o una pipeta Pasteur directamente sobre el preparado colocado horizontal o vertical por deslizamiento. Dejar secar.

Colorear con la solución de Giemsa 1:50 durante una hora.
Enjuagar suavemente, dejar secar y observar al microscopio con aceite de inmersión.
Buscar amastigotes de **Leishmania** hasta por 30 minutos, dentro o fuera de fagocitos (macrofagos).

INTERPRETACIÓN:

PARÁSITOS: Los amastigotes de **Leishmania** son cuerpos ovoides que miden entre 2-3 µm de ancho por 1-1.5 µm de largo; por lo general se encuentran dentro de células (macrófagos, monocitos, histiocitos) y su característica tintorial es un citoplasma vacuolado levemente azul, un núcleo y un cinetoplasto, ambos rojo púrpura. La visualización de ambos elementos es la clave en la diferenciación con otros organismos, levaduras, etc.

CULTIVO

PROPÓSITO:

Lograr la multiplicación de los amastigotes o promastigotes en un medio de cultivo artificial, preparado en el laboratorio, para aumentar la sensibilidad del diagnóstico de leishmaniasis.

VENTAJAS:

Es más sensible que el frote, pues permite la multiplicación de los amastigotes de **Leishmania spp.**
Permite la caracterización del parásito aislado.
Puede utilizarse en la preparación de antígeno.
Tiene mucho valor en el diagnóstico de la leishmaniasis muco-cutánea y en la leishmaniasis visceral cuando los parásitos son escasos.

DESVENTAJAS:

Es un método más complejo de preparar y examinar.
Es más costoso.
El crecimiento de los promastigotes varía mucho; algunas especies como/., **braziliensis** no crecen bien o no crecen del todo.
A veces se contamina.
Requiere de personal de laboratorio más especializado.
Necesita esperar varios días y hacer uno o varios pasajes a ciegas antes de ofrecer un resultado.

MUESTRA:

Aspirado, raspado y material de biopsia de tejidos de pacientes sospechosos. Cuando los amastigotes son extremadamente escasos el aspirado tomado con aguja hipodérmica puede ser inadecuado, siendo la biopsia o el raspado una mejor muestra. Los aspirados a través de la piel intacta tienen un riesgo menor de contaminar los cultivos.

Existe un variado número de medios de cultivos para **Leishmania**, pero aquí se ofrece el medio clásico de NNN y el medio de Senejkie's.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO:**Tener acceso a:**

Autoclave
 Mechero
 incubadora a 37° C
 Material de vidrio estéril
 Medio bifásico a base de agar-sangre.
 Conejos para sangrar o sangre fresca de conejo
 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm con tapón de rosca
 Erlenmeyer de 250 mL de capacidad

Solución de Locke (opcional)

Cloruro de sodio	8 g
Cloruro de calcio	0.2 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Cloruro de magnesio	0.01 g
Fosfato dibásico de sodio	2 g
Bicarbonato de sodio	0.4 g
Fosfato monobásico de potasio	0.3 g

Disolver en ese orden todas las sales mencionadas en 1,000 mL de agua destilada. Hervir 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y filtrar para remover el sedimento formado. Esterilizar a 15 libras de presión y 121°C durante 15 minutos. Guardar en frasco tapado y rotulado.

Medio bifásico a base de agar-sangre NNN (Novy-Nicolle-McNeal)**fase Sólida:**

Agar simple	1.4 g
NaCl	0.6 g
Agua destilada	90.0 mL
* Sangre defibrinada de conejo	7.5 mL

Colocar los ingredientes en un erlenmeyer, introducir éste en un beaker con agua y llevar a ebullición para fundir el agar (baño María) mezclando bien por agitación para no quemar. Esterilizar en auto-clave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar a unos 50°C, añadir la sangre defibrinada estéril de conejo, mezclando suavemente pero sin demorar mucho ya que el medio se solidifica alrededor de ésta temperatura. Utilizar 2-3 mL de esta mezcla para cada tubo de ensayo estéril de 13x100 mm, con tapón de rosca. Luego colocar los tubos en posición inclinada hasta solidificación del medio, de preferencia en hielo, o dentro de una

* La sangre de conejo se obtiene por punción cardíaca en condiciones de asepsia y se coloca en un frasco estéril con cuentas de vidrio. Se tapa con tapón o parafilm y se agita suavemente unos minutos. Usar una pipeta estéril de 10mL para sacar la cantidad necesaria para preparar el medio.

refrigeradora ya que así se obtiene más agua de condensación, que es la fase líquida. Si ésta resultara insuficiente, añadir al medio unas gotas de agua destilada estéril o bien 0.5 mL de solución de Locke. Para probar la esterilidad del medio, incubar los tubos a 37°C por 24 horas. Examinar una gota del líquido de condensación buscando bacterias o levaduras. Descartar los tubos contaminados. Rotular como: **Medio NNN**. Guardaren refrigeración a 4° C hasta el momento de usar.

Medio de Senejkie's (Seneca's)

Bacto Beef*	5.0 g
Bacto Agar	2.0 g
Bacto Peptone	2.0 g
NaCl	0.5 g
Agua destilada	100 mL
Sangre defibrinada de conejo	15 mL
papel de pH 6-8	

Si reemplaza Bacto Beef por Beef Extract, usar 0.3% de Bacto Beef peso/volumen.

Disolver el Bacto Beef en el agua destilada y calentar a 55-60°C por 20 minutos, llevar a 80° C por 5 minutos, filtrar (filtro Whatman #1) y agregar Bacto Agar, Bacto Peptone y Cloruro de Sodio. Calentar nuevamente a 55-60°C por 20 minutos, retirar del calor y llevar a pH = 7.2 con 1 N de NaOH.

Esterilizar en autoclave. Cuando el medio esté a 50°C-55°C agregar estérilmente la sangre defibrinada de conejo, revolver y servir 2-3 mL en cada uno de los tubos estériles; dejar inclinados 2 horas al medio ambiente y luego guardar en refrigeración, rotulando **Medio de Seneca's**.

Solución de penicilina-estreptomicina (P/S)

Ésta varía de acuerdo a donde ha sido comprado el antibiótico en polvo. Ejemplos: Si la solución primaria es de 50.000 U de penicilina/mL con 100 mg estreptomicina/mL, entonces está deberá ser diluida **1:10** con buffer fosfato salino estéril. Para diluir, tomar:

- 1 mL de solución primaria de antibióticos, agregar 9
- mL de solución salina buferada con fosfato.

La dilución debe dar concentración de 5,000 U de penicilina y 10 mg de estreptomicina/mL. Distribuir en tubos pequeños y guardar en congelador debidamente rotulado.

O bien, si se tiene una **Penicilfin** (base) 10.000 units/mL, con Streptomycin (base) 10 mg/mL (Gibco laboratories, Grand Island, N.Y., USA), se reconstituye con solución salina de acuerdo con las instrucciones indicadas en el frasco.

Para preparar alícuotas en tubos, mezclar Penicilina/Streptomicina al 1:10 con PBS (solución salina buferada con fosfato), distribuir 1 mL por tubo. Concentración final es igual a: 1,000 U. penicilina y 1,000 ug Estreptomicina/mL. Guardar en congelación debidamente rotulados.

Solución salina buferada con fosfato (PBS)**Solución 1:**

Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HPO ₄)	4.75g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agua destilada	1,000 mL

Mezclar. Guardar en frasco limpio y rotulado.

Solución 2:

Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	4.53g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agua destilada	1,000 mL

Mezclar. Guardar en frasco limpio y rotulado.

Para la solución de trabajo, añadir 8 partes de Solución 1 a dos partes de Solución 2 para obtener un pH de 7.2.

MATERIALES:

- Solución salina buferada fosfatada PBS
- Solución de penicilina estreptomycin
- Solución de Locke
- Tubos con medio NNN o medio de Seneca's
- Mechero
- Pipetas Pasteur estériles
- Bulbo o perilla para pipetas
- Jeringa de 1 mL con aguja calibre 26 3/8 mm
- Algodón o gasa quirúrgica
- Gradilla para tubos
- Alcohol etílico al 70%
- Marcador indeleble o etiquetas para rotular tubos
- Microscopio invertido

PROCEDIMIENTO:**Aspirado de linfa:**

Desinfectar la lesión y el área con alcohol 70%. Se debe elegir el borde más elevado e inflamado.

Utilizando una jeringa de 1 mL que contiene 0.1 de solución de PBS y Penicilina/Streptomycin, se inserta la aguja calibre 26 3/8 mm en el borde de la lesión o por fuera del cráter sin introducir el líquido. Se hace girar la jeringa mientras se introduce y se retira lentamente la aguja aspirando linfa.

Ya afuera, se observa la linfa color Rosado obtenida. Se mezcla con el PBS moviendo el émbolo hacia arriba y abajo. Hay que tratar de no obtener sangre.

Se realizan frotos coloreándolos con Ciemsa

Se inocula la linfa y el PBS directamente en medio de cultivo (preferentemente de Seneca's), pero también en triple N, con precauciones para evitar contaminaciones bacterianas (flameando el tubo de cultivo que se mantiene casi horizontal).

Incubar los cultivos a $24^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Otras muestras:

El medio NNN también se puede inocular con otro material recobrado del paciente como sangre, médula ósea, tejidos. Los dos últimos se trabajan bajo campana estéril o con mechero encendido, con lo que se logra obtener un campo de trabajo estéril, siguiendo los mismos principios antisépticos. Se hace la maceración de tejidos en un mortero estéril. En este momento se le agregan los antibióticos (solución Penicilina/Streptomycin) para evitar crecimiento bacteriano. El tejido así preparado se distribuye en 2-3 tubos de medio que se guardan a $24^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ en una gradilla, debidamente rotulados.

EXAMEN DEL CULTIVO:

El líquido en el fondo del tubo de cultivo debe revisarse dos veces por semana a partir del 4to día, en un microscopio invertido, que es más rápido y se evita la contaminación. Si no se cuenta con este aparato, se toma una gota de la fase líquida con pipeta Pasteur estéril (bajo mechero encendido). Observar al microscopio entre porta y cubre.

Los cultivos se retienen y observan durante un mes antes de darse como negativos.

Cuando un cultivo está positivo, se observan formas de promastigote, en forma de huso, con un flagelo libre en el extremo anterior. Pueden hallarse solos o en grupos entrelazados por el flagelo. Puede hacerse una coloración de Giemsa extendiendo el cultivo finamente sobre un porta-objeto.

Interpretación de la coloración por Giemsa.

Los amastigotes recobrados de úlcera, aspirado, impronta de biopsia: tienen forma esférica, subesférica (o alargada), de $1.5\ \mu\text{m}$ de tamaño; a menudo se le encuentra fuera del macrófago. En este caso por lo general se observan organismos con citoplasma azul pálido, vacuolado, con un núcleo rojo y un cinetoplasto más o menos en la parte media central del parásito, de color rojo intenso. En coloraciones de cultivos, se observan promastigotes, alargados como huso, $15\text{-}25\ \mu\text{m}$ por $1.5\text{-}3.5\ \mu\text{m}$, con un flagelo corto, núcleo más o menos central color rojo y un cinetoplasto en la base del flagelo, color rojo intenso.

REFERENCIAS:

- Ash, L. y Orihel, T. Ch. Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press, American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 1987.
- Weigle KA, Dávalos M, Heredia P, Molineros R, Saravía N, and D'Alessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1987,36:489-496.
- Escobar M, Martínez F, Scott Smith D, Palma G. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (tequmentary): a diagnostic challenge. *Tropical Doctor* 1992 (Suppli): 69-78.

LEISHMANIASIS VISCERAL

GRADACIÓN DE LA DENSIDAD PARASITARIA DE AMASTIGOTES EN FROTES DE MATERIAL ESPLÉNICO ASPIRADO

PROPÓSITO:

Aumentar la sensibilidad de la detección de (os amastigotes de *Leishmania* presentes en bazo; proporcionar una indicación de la cantidad de parásitos presente; ofrecer una medida objetiva de la velocidad de la respuesta al tratamiento y distinguir entre los pacientes de respuesta lenta y los no-respondedores.

PRECAUCIÓN:

La aspiración de preferencia debe ser practicada por un médico, en un paciente nuevo, previo cálculo del tiempo de protrombina (que no debe superar en más de 5 segundos a la prueba testigo y a un recuento de plaquetas (si es de 40,000/mm³ o menos no debe hacerse el aspirado).

PROCEDIMIENTO:

Se utiliza los mismos reactivos y los procedimientos que en la descripción para preparar, colorear y examinar un frote de sangre (página 103).

La densidad parasitaria se informa por grados, utilizando un ocular de 10x y un objetivo de inmersión 100x. El laboratorio debe guiarse por el cuadro que se presenta a continuación para informar sobre la densidad de amastigotes.

GRADO	DENSIDAD PARASITARIA MEDIA
6+	100 parásitos/campo
5+	10-100 parásitos/campo
4+	1-10 parásitos/campos
3+	1-10 parásitos/10 campos
2+	1-10 parásitos/100 campos
1+	1-10 parásitos/1000 campos
0	0 parásitos/1000 campos

REFERENCIA:

Epidemiología, Diagnóstico. Tratamiento y Control de las leishmaniasis en América Latina, OPS/OMS, versión 1991.

LEISHMANIA Spp

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

PRUEBA DE MONTENEGRO

PROPÓSITO:

Buscar marcadores producidos por la respuesta inmune del humano, inducidos por la presencia de epitoposantigénicos del parásito. Es un diagnóstico indirecto. Existen varios métodos, pero aquí se presentará la intradermoreacción de Montenegro únicamente. Se anota que hay una reacción mas no una diferencia entre referencia actual o pasada.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución de Coca's

Cloruro de sodio (NaCL) 5.0g
Bicarbonato de sodio 2.75g Agua
destilada

Antígeno de Montenegro:

Cultivos de *Leishmania* de 7-8 días, en tubos con tapón de rosca en medio de **Senekjie's** (= **Seneca's**) sin contaminación bacteriana
Solución salina 0.85% estéril
Pipetas Pasteur
Cámara de recuento (hemocitómetro) AO Spencer
Pipeta de glóbulos rojos
Frascos con tapón de caucho 16x40mm
Solución de Coca's

PROCEDIMIENTO:

Hacer un pool de cultivos de *Leishmania* de 7-8 días de edad o hacer el lavado inicial en forma individual.

Agregar 20 mL de solución salina estéril al pool o a cada cultivo individual y centrifugar a 2.500 rpm durante 15 minutos.

Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado con 20 mL de solución salina estéril, centrifugar a 2,500 rpm por 15 minutos.

- Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado con 20 mL de solución de Coca's.
- Determinar el factor de dilución de los organismos por mL llenando una pipeta de glóbulos rojos con el precipitado resuspendido y contando los parásitos de *Leishmania* en el hemocitómetro.
- Hacer una suspensión con una concentración final de 2 millones de organismos/mL. Guardar en el refrigerador por 24 horas.
- Revisar si hay organismos vivos mediante una prueba de esterilidad, inoculando 3 tubos de medio Seneca's con 0.5 mL por tubo del frasco de antígeno.
- Si el antígeno no tiene organismos vivos (prueba de esterilidad negativa), añadir 5 mL del antígeno a cada tubo con tapón de caucho. Guardaren refrigeración a (PC.

MATERIALES PARA LA PRUEBA:

- Antígeno de Montenegro
- Jeringa de 1 mL y aguja de 26g 3/8 (tipo tuberculina)
- Algodón o gasa
- Alcohol al 70%
- Regla marcada en centímetros
- Marcador de punta fina

PROCEDIMIENTO:

- Limpiar un área en la cara interna del antebrazo del individuo en estudio. Con la jeringa de 1 mL tomar 0.1 mL de antígeno de Montenegro estérilmente.
- En forma intradérmica inyectar 0.1 mL de antígeno de Montenegro poco a poco, notando que se forma una pequeña pápula que luego desaparece.
- Leer la reacción a las 48 horas, midiendo el diámetro de la zona de induración con la técnica de bolígrafo que se explica a continuación:
- Ejerciendo presión moderada, se traza lentamente una línea con un bolígrafo desde un punto exterior distante 1-2 cm del borde de la reacción cutánea hacia el centro de ésta.
- En cuanto se advierta resistencia a seguir avanzando (lo que indica el borde de la reacción) se alza el bolígrafo de la piel.
- Se repite la misma operación en el lado opuesto de la reacción cutánea.
- Si la reacción es asimétrica, realizar una medida semejante en un eje de 90°C, a partir de la primera medición. Esta técnica permite visualizar los bordes de la induración, cuyo diámetro se puede determinar exactamente midiendo la distancia entre las líneas opuestas.
- Diámetro igual o mayor a 5 centímetros, se considera positiva.

INTERPRETACIÓN:

Esta es una prueba cutánea como respuesta inmune celular inducida por los parásitos, que persiste toda la vida. Aunque no confirma que la lesión de un paciente con una leishmanina positiva es producida por *Leishmania*, es una prueba útil en diagnóstico diferencial **con otras lesiones dérmicas**, particularmente en una leishmaniasis muco-cutánea y para estudios epidemiológicos.

Cuando se trata de leishmaniasis cutánea, la reacción intradérmica se vuelve positiva 1-3 meses después de la infección.

En leishmaniasis visceral la prueba intradérmica se vuelve positiva más o menos un año después que el paciente curó; es decir, está negativa mientras la infección era activa.

No está muy estudiado el comportamiento de la reacción en casos americanos de leishmaniasis cutánea difusa.

INFORME DE RESULTADOS:

Intradermoreacción positiva: diámetro de la zona de induración igual o mayor a 5mm.

Intradermoreacción negativa: diámetro de la zona de induración menor a 5mm.

REFERENCIAS:

Manual de lucha contra la leishmaniasis visceral. División de Lucha contra las Enfermedades Tropicales. Ginebra, Suiza, 1996.

Beaver, PC, Jung RC, and Cupp. EW. Clinical Parasitology 9th Ed. Lea and Febiger, 1984.

SokalJE. Measurementofthelayed skin test. New England Journal of Medicine. 1975. 293: 501-502.

ILUSTRACIONES

Esquema de un microscopio

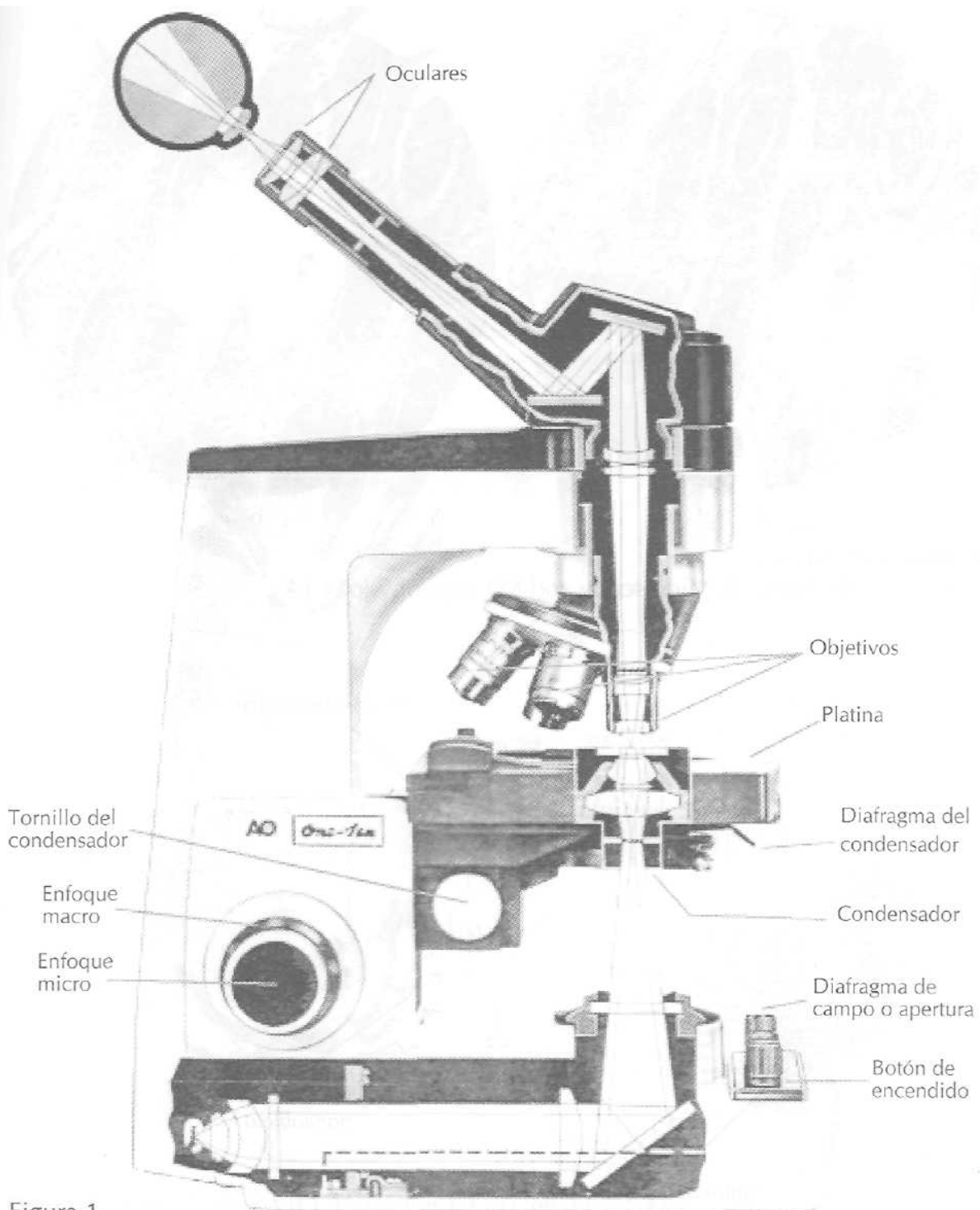


Figura 1.

Tomado de: Reference Manual, Series One-Ten Microstar, AO Scientific Instruments, División of Warner-Lambert Technologies, Inc. Buffalo, New York, USA.

Calibración e iluminación del microscopio

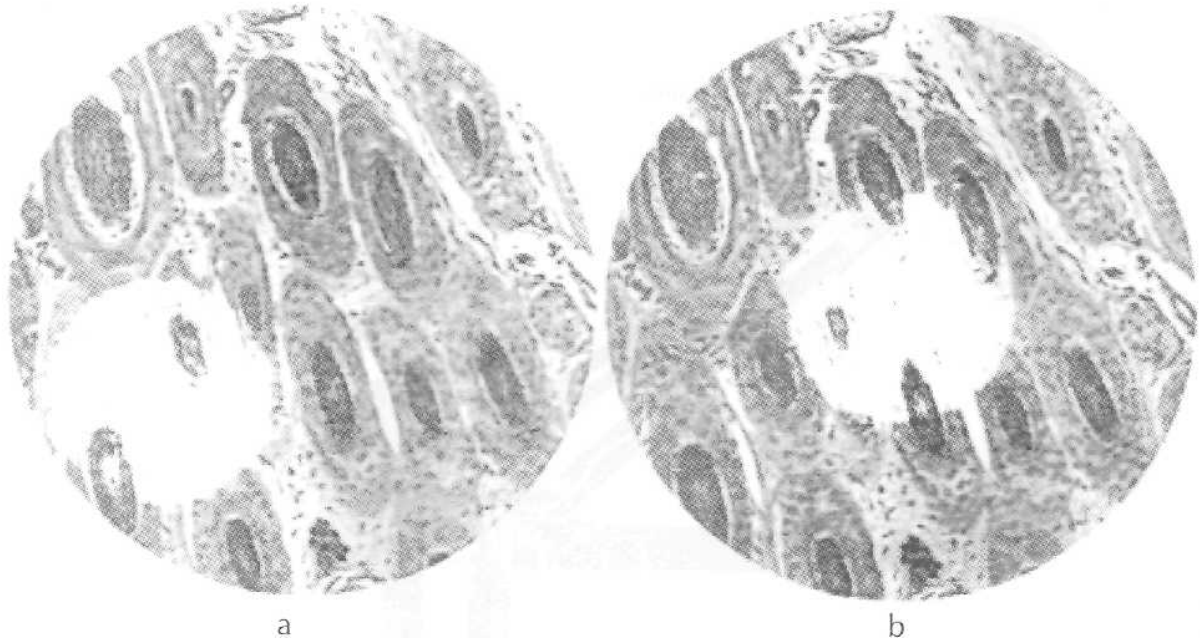


Figura 2. Iluminación

Tomado de: Smith R. Microscopy and Micrography (pág 14).

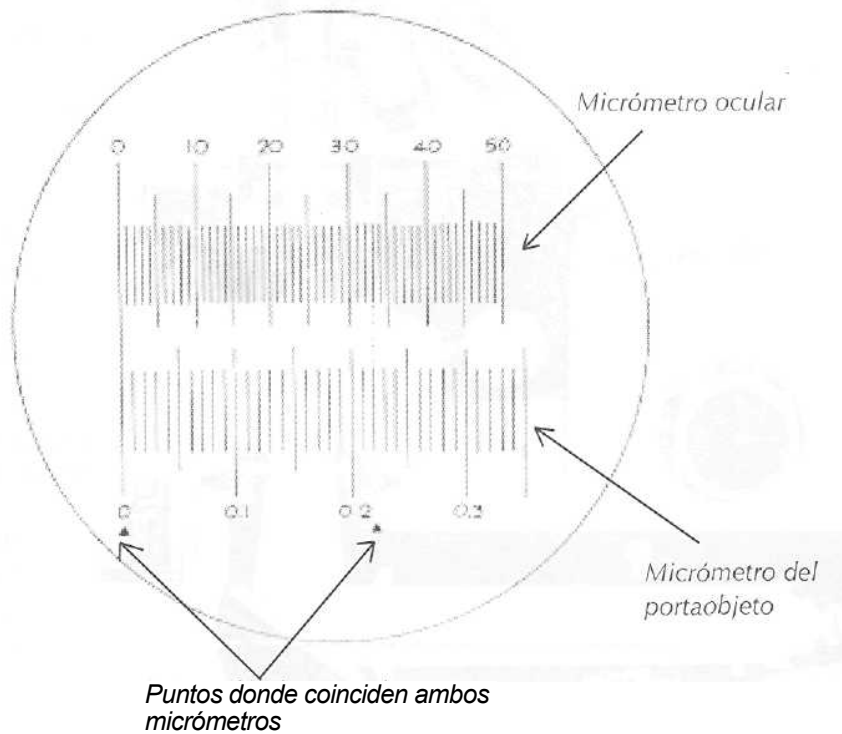


Figura 3. Calibración de micrómetro ocular.

Tomado de: Ash L, and Orihel, 1987.

Técnica de Kato-Katz

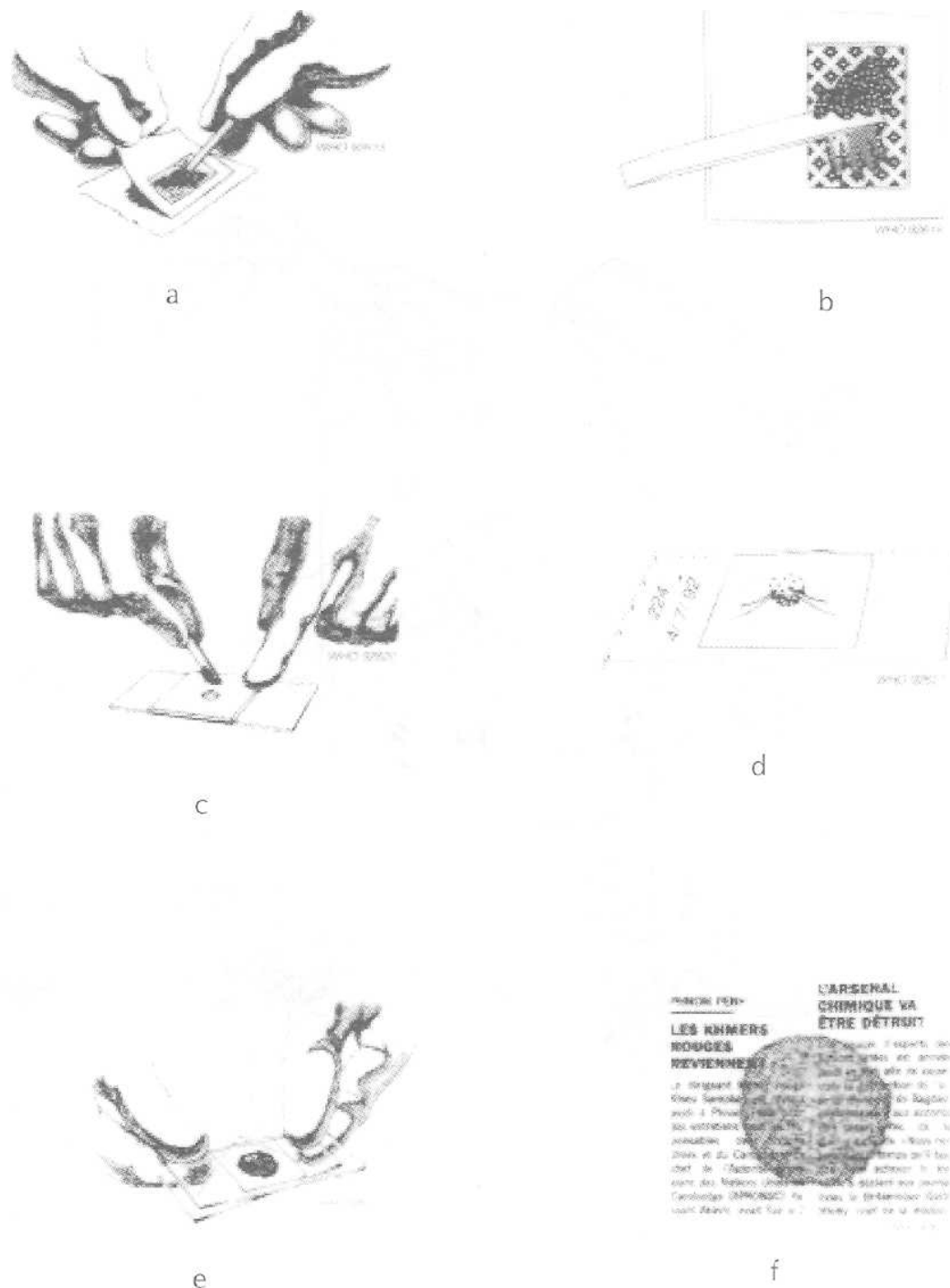


Figura 4, Método de KATO (Variación KATZ), en 41.7 mg de heces.

Tomado de: Medios Auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales.
Lamina 3. Organización Mundial de la Salud, 1994

Cinta adhesiva transparente

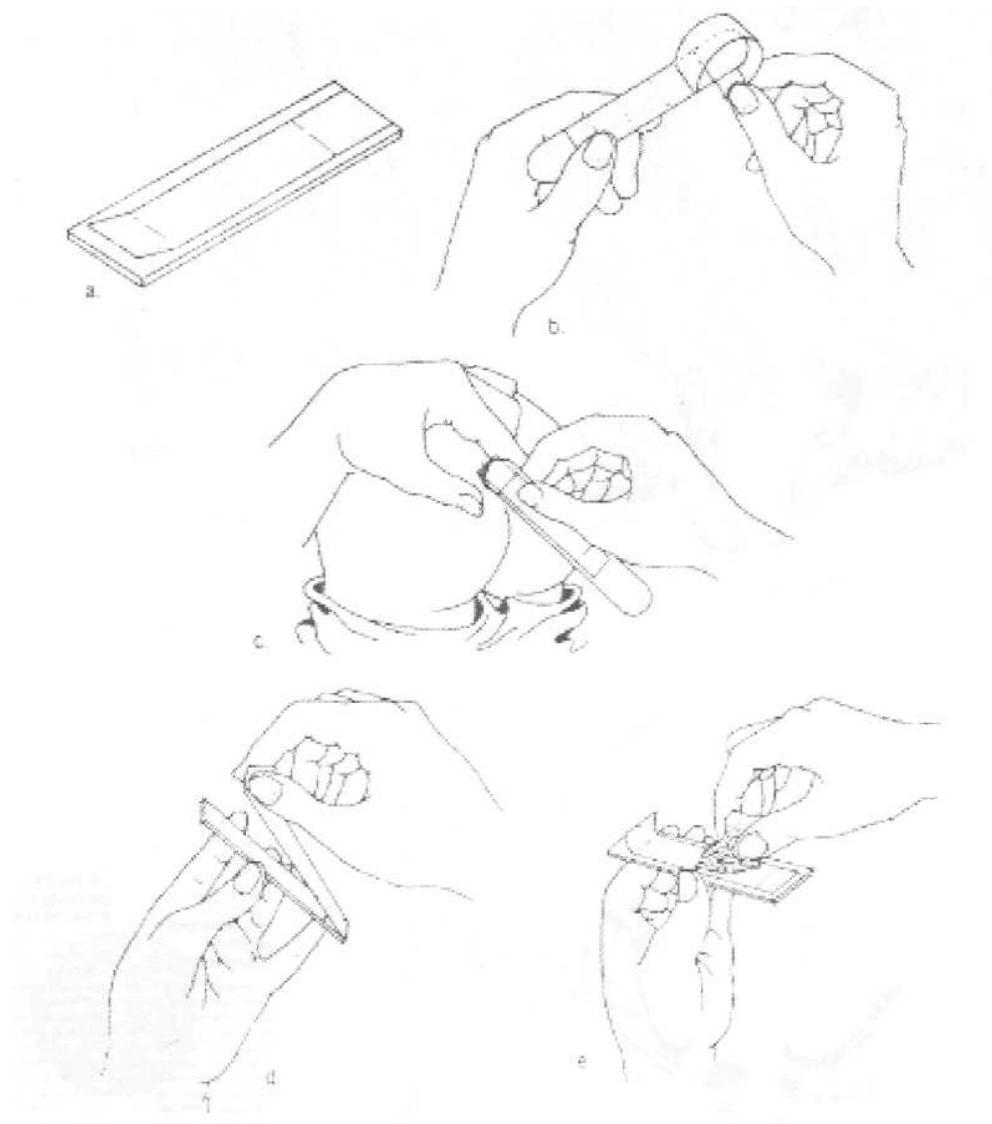


Figura 5. Método de la cinta adhesiva para recolectar huevos de *Enterobius vermicularis* o de *Taenia* sp. de la parte perianal del paciente.

Tomado de: Ash L, and Orine!, 1987.

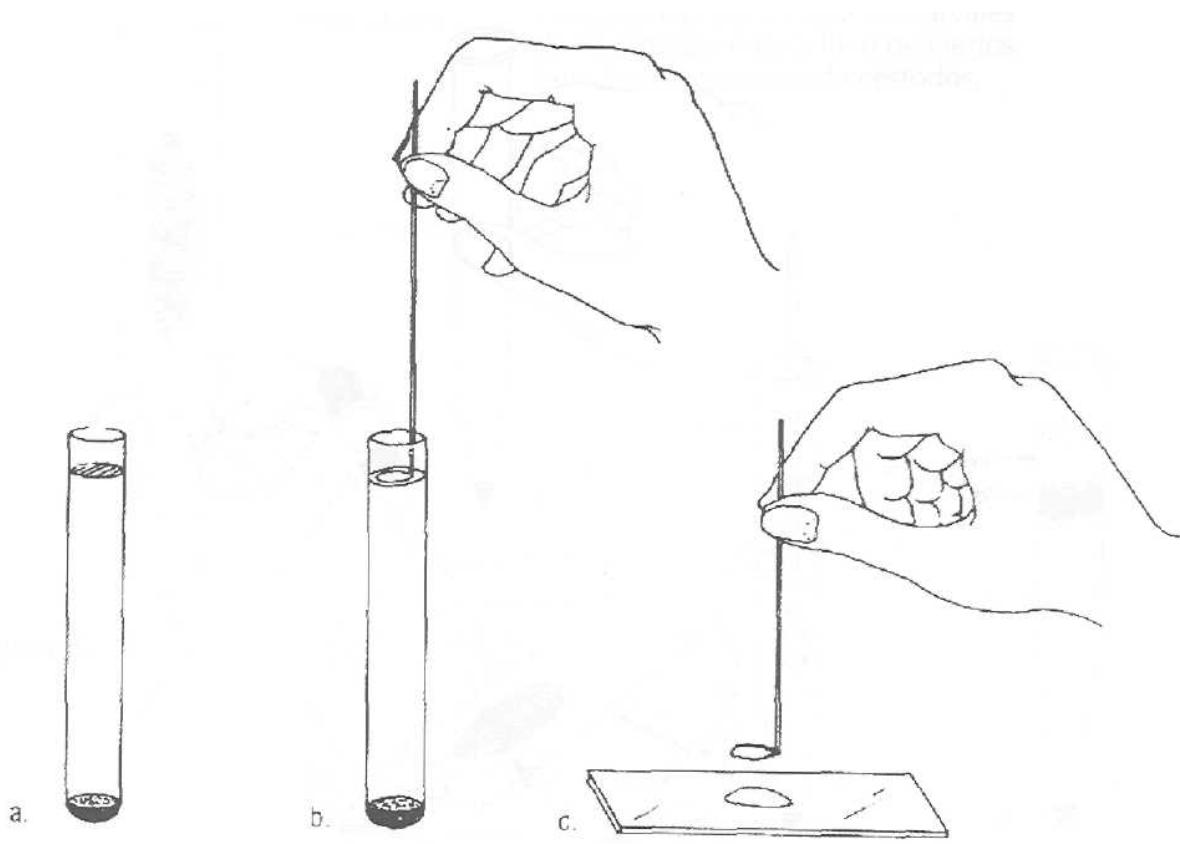


Figura 6.

Tomado de: Ash L, and Orihel, 1987.

Método de formalina-acetato de etilo

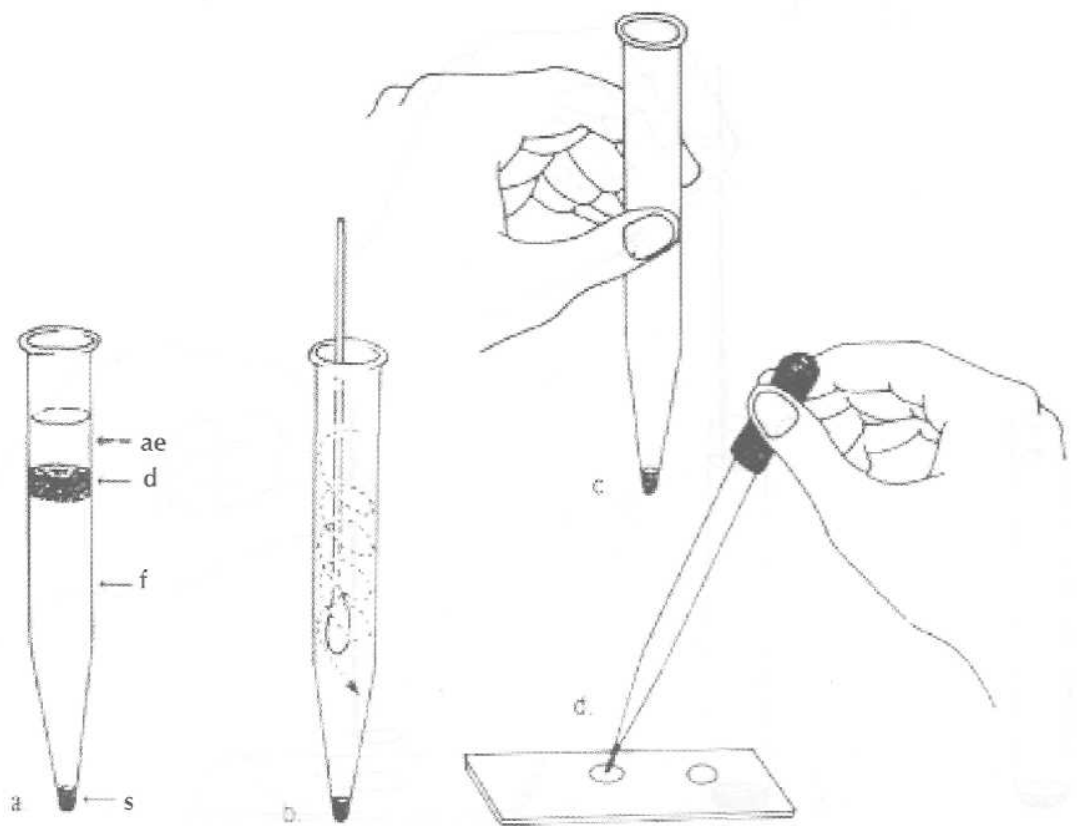
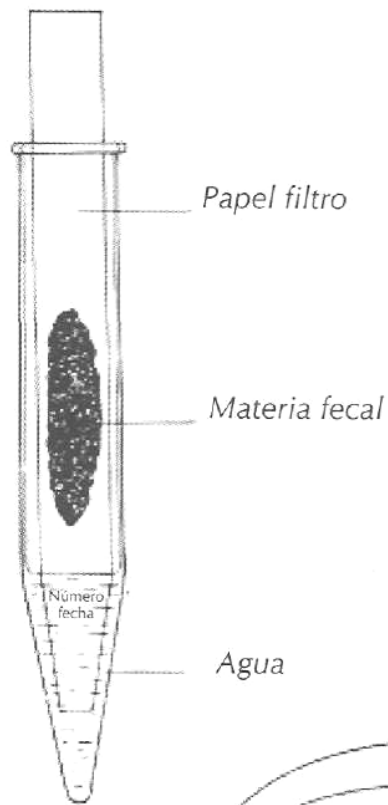


Figura 7.

Tomado de: Ash L, and Orihel, 1987.



Preparación de cultivo, usando papel filtro, para recuperar estadíos larvales de nemátodos o el cultivo de ciertos tremátodos y huevos de céstodos.

Figura 8.



Preparación de cultivo en plato de Petri para recuperar estadíos larvales de nemátodos.

Figura 9.

Características larvales de nemátodos

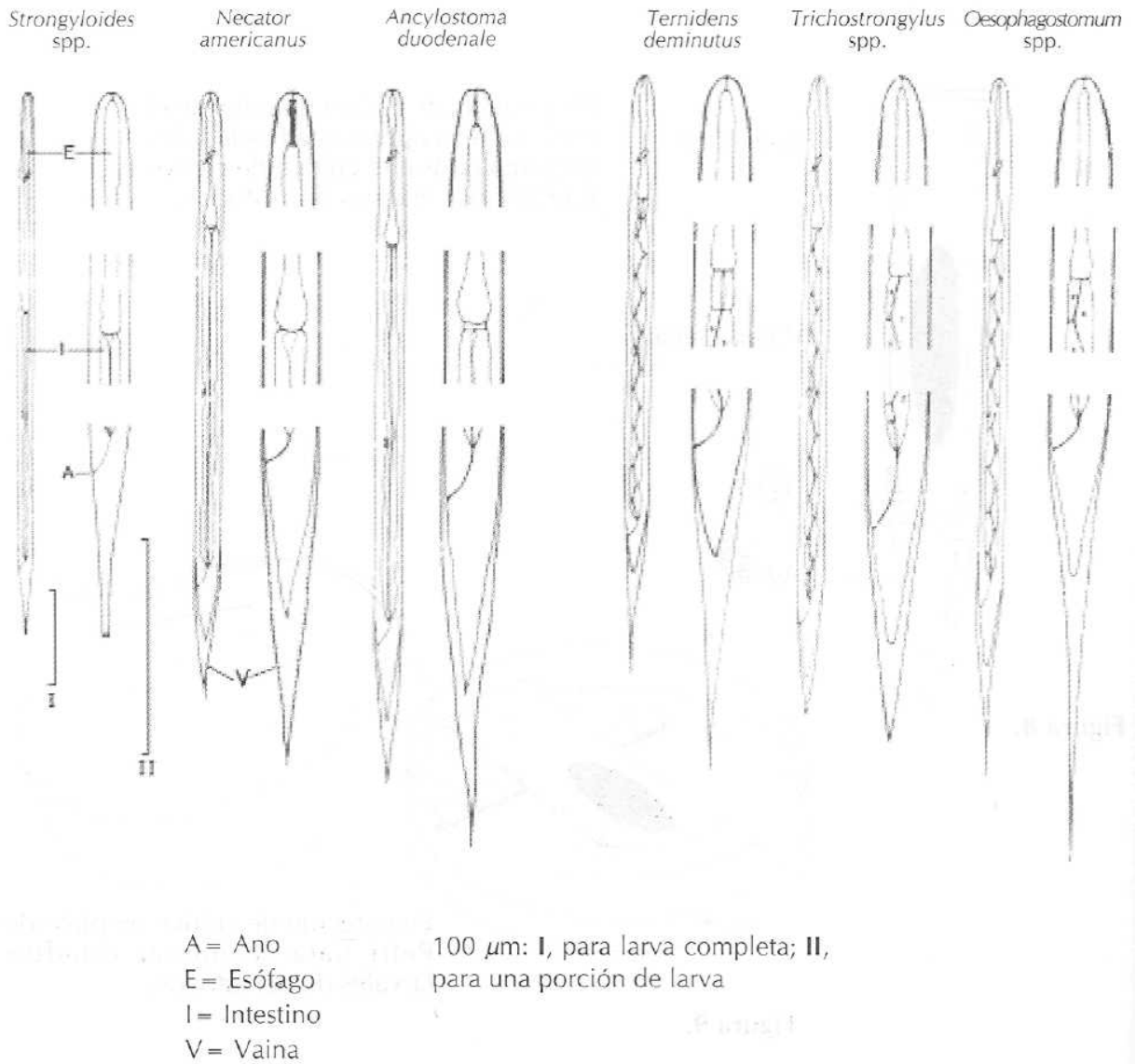


Figura 10. Características distintivas de las formas larvales encontradas en coprocultivos humanos.

Baermann en vaso de sedimentación

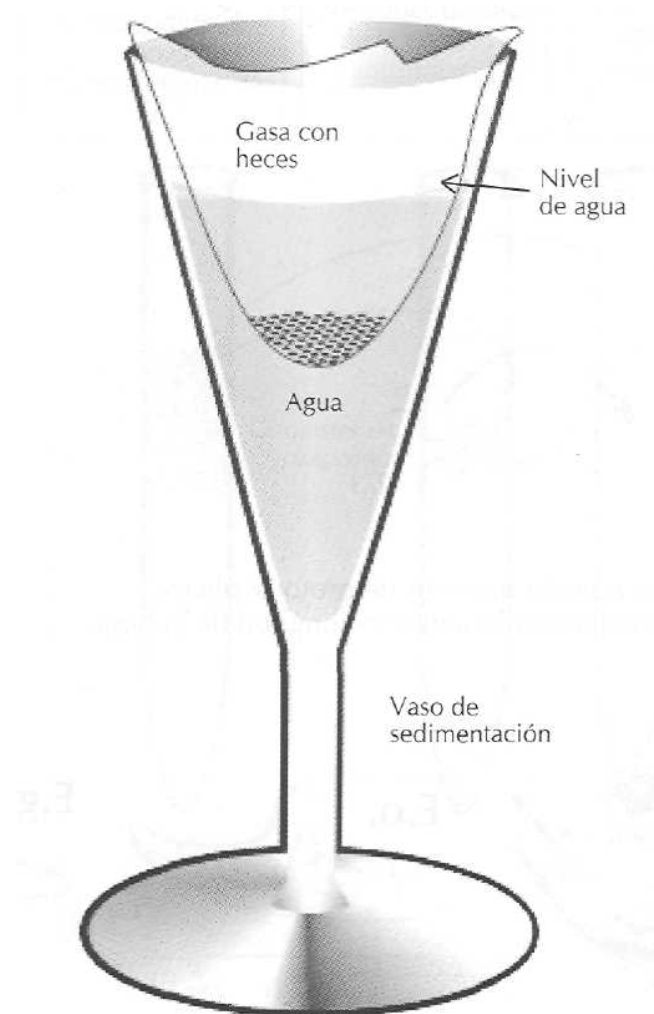


Figura 11.

Gancho de protoescolix de *E. vogeli*

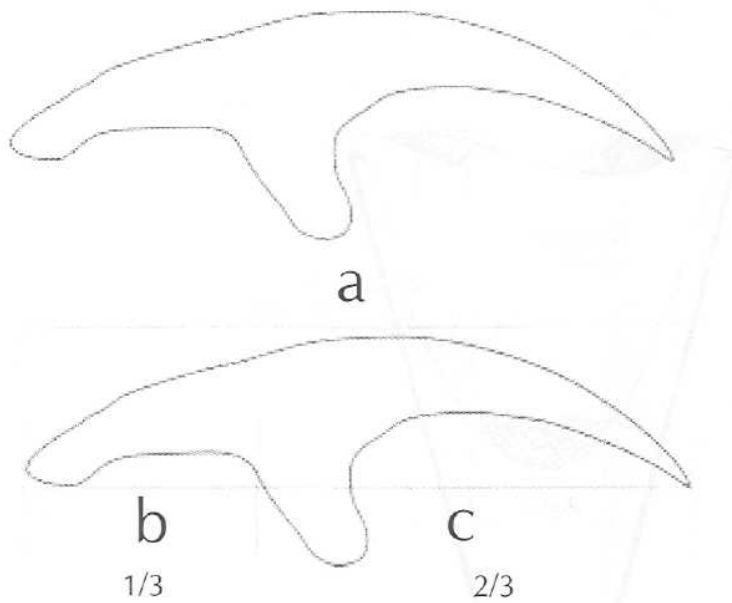
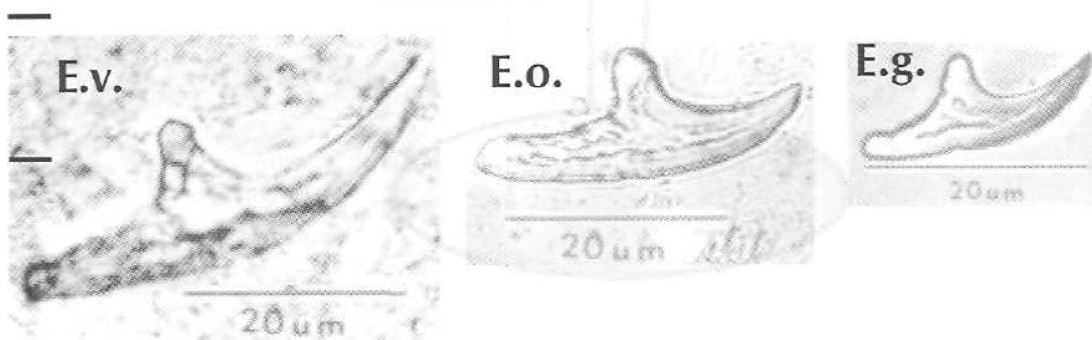


Figura 12. Método para medir ganchos de protoescolícos:
a- longitud total; b- longitud del mango; c- longitud de la hoja.



Fotografías

Método de Concentración (Weber)

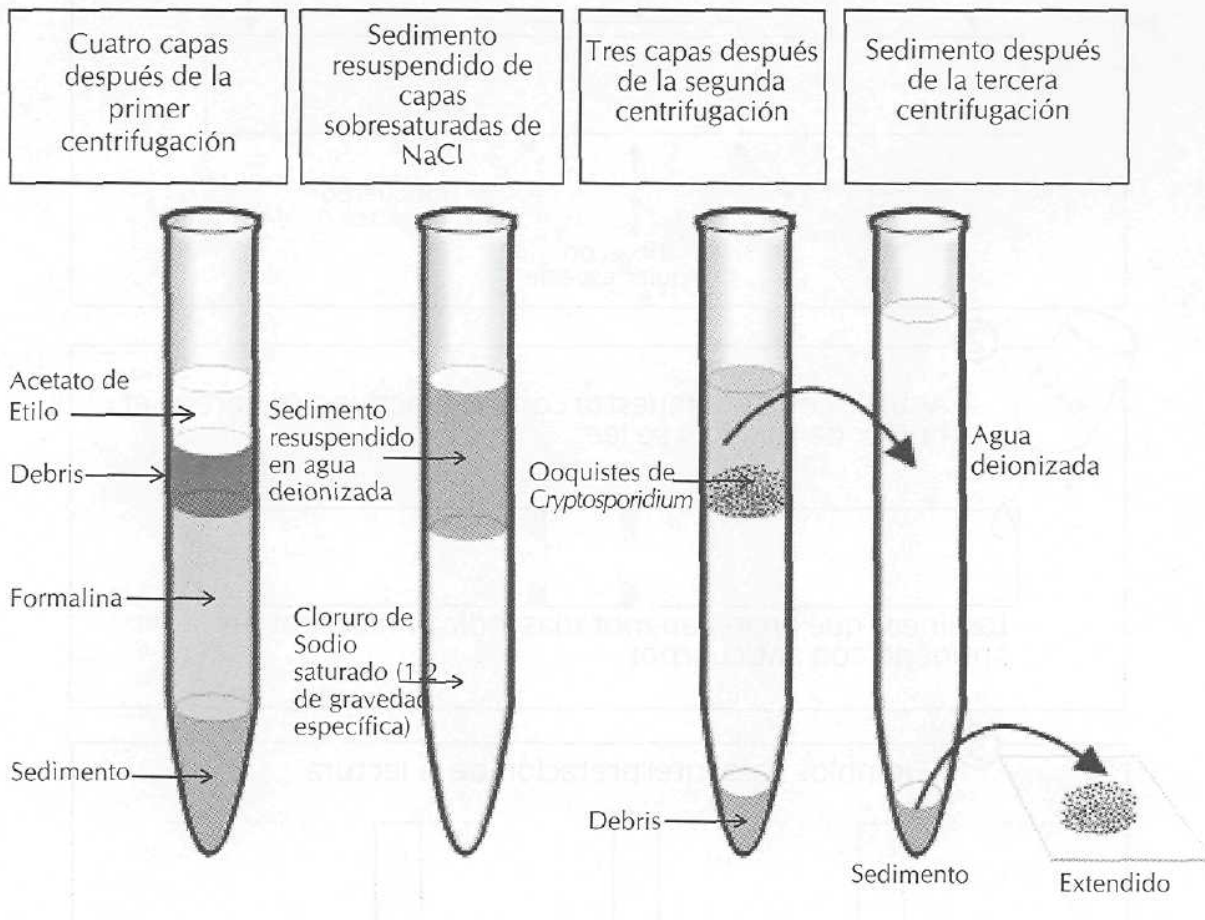


Figura 13. Flujoograma del Método de Concentración de Weber.

Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR)

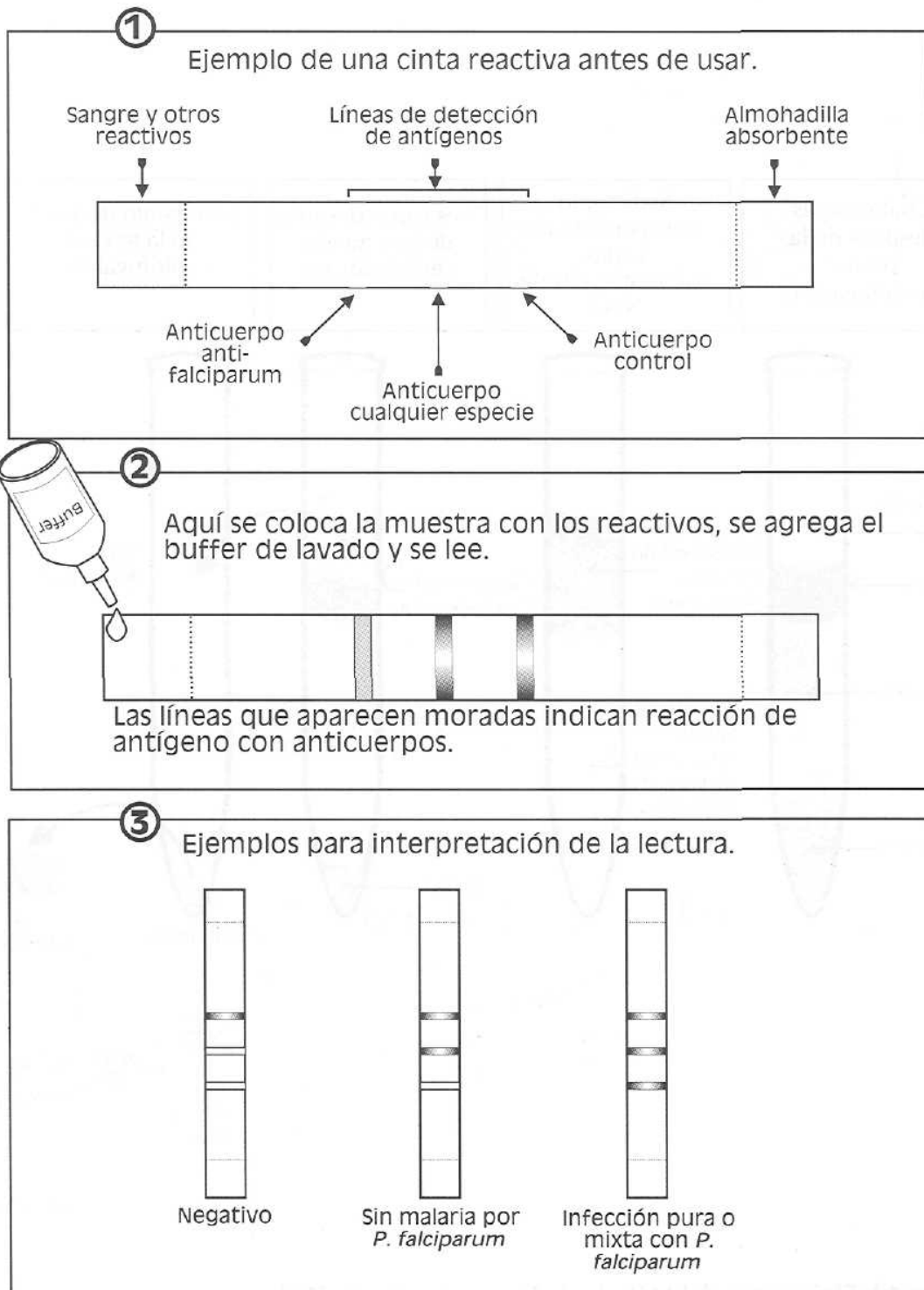
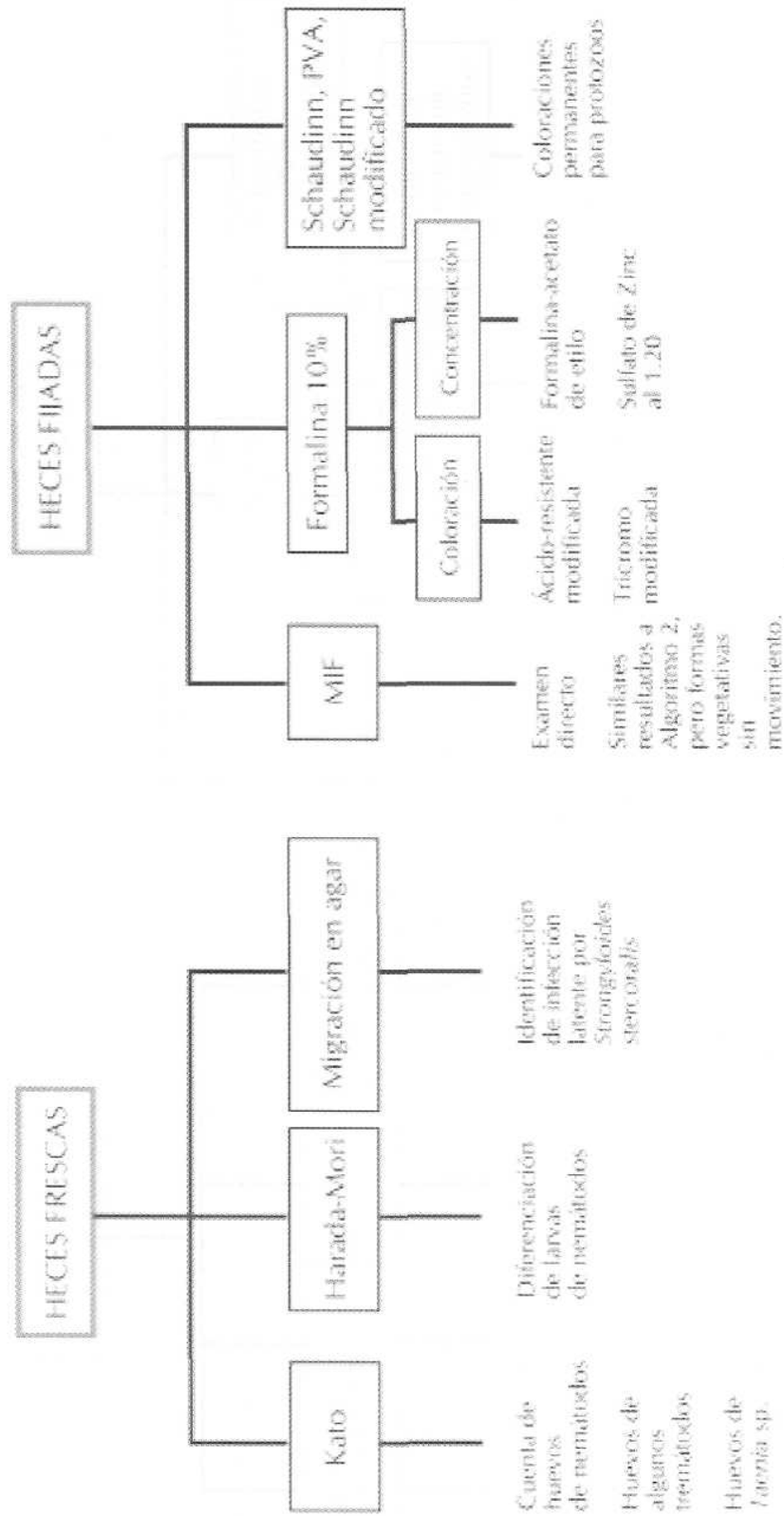


Figura 14. Forma, uso e interpretación de la cinta reactiva.

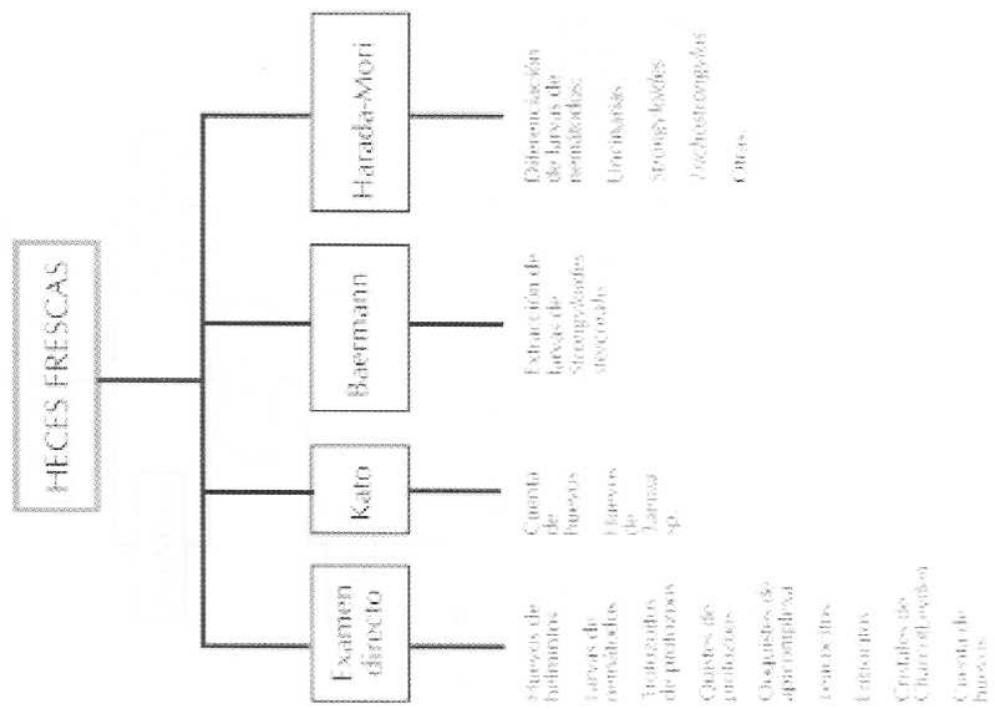
ALGORITMOS

Algoritmo No. 1.- Alternativas de métodos para examen de heces. Encuestas epidemiológicas.

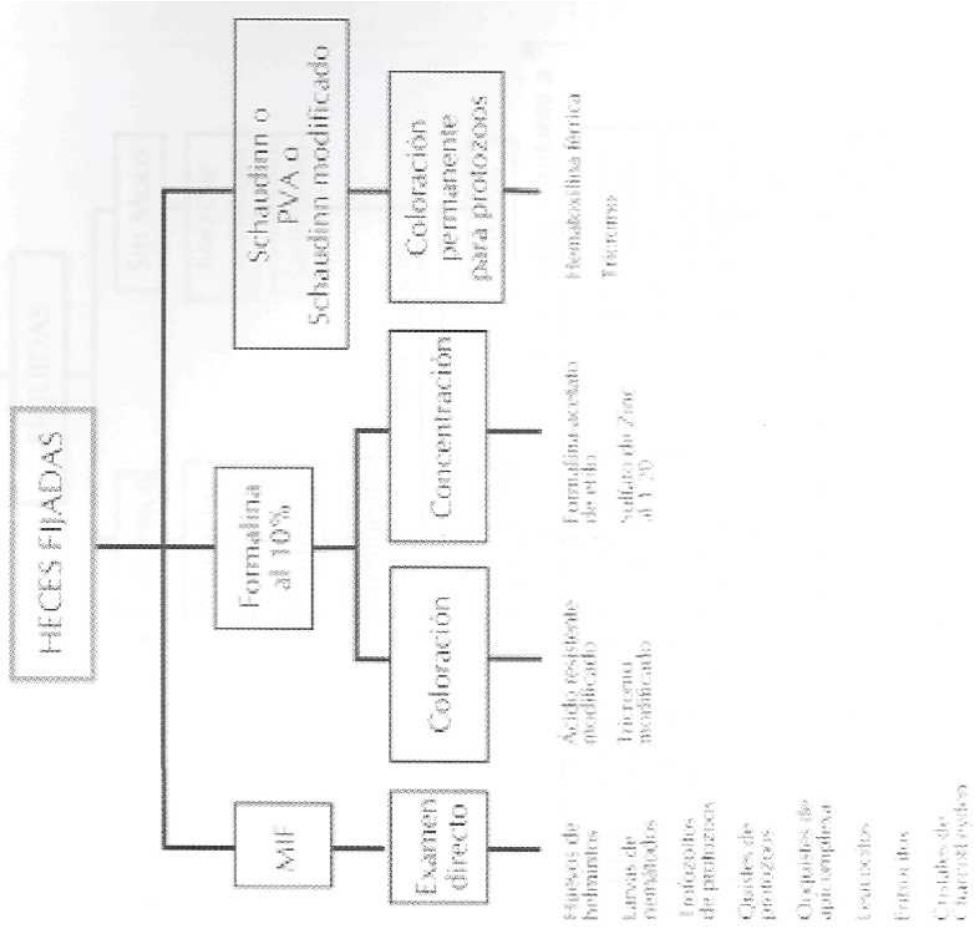


REFERENCIA: Adaptado de: Kaminsky R. Analysis of techniques for surveys of intestinal parasites. East African Medical Journal 1978, 55: 45-53.

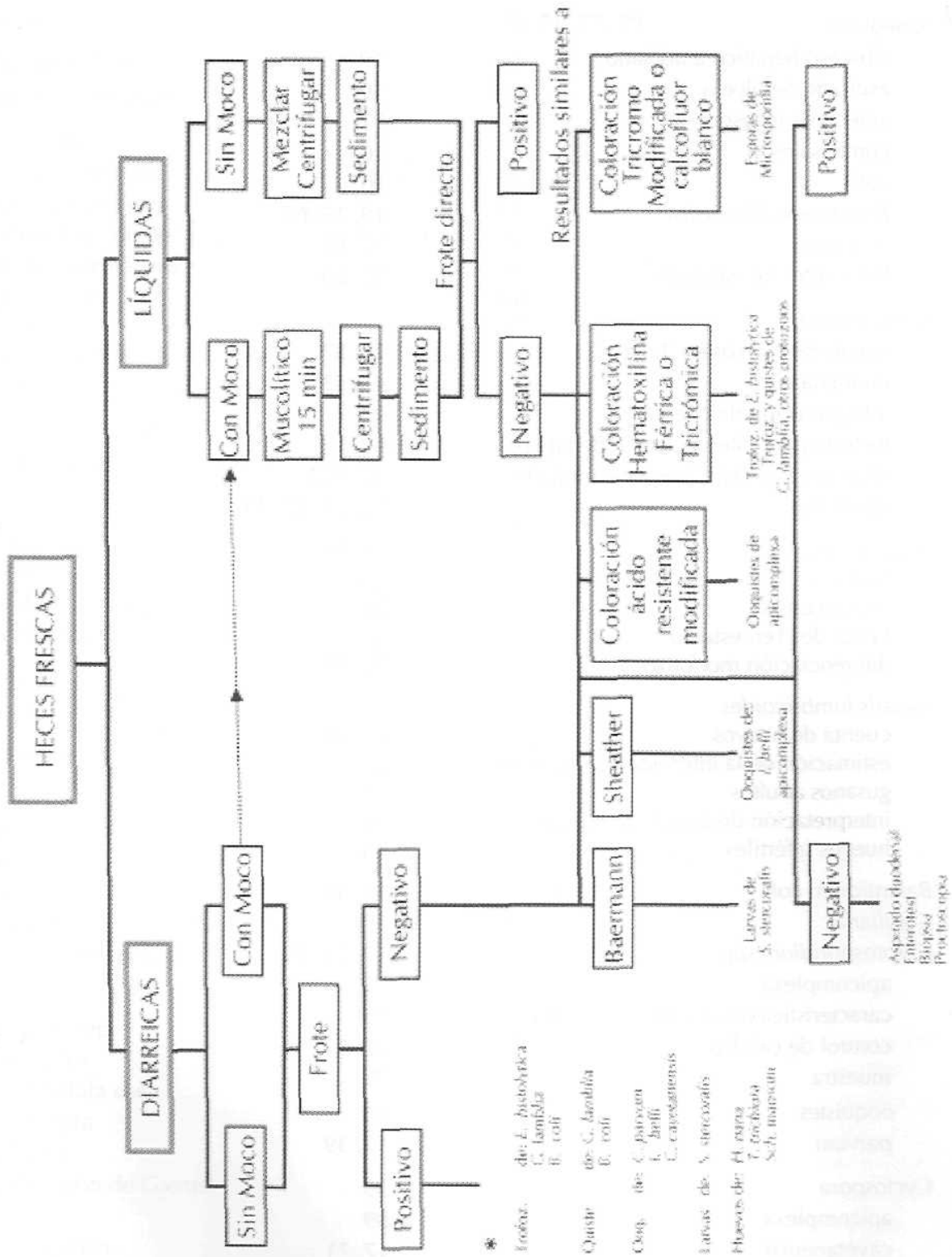
Algoritmo No. 2: Diagrama para examen de heces frescas y la utilidad de cada método. Diagnóstico clínico.



Algoritmo No. 3: Diagrama para examen de heces fijadas. La selección del fijador determinará el tipo de método a utilizar. Diagnóstico clínico.



Algoritmo No. 4 Diagrama para heces diarreicas o líquidas, con o sin moco. La selección de métodos permitiría mejores resultados, asumiendo que el médico haga una solicitud dirigida.



ÍNDICE DE PARÁSITOS MENCIONADOS EN EL MANUAL

Amebiasis	
Absceso hepático amebiano	19
aspirado de úlcera	10
amebiasis invasora	17
comensales	10
cutis	10
<i>Entamoeba histolytica</i>	10, 17, 65
<i>dispar</i>	17, 65
trofozoítos hematófagos	17, 65
<i>Ancylostoma</i>	
cuenta de huevos en 2 mg	23, 53
<i>duodenale</i>	47, 53
interpretación de cuenta	23
método para diferenciación de larvas	47
otras larvas de Uncinaria de animales	47, 125
uncinarias	18, 24, 27, 33
<i>Angiostrongylus</i>	
	51, 59
Babosas	
	59
<i>costaricensis</i>	
	51
larvas del 1er. estadio	
	51
diferenciación morfológica	
	51, 60
<i>Ascaris lumbricoides</i>	
cuenta de huevos	23, 29
estimación de la intensidad de la infección	23
gusanos adultos	33
interpretación de cuenta de huevos	23
huevos infértiles	43
<i>Balantidium coli</i>	
	17, 39
<i>Capillaria</i>	
	59
<i>Cryptosporidium</i> spp	
	17, 71, 75
apicomplexa	
	71
característica de la coloración ARM	
	73
control de calidad	
	45, 73
muestra	
	71
ooquistes	
	19
<i>parvum</i>	
	17, 39
<i>Cyclospora</i>	
	39
apicomplexa	
	39
<i>cayetanensis</i>	
	17, 71
característica de la flotación	
	41

diagnóstico diferencial	73
Ooquistes, flotación	18, 39
SIDA	39, 71, 11, 79
<i>Diphyllobothrium</i>	47
embrionar huevos	47
<i>Echinococcus</i>	57
arena hídática	61
cápsulas prolíferas	61
diferenciación de larvas	62
ganchos rostelares	62, 128
<i>granulosus</i>	62
<i>oligarthus</i>	62
protoescólices	61
<i>vogeli</i>	62
<i>Enterobius vermicularis</i>	
característica de los huevos	35, 36
cinta adhesiva transparente	35
<i>Fasciola</i>	
Huevos	18
embrionar huevos	47
Infección espuria	18
<i>Giardia</i>	17,39
<i>Histoplasma capsulatum</i>	98
<i>Hymenolepis nana</i>	21
<i>Isospora</i>	39
algoritmo No. 4	39, 136
apicomplexa	41, 43, 71, 135, 136
belli	17, 39, 71
característica de la flotación	41
control de calidad	73
Ooquisíes	19
<i>Leishmania</i> spp	103,111,113
aspirados	104, 105
médula osea	103
úlceras	103
biopsia	103
coloración de Giemsa	103, 109
cultivos	105
examen	109
triple N	106
Senejkie's	107, 113

densidad parasitaria de amastigotes	111
frote	107
interpretación de coloración	109
leishmaniasis	103
Montenegro	113
Raspado	103, 104, 105
Malaria (ver Plasmodium)	
Microfilarias	83
Anticoagulante	83
<i>Brugia malayi</i>	85
formalina al 2%	85
Giemsa	83, 85
<i>Loa loa</i>	85
muestra	83
punción venosa	83
vaina	85
<i>Wuchereria bancrofti</i>	85
Microsporidia	10, 77, 79
Cromotopo	77
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	78, 80
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	78, 80
Esporas	77
<i>Necator</i>	
<i>americanus</i>	23, 47, 53
cuenta de huevos en 2 mg	23
interpretación	23
diferenciación de larvas	47
uncinarias	23,29
<i>Paragonimus</i>	
Huevos	18
embrionar huevos	47
trematodo	47
<i>Plasmodium</i> spp	87
aparición de los parásitos	91
cálculo de la parasitemia	92
calidad de la muestra	88
sistema de cruces	92
Cintas reactivas	93
extendido fino	90, 95
Giemsa	88,90,98, 104
gota gruesa	90, 95
malaria	10,87

morfología de los eritrocitos	91
Wright	89,91,98
<i>Sarcocystis</i>	59
<i>Schistosoma</i>	
Huevos	18
<i>mansoni</i>	
schistosomiasis	27
<i>Spirometra</i>	
Céstodo	47
embrionar huevos	47
<i>Strongyloides</i>	
importancia del diagnóstico	51,53
larvas	17,18,47,51
morfología específica	18,53
<i>stercoralis</i>	51
<i>Taenia</i>	
características de los huevos	36
especiación de proglótidos	63
número de ramas uterinas	64
<i>saginata</i>	35, 64
<i>solium</i>	35, 64
Tinta China - Coloración	63
<i>Temidens</i>	47
huevos parecidos a Uncinaria	47
<i>Trichinella spiralis</i>	
Larvas	57, 59, 60
<i>Trichuris trichiura</i>	17
cuenta de huevos	23, 29
estimación de la intensidad de la infección	23
gusanos adultos	33
interpretación de una cuenta de huevos	23
<i>Trypanosoma</i>	
<i>cruzi</i>	10,95
hemocultivo	99
opciones para recobrar tripanosomas circulantes	95
<i>rangeli</i>	10, 97, 98, 99
serodiagnóstico	101
xenodiagnóstico	99
<i>Trychostrongylus</i>	47
huevos parecidos a Uncinaria	47