



**Organización
Panamericana
de la Salud**

Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud



MANUAL DE PARASITOLOGÍA

3ra. Edición

**Técnicas para Laboratorio de Atención Primaria
de Salud y para el Diagnóstico de las
Enfermedades Infecciosas Desatendidas**



ACDI





MANUAL DE PARASITOLOGÍA

3ra. Edición

**Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria
de Salud y para el Diagnóstico de las
Enfermedades Infecciosas Desatendidas**

Rina Girard de Kaminsky, M.Sc.

Profesor Titular V, Departamento de Pediatría, Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Nacional Autónoma de Honduras

MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

Título

Manual de Parasitología. Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas. 3ra. Edición

Autor: Rina Girard de Kaminsky

Revisión y corrección: Astarté Alegría, Jackeline Alger, Douglas Avelar, Gustavo Avelar, Irma Gloria Enamorado, Jorge García, Daisy Guardiola, Wendy López, Enil Peralta, Nora Rodríguez, Concepción Zúniga.

Diseño de Portada y Diagramación: Marvin Daniel Vásquez

Impresión: 300 Ejemplares, Papelería e Imprenta Honduras

Fotografías de la portada y contraportada: originales de Rina Kaminsky, Jackeline Alger y Servicio de Parasitología, HEU, Honduras.

*Primera edición 1996
Segunda edición 2003
Tercera edición 2014*

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

El Manual ha sido posible gracias a las contribuciones del Instituto de Enfermedades Infecciosas y Parasitología Antonio Vidal (IAV), la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y Organización Mundial de la Salud (OMS), la Asociación Hondureña de Parasitología (AHPA), la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH) y Agencia Canadiense Internacional para el Desarrollo (ACDI).

CONTENIDO

Sobre la autora	5
Prefacio	7
Prefacio a la 3ra. Edición	9
Reconocimientos y agradecimientos a instituciones, a profesionales de la salud y a personal de apoyo que participaron en la revisión del manual de parasitología	11
Prólogo	13
I. - Introducción al trabajo en laboratorios de parasitología en atención primaria de salud	
1.1 El laboratorio en la identificación parasitológica de confirmación.	17
1.2 Registro diario de los resultados, Servicio de Parasitología, Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital Escuela Universitario.	21
1.3 Para aplicar a programas de enfermedades infecciosas desatendidas	24
II. - Microscopio y Microscopía	
2.1 Partes del microscopio	31
2.2 Enfoque interpupilar y ocular	32
2.3 Iluminación Koehler	32
2.4 Calibración y medición	34
2.5 Cuidados del microscopio	37
III. - Parásitos intestinales luminares y tisulares. Examen de heces frescas y fijadas	
3.1 Examen directo en solución salina fisiológica y en solución de Lugol	41
3.2 Estimación de la carga parasitaria de geohelminetos, tres métodos	45
Búsqueda de huevos de <i>Enterobius vermicularis</i> y de <i>Taenia</i> spp.	54
III. - Parásitos intestinales luminares y tisulares. Métodos de concentración	
4.1 Frote grueso de heces o Kato	59
4.2 Flotación por sulfato de zinc	61
4.3 Flotación por Sheather	64
4.4 Sedimentación formalina acetato de etilo	68
III. - Parásitos intestinales luminares y tisulares. Recobrar y diferenciar larvas de nemátodos y verificar viabilidad de huevos de algunas especies de helmintos	
5.1 Método de Harada Mori	75
5.2 Método de Baermann modificado	79
5.3 Migración de larvas en agar o método de Koga	82
5.4 Identificar larvas de tejidos: método de compresión	86
5.5 Digestión artificial	87
III. - Parásitos intestinales luminares y tisulares. Identificación especial de algunos cestodos: proglóditos, larvas y ganchos rostelares	
6.1 Método rápido de tinta china para especiación de <i>Taenia</i>	93
6.2 Método de montaje en berlese de ganchos rostelares de cisticercos	95
6.3 Método de medición e identificación morfológica de ganchos rostelares.	97

MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

III. - Parásitos intestinales luminales y tisulares. Coloraciones: identificación de protozoos intestinales luminales y tisulares; esporas de microsporidia	
7.1 Coloración con hematoxilina férrica de Heidenhain para trofozoítos y quistes, protozoos intestinales	103
7.2 Coloración ácido resistente modificada para ooquistes de apicomplexa intestinales	109
7.3 Coloración tricromo modificada para esporas de microsporidia	113
7.4 Coloración azul de metileno-tricromo, esporas de microsporidia	116
IV. - Parásitos transmitidos por vectores. Diferentes métodos de concentración, coloración y cultivo	
8.1 Concentración y coloración de microfilarias	121
8.2 Diagnóstico microscópico de la malaria	126
8.3 Diagnóstico de <i>Trypanosoma cruzi</i> en Enfermedad de Chagas	134
8.4 Métodos más complejos para el diagnóstico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	138
8.5 Confirmación parasitológica de leishmaniasis: dos métodos	140
8.6 Estimación de la densidad parasitaria de amastigotes en frotos de material esplénico aspirado	148
Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR)	
9.1 Immunocard STAT! Crypto/Giardia	151
9.2 Prueba de Diagnóstico Rápido (PDR) para malaria	152
9.3 Pruebas de Diagnóstico Rápido para la Enfermedad Chagas y método indirecto por serología	156
9.4 Pruebas de Diagnóstico Rápido y serología para leishmaniasis	158
Fotografías y Microfotografías	159
V.- Algoritmos	
1. Alternativas de métodos para examen de heces. encuestas epidemiológicas. Heces frescas	173
2. Alternativas de métodos para examen de heces. encuestas epidemiológicas. Heces fijadas	174
3. Diagrama para seleccionar métodos en el examen de heces frescas y el propósito de cada método	175
4. Diagrama para seleccionar métodos en el examen de heces fijadas. La clase de fijador determinará el tipo de método a utilizar	176
5. Diagrama para heces diarreicas o líquidas, con o sin moco. La selección del método permitirá mejores resultados, asumiendo que el médico haga una solicitud dirigida	177
Anexos	181
Acceso páginas web	183
Ilustraciones	184
Índice de soluciones	184
Índice de parásitos	185

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 interés en investigación y sólida experiencia en parasitología clásica y en el diagnóstico de laboratorio de parásitos, con énfasis en aquellos intestinales, lumbinales y tisulares, así 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 International (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. 2003.**

PREFACIO

Los métodos contenidos en la 2da 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.

MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

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
2da Edición, 2003.*

PREFACIO A LA 3ra. EDICIÓN

En el mes de junio 2012 y contando con la colaboración del Instituto de Enfermedades Infecciosas y Parasitología Antonio Vidal (IAV), se hizo una convocatoria entre personal de la Asociación Hondureña de Parasitología (AHPA), la Universidad Nacional Autónoma de Honduras y la Secretaría de Salud para revisar el Manual de Parasitología considerando una 3ra. edición. Se habían agotado ejemplares de la edición anterior y era necesario cubrir el espacio, sobre todo por las necesidades a mediano y largo plazo surgidas con la implementación por la Secretaría de Salud del Plan Estratégico de Atención, Prevención, Control, Eliminación de Enfermedades Infecciosas Desatendidas y que fuera igualmente oportuno en la atención primaria de salud. Las técnicas descritas permanecen similares a las contenidas en ediciones anteriores; se unificó y mejoró la presentación para facilitar su uso, editando y adaptando detalles que no habían sido considerados antes.

Este no es un texto de estudio. Es un instrumento de trabajo, consulta y referencia desarrollado como un recurso para personal de laboratorio de cualquier nivel para la ejecución de técnicas básicas necesarias en laboratorios de salud en Honduras, aplicables en alguna medida en la ejecución del Plan Estratégico mencionado arriba. Se espera que sea igualmente de utilidad en países de la región centroamericana.

En la preparación de esta edición fuimos asistidos por miembros de la Asociación Hondureña de Parasitología (AHPA) y del Instituto de Enfermedades Infecciosas y Parasitología Antonio Vidal (IAV), igual que por personal de la Secretaría de Salud invitado, quienes leyeron y ofrecieron sugerencias en la presentación, contenido, fotografías y otros detalles en diferentes capítulos. Se dejaron algunas de las referencias originales que describían un método en particular y se han agregado otras más recientes que probaron y citan la literatura anterior.

El contenido de este manual no incluye métodos moleculares ni inmunoensayos para el diagnóstico clínico, a excepción de algunas pruebas rápidas para dos protozoos intestinales y para parásitos de transmisión vectorial. Se agregó un listado de accesos a páginas web especializadas en parasitología que permiten ampliar las consultas. La autora, basada en evidencia, está convencida que si el personal de laboratorio responsable de ejecutar cualquier método para recobrar e identificar parásitos o sus productos no cuenta con la preparación, conocimientos y disciplina necesarios, el mejor método del mundo no tendrá ningún valor en sus manos.

La autora expresa sus agradecimientos a las Organizaciones patrocinadoras, sin cuya ayuda la 3ra. Edición no hubiera sido posible.

MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

El IAV proporcionó la oportunidad de discutir el documento en una reunión especial; la Secretaría de Salud permitió a los médicos, microbiólogos y técnicos de laboratorio para atender la reunión; varios de los participantes son empleados de diferentes facultades y escuelas de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras; la AHPA avaló los contenidos del Manual; la Organización Panamericana de la Salud OMS/ACDI otorgaron los fondos necesarios para el diseño e impresión del documento. Se reconoce la cooperación del diseñador y la imprenta que participaron en esta 3ra. Edición.

*Rina Girard de Kaminsky, M.Sc.
Departamento de Pediatría
Facultad de Ciencia Médicas
Servicio de Parasitología
Departamento de Laboratorio Clínico
Hospital Escuela Universitario
Tegucigalpa, Honduras 2014.
camilaestela12@yahoo.com*

Reconocimientos y agradecimientos a instituciones, a profesionales de la salud y a personal de apoyo que participaron en la revisión del Manual de Parasitología y en la reunión en Tegucigalpa, Honduras, para su discusión. Junio 2012.

Instituciones

Instituto de Enfermedades Infecciosas y Parasitología Antonio Vidal (IAV). Director Ejecutivo Dr. Efraín Bú Figueroa.

Asociación Hondureña de Parasitología (AHPA). Presidente Dr. Concepción Zúniga.

Departamento de Pediatría, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de Honduras (FCM UNAH).

Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis, Secretaría de Salud, Honduras.

Organización Panamericana de la Salud/Honduras (OPS). Representante Dra. Gina Watson.

Organización Mundial de la Salud (OMS), Ginebra, Suiza.

Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional (ACDI).

Profesionales de la Salud

Astarté Alegría

Candidata al Doctorado, Profesor Titular, Docente Postgrado Salud Pública Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

Jackeline Alger

Medico Parasitóloga, Servicio de Parasitología, Hospital Escuela Universitario y Unidad de Investigación Científica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de Honduras; Miembro IAV, AHPA.

Douglas Avelar

Médico Epidemiólogo, Región Departamental de Salud de Choluteca, Secretaría de Salud, Honduras.

Gustavo Avelar

Médico Epidemiólogo, Hospital Regional del Sur, Secretaría de Salud, Honduras.

Irma Gloria Enamorado

Doctor en Microbiología, Escuela de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

Jorge García

Doctor en Microbiología, Escuela de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras; Hospital Escuela Universitario, Instituto Antonio Vidal y Miembro AHPA.

Daisy Guardiola

Médico Epidemióloga, Región Departamental de Salud de Atlántida, Secretaría de Salud, Honduras.

Rina Girard de Kaminsky

Parasitóloga, Departamento de Pediatría, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de Honduras; Servicio de Parasitología, Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital Escuela Universitario; Miembro IAV, AHPA.

Wendy López

Técnico en Laboratorio Clínico, Servicio de Parasitología, Hospital Escuela Universitario, Secretaría de Salud, Honduras; Miembro AHPA.

Enil Peralta

Doctor en Microbiología, Región Departamental de Salud de Atlántida, Secretaría de Salud, Honduras.

Nora Rodríguez

Médico Epidemióloga, Región Metropolitana de Salud del Distrito Central, Secretaría de Salud, Honduras.

Concepción Zúniga

Médico Parasitólogo, Jefe del Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis, Secretaría de Salud, Honduras; Miembro IAV, AHPA.

Personal de apoyo

Karla Rivera

Administradora Instituto de Enfermedades Infecciosas y Parasitología Antonio Vidal.

PRÓLOGO

¿Por qué un Manual de Parasitología con técnicas para Laboratorios de Servicios de Atención Primaria de Salud en el contexto de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas?

El laboratorio clínico forma parte de los servicios de salud cuyas funciones son contribuir al diagnóstico y control de los pacientes atendidos en los servicios de salud y aportar al conocimiento de la presencia y distribución de las enfermedades en el espacio geográfico en que opera. Este servicio de salud (ubicado en los diferentes niveles de atención de acuerdo a los tipos de unidades o establecimientos de salud, al modelo de gestión de servicios o modalidades administrativas de la prestación de servicios, a las características del trabajador de salud, y de la comunidad con sus necesidades, recursos, y organización), ocupa un lugar privilegiado en cuanto a su función especializada y de generación de información epidemiológica de medidas de morbilidad, las que se establecen según criterios de gravedad y complejidad.

En los sistemas de salud con modalidades de atención organizadas con enfoque de atención primaria en salud, los niveles de atención tienen como objetivo brindar una atención escalonada a las necesidades del paciente en respuestas enlazadas de medicina general y especializada. En esta organización, el servicio de laboratorio clínico es un componente de la estructura del establecimiento de salud, con funciones específicas como ser: el control y vigilancia de enfermedades, la gestión integrada de datos, la referencia de pruebas a centros de mayor complejidad, el desarrollo de políticas, la garantía de calidad con desarrollo de normas de protocolo de trabajo, la respuesta de urgencia, calidad y oportunidad, la investigación relacionada con salud pública, y la formación-capacitación de recursos humanos.

La estrategia para este perfil es la integración del laboratorio en los diferentes niveles: hospital, red de servicios de laboratorio y red de servicios de salud pública. De manera operativa en el primer nivel de atención, el laboratorio es un instrumento para la vigilancia epidemiológica, e instrumentos como este Manual una herramienta normativa de trabajo.

Un grupo de enfermedades muy poco priorizadas en los programas nacionales de salud son las denominadas Enfermedades Infecciosas Desatendidas, llamadas así por la invisibilidad, al no ser un problema notorio de salud que revele manifestaciones que capten la atención de la sociedad en general, no obstante provocan discapacidad y deficiencias permanentes a los que las sufren. Las Enfermedades Infecciosas Desatendidas son una lista de infecciones parasitarias, bacterianas y virales que afectan a más de la mitad de la población mundial que vive en condiciones de extrema pobreza. La mayoría son enfermedades parasitarias

transmitidas por insectos, otras se propagan por el agua contaminada y el suelo infestado por huevos de gusanos. Para algunas de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas hay métodos diagnósticos simples y accesibles en términos tecnológicos y económicos, así como herramientas efectivas para su combate y tratamiento.

El presente Manual de Parasitología está diseñado para todo establecimiento de salud que cuente con un laboratorio que ofrezca diagnóstico parasitológico. Está confeccionado como una herramienta de vigilancia epidemiológica para todo el personal de salud que trabaje en un laboratorio clínico. Su alcance y aplicación con enfoque de Atención Primaria en Salud inicia con el diagnóstico eficaz y oportuno en comunicación y coordinación con el resto de departamentos, programas, unidades o espacios del establecimiento de salud donde se utilice. Idealmente, esto implica el uso de formatos, fichas, protocolos, guías, etc. para el registro de información de manera unificada entre los establecimientos de salud. Esto facilita el sistema de referencia y la continuidad de la atención prestada.

*Astarté Alegría, M.Sc.
Profesor Titular
Docente Postgrado Salud Pública FCM-UNAH*

Referencias

1. Forti S. La APS como Ordenadora del Sistema de Salud: Ventajas y Desventajas de una Puerta Preferencial. EUROsociAL. 2009.
2. Kroeger A, Luna R. Atención Primaria en Salud. Principios y Métodos. OPS. 1992.
3. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades Tropicales Desatendidas. www.who.int/topics/tropical_diseases/factsheets/neglected/es

I. INTRODUCCIÓN AL TRABAJO EN LABORATORIOS DE PARASITOLOGÍA EN ATENCIÓN PRIMARIA DE SALUD

- 1.1** EL LABORATORIO EN LA IDENTIFICACIÓN PARASITOLÓGICA DE CONFIRMACIÓN.
- 1.2** REGISTRO DIARIO DE LOS RESULTADOS, SERVICIO DE PARASITOLOGÍA, DEPARTAMENTO DE LABORATORIO CLINICO, HOSPITAL ESCUELA UNIVERSITARIO.
- 1.3** PARA APLICAR A PROGRAMAS DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DESATENDIDAS.

1.1 El laboratorio en la identificación parasitológica de confirmación

La confirmación de parásitos o sus productos de reproducción en muestras de pacientes sospechosos clínicamente de tener una infección o enfermedad de origen parasitario, se basa en la identificación morfológica de los organismos causantes. Los criterios utilizados para este reconocimiento e identificación deben ser del dominio de todo personal de laboratorio, irrespectivamente de su formación profesional. Esto debido a que el personal ocupa diferentes cargos en instituciones que tienen sus exigencias particulares o cuando labora en hospitales públicos o privados, rota por diferentes turnos de trabajo, sobre todo en aquellos que mantienen una consulta durante 24 horas y debe estar preparado para atender estas solicitudes.

La aparición de nuevos métodos de diagnóstico laboratorial, tales como pruebas moleculares e inmunoensayos, exigirá primero conocimientos epidemiológicos sólidos de las parasitosis que prevalecen geográficamente, para poder interpretar en países tropicales el significado de estos resultados de manera correcta. Será indispensable, a su vez, que el clínico sea capaz de interpretar la relevancia o no de esos resultados, lo cual exigirá una formación sólida sobre la especialidad de parasitología. Por los momentos, la identificación parasitológica continuará dependiendo de la capacidad y confiabilidad del personal de laboratorio en la identificación morfológica.

La recolección adecuada de muestras es crítica, ya sea para confirmación o para realizar encuestas y estudios de investigación sobre diferentes especies de parásitos del humano. Si esto no se cumple, los parásitos o sus productos de identificación no serán detectados. A su vez, para la observación microscópica será requisito la aplicación de técnicas que permitan recobrar, concentrar, extraer, las formas diagnósticas observables bajo el microscopio óptico con la menor alteración posible. No es competencia de este Manual considerar cada uno de esos aspectos, esto depende de las normas por las cuales se rigen los laboratorios nacionales. Sin embargo, cada método incluye un párrafo sobre la manera de recolectar la muestra para ejecutar esa técnica en particular. Muchos de los métodos son los mismos que se utilizan en encuestas epidemiológicas y en investigaciones puntuales.

Equipo básico

La mayoría del equipo necesario para el reconocimiento de parásitos y sus productos de reproducción se encuentra en cualquier laboratorio clínico y el usuario debe estar familiarizado con su funcionamiento y utilidad.

Microscopio

El microscopio óptico es el instrumento más importante, que debe tener una óptica excelente, debe mantenerse limpio y sin rayones en las lentes, utilizar el papel de lente adecuado para su limpieza y una fuente de luz eléctrica. No se debe olvidar de tener a mano repuestos de los focos.

El microscopio se prefiere binocular sobre todo cuando el uso es prolongado y debe tener:

Oculares de 10X

Objetivos de 4.5X, 10X, 40X y 100X

Deseable un graticulo para calibrar y poder medir estructuras

No utilizar

Ningún otro material excepto papel lente especial para microscopios para limpiar las lentes; no utilizar alcohol de ninguna clase, acetona ni xilol para limpiar las lentes.

Limpieza externa

Limpiar la platina o carro y las piezas externas con desinfectante cuando se contaminen y después del uso diario. Mantener el microscopio cubierto con plástico cuando no se utiliza. Dar mantenimiento por un técnico especializado por lo menos una vez al año.

Centrífuga

La centrífuga puede ser de mesa o de pie, con la capacidad para centrifugar un mínimo de 12 tubos a la vez. Se prefiere que tenga cabezal horizontal para que el sedimento o el sobrenadante se deposite de manera uniforme y pueda ser removido sin dificultad cuando se ejecutan métodos de concentración. Las camisas deben ser de tamaño adecuado para aceptar los tubos de ensayo que se utilizan comúnmente en el laboratorio.

Al usarse, la centrífuga debe ser balanceada cada vez que se introduzcan tubos para centrifugar. Si cuando está en uso vibra o hace ruido, es necesario detener la operación y verificar el balance simétrico de los cabezales y tubos. Se debe esperar hasta que termine completamente de centrifugar y se haya detenido antes de abrir la tapadera. Periódicamente se debe limpiar el interior con desinfectante.

Refrigerador

Este puede ser el común doméstico, de preferencia que no requiera descongelar periódicamente. Debe mantenerse limpio, desinfectado, verificar la temperatura y no debe usarse para guardar alimentos al mismo tiempo que muestras y reactivos de laboratorio.

Precauciones universales aplicadas al laboratorio

- Todo material que se recibe procede de pacientes que consultan por alguna patología, infecciosa o no, por consiguiente, aplicar prácticas universales de bioseguridad. Es obligatorio el lavado de manos frecuente con agua y jabón, siguiendo las instrucciones en los carteles distribuidos por la Secretaría de Salud.
- El uso de guantes es obligatorio para el manejo de muestras de sangre en general y para búsqueda de parásitos transmitidos por vectores u otros; para tomar las muestras de úlceras para búsqueda de leishmaniasis, amebiasis u otros.
- El uso de guantes en parasitología intestinal es debatido y desaconsejado si no se utilizan de manera adecuada. Es preferible lavarse las manos al instante que ocurre una contaminación accidental en vez de contaminar todas las superficies con los guantes manchados y sucios porque no se utilizan de manera adecuada.

Material de referencia.

Todo laboratorio de parasitología debe contar con un mínimo de referencias, las cuales pueden ser algunas o todas de las siguientes:

- Manuales de técnicas empleadas en el laboratorio.
- Atlas con fotografías o las láminas de Medios auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales de la Organización Mundial de la Salud.
- Muestras coloreadas de parásitos tales como coloración ácido resistente modificada para apicomplexa intestinales, coloraciones de gota gruesa y extendido con Giemsa para especies de *Plasmodium* y *Trypanosoma cruzi*.
- Muestras de heces preservadas en formalina al 5% o al 10% conteniendo diferentes estadios de parásitos intestinales, quistes, trofozoítos, ooquistes, huevos, larvas, etc., rotuladas debidamente y con la fecha, se debe evitar que se resequen y se deben sustituir cuando sean muy viejas.

Principios generales para la recolección de muestras de heces para diagnóstico parasitológico.

- Cuando las heces no se recogen de manera adecuada, los resultados no son confiables. Heces viejas y no preservadas no tienen valor diagnóstico. Heces refrigeradas no son recomendadas para buscar larvas de helmintos como *Strongyloides stercoralis*. Para buscar trofozoítos de protozoos se requiere que la muestra sea examinada dentro de una hora o menos después de evacuada.
- Cuando hay moco y sangre debe incluirse esta porción, igual que parásitos adultos, segmentos de estróbila de cestodos, otros.
- Debe evitarse dar antidiarreicos o antibióticos o antiparasitarios antes del examen de heces; tampoco se acepta administración de laxantes aceitosos, bario o bismuto antes de la recolección de la muestra.
- Se tratará de revisar las instrucciones de recolección de muestras según parásito o método a aplicar en donde amerite.
- Es práctica recomendada de informar al clínico por medio de memoranda o avisos cada vez que se requiera recolección particular de muestras al implementar nuevas metodologías.

Para laboratorios clínicos

- No está definido un límite para el número de veces que el médico solicite una muestra de heces del mismo paciente, puede ser tantas veces hasta estar satisfecho del resultado; por ejemplo, para encontrar larvas de *S. stercoralis* a veces hay que examinar muestras a intervalos durante un mes; para encontrar quistes o trofozoítos de *Entamoeba histolytica* o de *Giardia lamblia* a veces se requieren hasta 6 muestras recogidas en diferentes días.

- Las muestras de heces para examen parasitológico deben recogerse en frascos de vidrio o cartón parafinado o plástico, limpios y secos, sin contaminación con agua ni orina. Puede defecarse sobre papel periódico y después transferir una porción de la muestra al frasco de transporte o directamente en una bolsa plástica cuando son heces de 24 horas para recobrar parásitos post tratamiento, cuando hay moco y sangre.
- Si las heces son diarreicas puede defecar en bolsa plástica o si es niño menor, en recolector de orina por ejemplo.

Nota: *Por lo general el clínico en Honduras no consulta al laboratorio cuando existen problemas de diagnóstico clínico o sospecha algún agente etiológico en particular, ni ofrece datos sobre la sintomatología del paciente o enfermedades de base como infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH/Sida); tampoco solicita métodos específicos y la boleta indica solamente “Examen General de Heces”. El personal de laboratorio debe tener una preparación básica fortalecida por datos epidemiológicos de prevalencias por regiones o por categorías de pacientes, ej. paciente oncológico, paciente alcohólico, niños menores de 5 años, etc., para decidir aplicar otros métodos aunque no solicitados, pero que puedan hacer los resultados más confiables y seguros. O siempre puede consultar con el clínico sobre la enfermedad de base del paciente para ofrecerle otros métodos disponibles que aseguren un resultado mejor dirigido.*

Regla de oro en Parasitología - recobrar, identificar y demostrar el parásito, o sus productos de reproducción para determinar la etiología de la infección o enfermedad parasitaria.

- **Métodos directos:** son aquellos que identifican al parásito o sus productos de reproducción.
- **Métodos indirectos:** ofrecen resultados sugestivos de enfermedad parasitaria pero no confirman el agente etiológico.

Ejemplos: Métodos directos

- Baermann- extrae larvas que se identifican a especie por morfología.
- Flotación de Sheather- concentra ooquistes de algunos apicomplexa.
- Raspado de úlcera perineal- demuestra trofozoítos de *Entamoeba histolytica* en amebiasis cutis.
- Raspado de úlcera cutánea- evidencia amastigotes de *Leishmania*.
- Lavado bronquial- demuestra estadios de *Pneumocystis* spp. en algunas situaciones de inmunocompromiso.

Los algoritmos o diagramas en las **páginas 171 – 177** ofrecen alguna ayuda para escoger la opción más apropiada de examen de heces.

Ejemplos: Métodos indirectos

- Inmunológicos- hemaglutinación indirecta para tripanosomiasis americana
- Inmunohistoquímicos- microsporidiosis
- Radiografía de abdomen- para visualizar intestinales en infección aguda o crónica por *Angiostrongylus costaricensis*
- Tomografía axial computarizada- neurocisticercosis
- Resonancia magnética- absceso hepático amebiano
- Péptidos sintéticos, otra tecnología biomolecular- diferenciar *Trypanosoma cruzi* de *T. rangeli*

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

Heces	Sangre	LCR
Biopsia de tejidos	Aspirados	Pus
Orina	Secreciones	Otros líquidos
Espujo	Excreciones	Parásito <i>in toto</i>

1.2 Registro diario de los resultados, Servicio de Parasitología, Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital Escuela Universitario.

Se ofrece un ejemplo de registro diario de laboratorio, que al final del mes funciona como el libro de registro mensual del Servicio de Parasitología del Hospital Escuela Universitario, a falta de uno estandarizado normatizado por el Laboratorio Nacional de Referencia. Ha funcionado durante más de 25 años con diferente personal que ha rotado por el Servicio de Parasitología y al fin de cada año se guardan celosamente desde hace 23 años. Está disponible para cualquier personal de salud que desee consultarlo u obtener cualquier dato; sin embargo, la operación debe ser realizada dentro del Servicio de Parasitología, ya que no se prestan para ser llevados a otro local. Al final de cada día, los resultados son computarizados en una base de datos, diseñada especialmente para el Servicio de Parasitología. Se mantiene esta información en el programa EpiInfo (CDC, Atlanta, GA, EUA) desde el año 2000.

- Las abreviaciones son las que se colocan en la hoja de registro diario utilizada en el Hospital Escuela Universitario, según los hallazgos de los diferentes exámenes de heces y que están explicados en la hoja de ejemplo.
- Se utiliza únicamente 4 diferenciaciones en la consistencia de las heces; si hubiera algo que explicar se coloca en la boleta como “nota”.
- El número colocado bajo las columnas de cada geohelminto indica el número de huevos en 2 mg de heces contado para cada caso.
- Cualquier resultado colocado en paréntesis, ejemplo: (L) [larvas de *S. stercoralis*] significa que se realizó Baermann u otro examen de concentración según corresponda; se omite el parentesis cuando el hallazgo se confirmó en la preparación directa solamente.

MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

- El paréntesis [ooq] en las columnas de apicomplexa indica que se realizó el método ácido resistente modificado y que el resultado no es únicamente el hallazgo en la preparación directa en solución salina o solución de Lugol. Cuando se realiza la coloración y/o un concentrado y no se encuentran ooquistes, se coloca siempre el [o] con el símbolo que significa “negativo” y que se hicieron los métodos correspondientes.
- Cuando se encuentran trofozoítos hematófagos de *Entamoeba histolytica*, esto se deletrea tal cual, ya que para nosotros es un hallazgo extraordinario. De otra forma en esta y el resto de especies de protozoos intestinales, se anota Q o T para quistes o trofozoítos respectivamente.
- Cuando en el examen de heces no se observan parásitos y no hay otros hallazgos, las casillas se dejan en blanco. Se prefiere de esta manera para visualizar mejor los resultados positivos.
- Los resultados de la gota gruesa y los de leishmaniasis se incluyen tal como está demostrado. Los resultados de cultivo de *Leishmania* igualmente se colocan escritos.
- Los controles de gota gruesa para malaria después de administrado el tratamiento se marcan como tales: control gota gruesa día... (día 3, día 7, día 14, día 21, día 28).

1.2 Ejemplo de hoja de registro diario, Servicio de Parasitología, Departamento de Laboratorios Clínicos, Hospital Escuela Universitario, Honduras.

No.	Nombre(nombres y datos ficticios)	Exped	Sal	Ed/Sx	Con	Mc	Sa	Leuc	SO	Al	Ti	Un	Ss	Tsp	Hn	Csp	Ibe	Cc	Eti/Ed	Ec	Eha	En	Ib	GI	Chm	Th	Bh			
1	Reina Isabel España Carrillo	2245609	MAM	24a/F	D	M			+	42	7	131																	+	
2	Julio Enrique Niño Munguia	2352892	E Ped	5ª/M	B	E					10					[ooq]														
3	Enriqueta María López Urrutia	2227864	MBM	53ª/F	F				⊗																					
4	Luis Miguel Escobar Santos	2243875	CE Derm	8ª/M	F																									
5	Angel Domingo Pérez Ruiz	2239758	EMI	31ª/M	Gota gruesa: Plasmodium vivax 18 EAS y 2 gametocitos en 104 leucocitos																									
6																														
7																														
8	Etc...																													

Abreviaciones:

- Exped= expediente
- Sal= sala
- MAM= Medicina A de Mujeres
- MBM= Medicina B de Mujeres
- EPed = Emergencia Pediatría
- MedPed= Medicina Pediatría
- CE Derm = Consulta Externa Dermatología
- EMI= Emergencia Medicina Interna
- Ed/Sx= Edad/Sexo
- Con= Consistencia (F formada, B blanda, D diarrea, L líquida)
- Mc= moco (E escaso, M moderado, A abundante)
- Sa= Sangre macro
- Leuc=leucocitos (E escasos, M moderados, A abundantes)
- SO = Sangre oculta (negativa, + positiva)
-
- Al= *Ascaris lumbricoides* (42= número de huevos/2 mg heces)
- Ti= *Trichuris trichiura* (10 No. huevos/2 mg)
- Un= Uncinarias del humano (No. huevos/2 mg)
- Ss = *Strongyloides stercoralis* L (arvas)
- Tsp= *Taenia* spp H (huevos)
- Hn= *Hymenolepis nana* H (huevos)
- Csp= *Cryptosporidium* [ooq] (ooquistes) [⊗] (negativa)
- Ibe= *Isoospora belli* [ooq] (ooquistes) [⊗] (negativa)
- Cc= *Cyclospora cayentanensis* [ooq] (ooquistes) [⊗] (negativa)
- Eh/Ed= *Entamoeba histolytica/E. dispar* Q (quistes) T (trofozoitos)
- Ec= *Entamoeba coli* Q (quistes) T (trofozoitos)
- Eha= *Entamoeba hartmanni* Q (quistes) T (trofozoitos)
- En= *Endolimax nana* Q (quistes) T (trofozoitos)
-
- Ib= *Iodamoeba bütschlii* Q (quistes) T (trofozoitos)
- Gi= *Giardia lamblia* Q (quistes) T (trofozoitos)
- Chm= *Chilomastix mesnili* Q (quistes) T (trofozoitos)
- Th= *Trichomonas hominis* T (trofozoitos)
- Bc= *Balanitium coli* Q (quistes) T (trofozoitos)
- Bh= *Blastocystis hominis* + (presente)
- EAS= estadíos asexuales sanguíneos

1.3 Para aplicar a programas de Enfermedades Infecciosas Desatendidas

De las nueve Enfermedades Infecciosas Desatendidas que conforman el Plan Estratégico para la Atención, Prevención, Control y Eliminación 2012-2017 de la Secretaría de Salud, Honduras, cinco son parasitosis: dos transmitidas por vectores (leishmaniasis, tripanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas) y las dos restantes son en realidad cinco, tres de las cuales se agrupan bajo una sola denominación: geohelmintiasis, por compartir características epidemiológicas y de control en conjunto y teniasis/cisticercosis que utiliza hospedero intermediario. Las geohelmintiasis comprenden infecciones crónicas por nematodos intestinales *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides* y uncinarias del humano: *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*.

El común denominador para estas parasitosis, además de haber estado ignoradas y desatendidas, está asociado con poblaciones pobres de países en vías de desarrollo, carentes de necesidades básicas de salud, educación y bienestar general, añadiendo la degradación ambiental por desastres naturales y todas juntas dificultando acciones para la reducción de la pobreza. Ejemplos de ello son poblaciones marginalizadas periurbanas, población indígena, pequeños grupos étnicos, privados de libertad, población agrícola rural, mineros, pescadores y desplazados por conflictos o por desastres naturales.

Todas son causa importante de morbilidad y mortalidad que afectan a los integrantes más vulnerables de ésta población carente de lo básico, menores de 12 años de edad y mujeres en edad reproductiva. Estas parasitosis son un obstáculo al desarrollo económico, producen discapacidades crónicas, deformaciones o mutilaciones para el resto de la vida; para algunas de ellas no existen medicamentos que curen la enfermedad, reducen sobrevivencia infantil y logros en educación y contribuyen al atraso en la agricultura y trabajos productivos en edad adulta.

Los programas de acción contra estas enfermedades dependerán de la epidemiología de cada una de ellas. Las geohelmintiasis se agrupan bajo un control diferente al de teniasis/cisticercosis; para las transmitidas por vectores deben realizarse acciones en conjunto dirigidas a la enfermedad y a los diferentes vectores. Todas ellas exigen información estadística de país o de región confiable, reciente y accesible.

La OMS ha recomendado procurar obtener estadísticas por medios alternativos a encuestas puntuales o nacionales; por ejemplo, a través de los libros de registro del laboratorio. Cuando se registran los resultados diarios de una manera estandarizada, estos son valiosos como datos estadísticos útiles. Ejemplo de ello fueron los resultados obtenidos de prevalencia de parásitos intestinales de dos laboratorios, uno en Amapala con datos de todo el año (Hondur Ped 2000; 21:7-9) y el otro en el Hospital de Tela durante 7 meses (Rev Med Hondur 2012; 80: 102-106), habiéndose identificado en este último tanto problemas técnicos metodológicos, así como nuevos conocimientos sobre las parasitosis desatendidas en población infantil, desconocidas para esas áreas del país.

La recolección y preservación de las muestras de heces o de sangre de personas en la comunidad dependerá de la especie de parásito o parásitos que se investiguen. El personal que tenga la responsabilidad de preparar dichas actividades debe contar con la información indispensable o consultar a profesionales con experiencia y textos de referencia.

Geohelmintiasis

Las geohelmintiasis o infecciones por nematodos transmitidos por contacto con el suelo son las más ligadas al ambiente y al desarrollo sostenible de las comunidades. La agenda de control de carácter horizontal e interinstitucional debe incluir medidas de salud pública junto al plan de desparasitación para potenciar los resultados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha aprobado y estandarizado el método de Kato, variación Katz (págs. 48-51) para la realización de encuestas y para monitoreo y evaluación periódicos de los resultados de control. Cuando realizado correctamente, el método de Kato, variación Katz es apropiado para las cuatro especies de geohelminthos; alteraciones u omisiones pueden conducir a falsos negativos. Previo a la introducción de nuevos métodos se deberá determinar primero los costos, facilidad de ejecución y reproducibilidad, necesidad de equipo y compra de estuches adicionales y evaluar costo-efectividad entre otros, antes de hacer las recomendaciones de cambios.

Estrongiloidiasis

Estrongiloidiasis aún no figura como parasitosis desatendida, en parte por falta de información estadística confiable sobre su distribución y prevalencia en cualquier país, así como la identificación de individuos con morbilidad causada por infección de *S. stercoralis*. El método de Baermann, (págs. 79-81) y el método de migración en agar o método de Koga, (págs. 82-85), adaptado a trabajo de campo, se han sugerido como una herramienta útil para esta parasitosis. Las microfotografías Nos. 4-6 ofrecen comparaciones morfológicas entre 3 diferentes especies de larvas de nemátodos del humano.

Teniasis/cisticercosis

Debido a las características biológicas peculiares de especies de *Taenia*, los huevos son difíciles de recobrar de las heces de personas infectadas, sintomáticas o asintomáticas. Para conocer datos, se hace uso de publicaciones locales, si las hay; registro de laboratorios, información clínica (el paciente informa pasar proglótidos solos o en las heces), examen de heces por varios métodos (Kato págs. 59-60, Cinta adhesiva transparente, págs. 54-56; Método de formalina acetato de etilo, págs. 68-71); datos sobre cisticercosis humana y animal de la comunidad o región, todas ellas en combinación.

La investigación de antígenos de *Taenia* spp. en heces por medio de estuches aún no está en etapa de comercialización, pero una colaboración de investigación con investigadores en países que los producen podría ser una alternativa inicial. Para comprobar la presencia de cisticercos de *T. solium* en carne de cerdo o en biopsias de pacientes, es necesario ver e identificar al cisticerco como perteneciente a la especie *solium*. La técnica en las págs. 95-96 se describe el método de Berlese, una alternativa cuando no se cuenta con un Departamento de Patología para procesamiento de biopsias.

Enfermedad de Chagas

En las últimas dos décadas se ha contado con importantes logros en el control parasitario y vectorial de la Enfermedad de Chagas en América Latina a través de iniciativas subregionales integradas entre los ministerios de salud, OPS/OMS y múltiples aliados nacionales e internacionales. Estas iniciativas incluyen la del Cono Sur (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay), la de Centroamérica, la Andina (Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela), la Amazonia (Bolivia, Brasil, Perú, Ecuador, Colombia, Venezuela, Guyana, Guayana Francesa, Surinam) y la de México.

Se ha logrado reducción substancial en la transmisión por vectores domiciliados y se ha reducido el riesgo de transmisión por transfusión sanguínea. Por otro lado, los retos actuales que se tienen que afrontar incluyen los siguientes: sostenibilidad, mantenimiento y consolidación de los avances en el control; emergencia en regiones consideradas como libres de la Enfermedad de Chagas; reemergencia en regiones bajo control; diseminación a través de la movilidad de la población dentro y fuera de América Latina; y el acceso a diagnóstico y tratamiento para las personas infectadas.

El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas se realiza por observación microscópica de *Trypanosoma cruzi* en sangre fresca, capa leucocitaria o gota gruesa y extendido finos coloreados, en los casos agudos. El parásito también se puede aislar en medio de cultivo. En los casos crónicos, el diagnóstico se realiza mediante por lo menos dos pruebas serológicas diferentes, incluyendo Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR). Para alcanzar la meta de eliminación de la transmisión y proveer la atención adecuada a los pacientes enfermos y/o infectados, se espera que los países logren fortalecer sus sistemas de vigilancia epidemiológica y sistemas de información, se prevenga la transmisión por transfusión sanguínea y trasplante de órganos, se cuente con pruebas diagnósticas de tamizaje y confirmación; se prevenga la transmisión congénita y se manejen adecuadamente los casos congénitos y no congénitos.

Leishmaniasis

Las herramientas de prevención y control disponibles para las leishmaniasis son limitadas. El diagnóstico temprano de la enfermedad permite instaurar el tratamiento específico oportunamente y así controlar su evolución, aliviar los signos y síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Aquellos con leishmaniasis visceral están expuestos a la muerte y aquellos con leishmaniasis cutánea y mucocutánea están expuestos a desfiguración y a estigma social por las secuelas físicas y psicológicas. La prevención y control requieren una combinación de intervenciones debido a que la transmisión ocurre en un sistema biológico complejo entre los humanos, los vectores, los parásitos y en algunos casos los animales reservorios.

El diagnóstico de las leishmaniasis se fundamenta en la combinación de sospecha clínica con confirmación parasitológica mediante observación microscópica de parásitos en tejidos (frote cutáneo, impronta de biopsia mucocutánea, aspirado medula ósea). En el caso de la leishmaniasis visceral, son útiles las PDR. En la leishmaniasis cutánea y mucocutánea las pruebas serológicas tienen valor limitado. El diagnóstico temprano y manejo efectivo de casos se encuentran entre las acciones principales de prevención y control. Adicionalmente, se encuentran el control vectorial, la vigilancia epidemiológica efectiva, el control de los hospederos reservorios y el fortalecimiento de alianzas y la movilización social, con especial énfasis en la educación de la comunidad con intervenciones para cambio efectivo de conducta de riesgo. Es necesario desarrollar lineamientos, estrategias y estándares basados en evidencia, para la prevención, control, diagnóstico y tratamiento de las leishmaniasis, así como el monitoreo para su implementación.

II. MICROSCOPIO Y MICROSCOPIA

- 2.1 PARTES DEL MICROSCOPIO**
- 2.2 ENFOQUE INTERPUPILAR Y OCULAR**
- 2.3 ILUMINACIÓN KOEHLER**
- 2.4 CALIBRACIÓN Y MEDICIÓN**
- 2.5 CUIDADOS DEL MICROSCOPIO**

2.1 Partes del microscopio

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 ejecutar un enfoque adecuado.

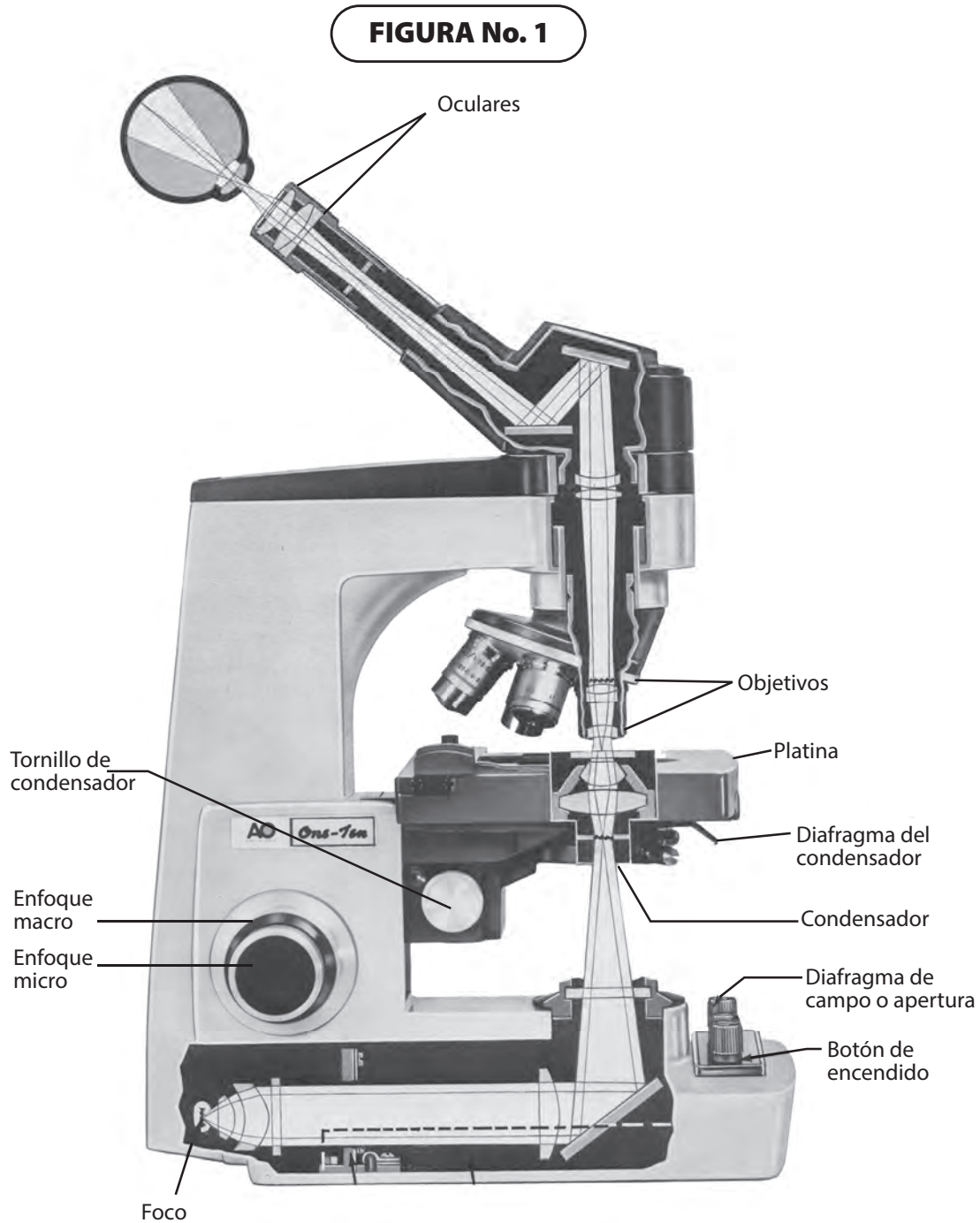


Figura No. 1. Esquema de un microscopio óptico y las partes más importantes.

(Tomado de: Reference Manual, Serie One-Ten Microstar, AO Scientific Instruments, Division of Warner-Lambert Technologies, Inc, Buffalo, New York, USA)

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.

2.2 Enfoque interpupilar y ocular

A. Interpupilar

El espacio entre los ojos es variable para cada persona. Necesita ajustar los oculares a su distancia interpupilar, para ver por los dos 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.

A. 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 macrométrica o la micrométrica.

Cuando logre esto, coloque la tarjeta cubriendo el ojo derecho. Al hacer esto, ya no toque ni el macro ni el micro enfoque. 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.

2.3 Iluminación Koehler (Figura No. 2)

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

- a)** Encienda su microscopio. Abra a su máxima apertura el diafragma de apertura y el del condensador.
- b)** Coloque una preparación en la platina o deje la que ya tenía. Ajuste la luz a una intensidad confortable y enfoque.
- c)** Viendo por los oculares, disminuya la abertura del diafragma de apertura hasta una pequeña luz. Si esta luz se ve a los lados, arriba o abajo, como lo muestra la Figura No. 2A, quiere decir que el condensador no está centrado. Usando ambos tornillos del condensador, deses vuelta despacio y alternativamente, hasta colocar la luz en

el centro del campo como se observa en la Figura No. 2B.

- d) Abra ahora despacio el diafragma de apertura hasta que apenas desaparezca del campo visual.
- e) Para ajustar el diafragma del condensador y obtener una imagen con buen contraste, cierre apenas el diafragma del condensador observando su preparación que no tenga difracción y que todos los elementos muestren contraste. Ya puede trabajar con su microscopio, alineado y debidamente iluminado.

FIGURA No. 2

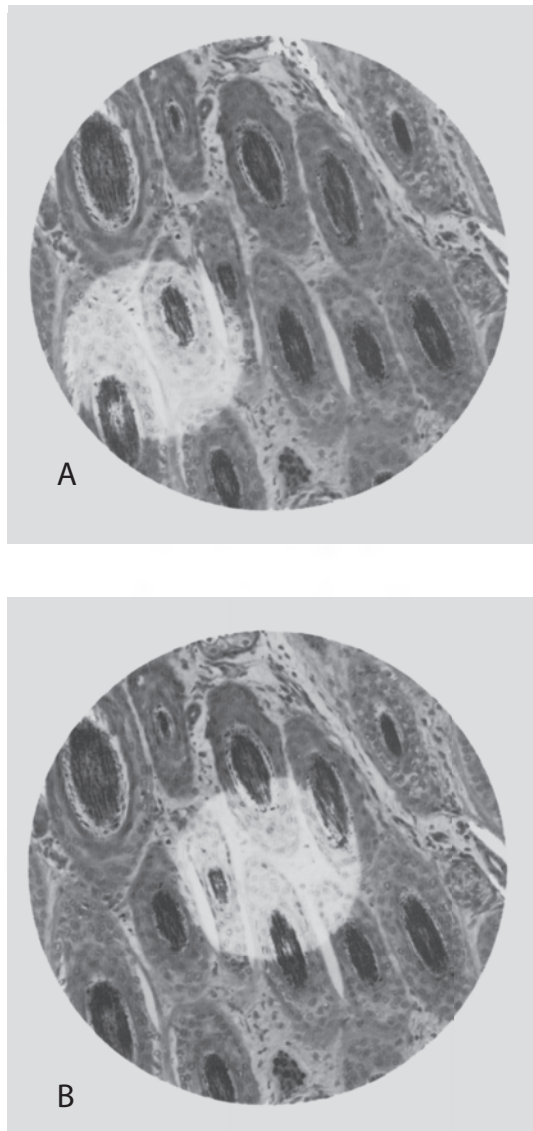


Figura No. 2 A, B. A: condensador fuera de centro. **B=** condensador centrado.
(Tomado de: Smith R. Microscopy and Photomicrography, pg. 14. Appleton-Century-Crofts / New York 1982).

2.4 Calibración y Medición (Figura No. 3).

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.

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 micrometrado 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

- a) 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.
- b) 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.
- c) Enfoque el micrómetro para ver claramente las líneas grabadas y que pueda distinguir las divisiones de 0.1 y de 0.01 mm.
- d) La línea 0 del ocular micrometrado debe coincidir con el 0 del porta-objetos milimetrado.

- e) Cuando estas dos líneas se corresponden, sin mover la platina, mire hacia la derecha de los ceros y determine cuándo puede ver de nuevo líneas que se corresponden 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 correspondan las líneas podrá hacerlo ya sea hacia la izquierda o hacia la derecha de las líneas individuales.
- f) Cuente el número de divisiones en el ocular que hay entre el 0 y las nuevas líneas sobreimpuestas. Entonces, en el porta-objetos grabado, cuente el número de divisiones de 0.1 mm que hay entre el 0 y las nuevas líneas sobreimpuestas a la derecha.
- g) Calcule la porción de un milímetro que se mide con una unidad ocular, según lo ilustrado en el siguiente ejemplo:

$$\begin{aligned}
 33 \text{ unidades del ocular} &= 0.22 \text{ mm} \\
 1 \text{ unidad del ocular} &= \frac{0.22 \text{ mm}}{33} = 0.0066 \text{ mm} \\
 &= 0.0066 \text{ mm} \times \frac{1,000 \mu\text{m}}{1 \text{ mm}} \\
 1 \text{ unidad del ocular} &= 6.6 \mu\text{m} \text{ (para ese objetivo determinado)}
 \end{aligned}$$

Cada objetivo del microscopio debe ser calibrado separadamente.

- h) 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

FIGURA No. 3

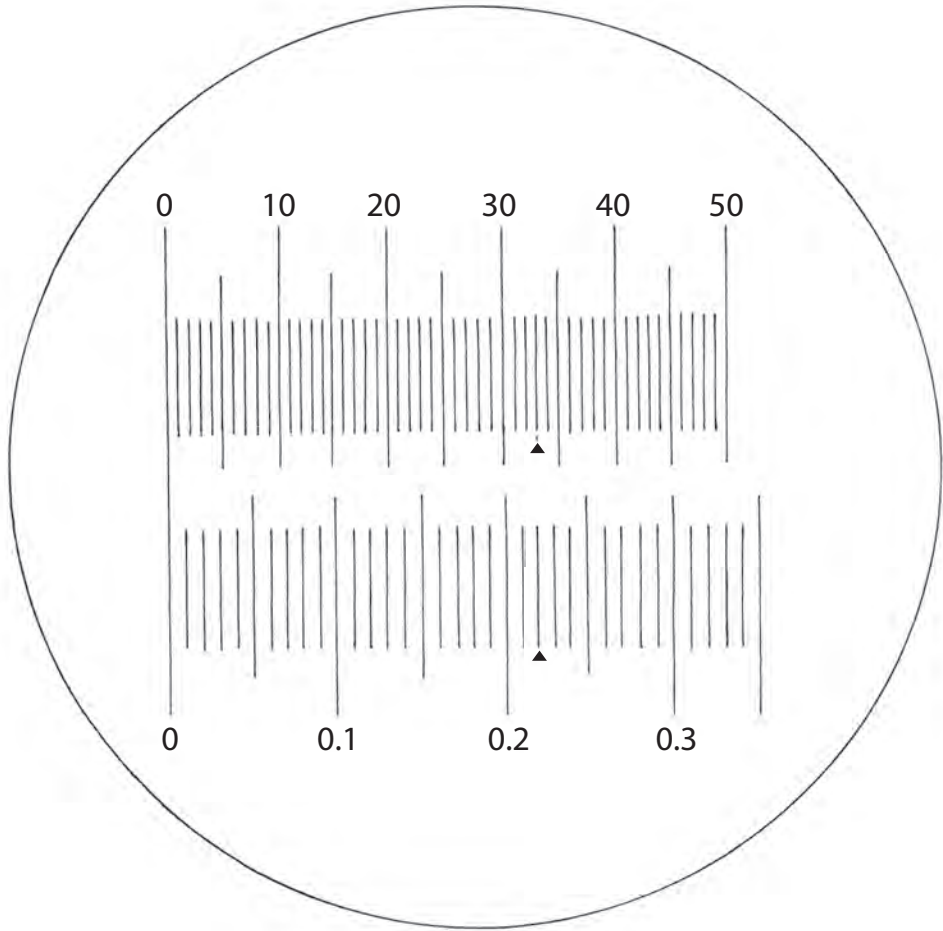


Figura No. 3. Escala para calibración de microscopio. Las dos líneas señaladas por las cabezas de flecha muestran las líneas coincidentes. (Tomado de: Ash L and Orihel T. Parasites: a guide laboratory procedures and identification. ASCP Press, American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 1987).

2.5 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.
3. No toque el instrumento con manos sucias o grasosas.
4. 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.
5. No permita que líquidos, ácidos o aceites ensucien el microscopio.
6. Nunca utilice lentes de mayor aumento sin cubrir la preparación con un cubre objetos.
7. Nunca deje el objetivo de inmersión lleno de aceite. Use papel de lente, con movimientos suaves y circulares para limpiarlo luego de usarlo.
8. 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.
9. 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.

Referencia

El inciso sobre calibración fue traducido literalmente de:

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

III. PARÁSITOS INTESTINALES LUMINALES Y TISULARES

EXAMEN DE HECES FRESCAS Y FIJADAS

3.1 EXAMEN DIRECTO EN SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA
Y EN SOLUCIÓN DE LUGOL

3.2 ESTIMACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA DE
GEOHELMINTOS, TRES MÉTODOS

BÚSQUEDA DE HUEVOS DE *ENTEROBIUS VERMICULARIS*
Y DE *TAENIA* SPP.

3.1 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 protozoos y helmintos (larvas, huevos) y elementos que aparecen en situaciones anormales, tales como leucocitos, eritrocitos, cristales de Charcot-Leyden.

Es el mejor método para detectar trofozoítos en una amebiasis invasora por *Entamoeba histolytica* en heces o en otros productos humanos. Sirve para ejecutar cuenta de huevos de algunos helmintos y así estimar la intensidad de la infección.

- b) **En solución de Lugol:** Colorear en forma temporal trofozoítos y quistes de protozoos. Inmovilizar y colorear estructuras internas de larvas e identificar por morfología específica.

Recolección de la muestra de heces

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. Ver página 19 para mayores detalles.

Al examinar una muestra diarreica o líquida

Si la muestra es líquida (como agua) en vez de aplicador de madera puede tomarse una pequeña porción aspirando con una pipeta Pasteur del fondo del frasco. O centrifugar y examinar el sedimento (*Algoritmo No. 5, pág. 177*).

Si la muestra contiene moco, hacer otra preparación tomando muestra del moco, ya que aquí podrían encontrarse los elementos patógenos en mayor cantidad: trofozoítos o quistes de *Giardia lamblia*, ooquistes de apicomplexa intestinales, larvas de *Strongyloides stercoralis*. Cuando la muestra contiene moco con sangre además de heces, tomar también de este moco para hacer otra preparación buscando trofozoítos de *Entamoeba histolytica* hematófaga en caso de disentería amebiana; trofozoítos de *Balantidium coli* o huevos de *Trichuris trichiura* atrapados en el moco en casos de disentería crónica por tricuriasis (*Algoritmo No. 5 pág. 177*).

Preparación de reactivos

- a) **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.

b) Solución de Lugol. Solución madre

- | | |
|---------------------|---------|
| - Iodo en cristales | 2.5 g |
| - Ioduro de potasio | 5.0 g |
| - Agua destilada | 50.0 mL |

Mezclar en un matraz hasta disolución completa de los cristales. Guardar en frasco oscuro rotulado «Solución madre de Lugol». Para utilizar, diluir 0.5 mL de esta solución madre 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, No. 1 ó No. 2
- Aplicadores de madera
- Solución salina fisiológica (0.85% cloruro de sodio)
- Solución de Lugol de trabajo
- Frasco con desinfectante para descartar material (clorox, fenol, Lugol)

Procedimiento

- a)** Identificar el porta-objetos con la muestra a examinar.
- b)** Colocar 1-2 gotas de solución salina en un extremo del porta-objetos y 1-2 gotas solución de Lugol en el otro extremo.
- c)** 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.
- d)** Cubrir cada preparación con un cubre-objetos.
- e)** Observar, primero con el objetivo de 10X, en forma sistemática toda la preparación en solución salina. Para confirmar estructuras, usar objetivo 40 X cada vez que sea necesario. Anotar hallazgos.
- f)** Proceder de igual manera con la preparación en solución de Lugol, buscando quistes de protozoos para su identificación con magnificación de 10 X y 40 X. Cuando los localice deberá confirmar morfología con objetivo 100 X. Para ello colocar una gota pequeña de aceite de inmersión sobre el cubre-objetos y observar con el objetivo 100 X correspondiente. Debe tener práctica para esta modalidad, pero es la única opción para identificar la morfología específica.
- g)** Si se encuentran huevos de nematodos transmitidos por contacto con el suelo, ejecutar una cuenta de huevos de cada especie por separado en el caso de infección con dos o más parásitos: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* o uncinarias del humano, e informar el número de cada especie por separado agregando que la cuenta es en 2 mg de heces. Ejemplo: 72 h/2 mg de *Ascaris lumbricoides*, 48 h/2 mg de *Trichuris trichiura*.

- h)** Informar otras estructuras, cuando estén presentes, ya que indican alguna patología: leucocitos, eritrocitos, macrófagos, cristales de Charcot-Leyden. Para diferenciar leucocitos puede utilizar solución azul de metileno alcalino. Para eosinófilos usar solución acuosa de eosina en vez de solución salina.

Comentarios sobre algunos hallazgos.

Las larvas requieren diferenciación específica: *Strongyloides stercoralis*: primordio genital grande, cápsula bucal corta (microfotografía No. 5).

Los huevos de *Paragonimus* spp. (tremátodos) en infección pulmonar son operculados y no embrionados al encontrarlos en las heces, esputo y aspirado pleural, miden 80-120 μm x 45-70 μm (microfotografía No.10).

Huevos de *Fasciola hepática* son también operculados (tremátodo), y no están embrionados al salir en las heces. En infección espuria (por ingestión de hígado cocido o crudo infectado con *F. hepática*) los huevos desaparecen de las heces en pocos días (microfotografía No. 9).

Huevos de *Schistosoma mansoni* miden 114-175 μm x 45-70 μm y tienen una espina grande lateral cerca de un extremo. Es el único género de trematodo que no tiene huevos operculados (microfotografía No.7).

Ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* son redondos, refringentes, con una masa interna bien organizada, miden entre 8 y 10 μm (microfotografía No. 16).

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 (microfotografías No. 13 y 14).

Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. miden 4-6 μm , redondos, con un gránulo brillante u oscuro en un borde, visibles bajo objetivo 100X, pero no fácilmente identificables. Es necesario colorearlos por ácido-resistente modificado y diferenciarlos de otras estructuras (microfotografía No. 15).

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
- No colorear un extendido fino por un método apropiado (ácido resistente modificado) para confirmar ooquistes de apicomplexa intestinales

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. Cambiar cada vez que la solución esté muy pálida.
- Asegurarse de tener la batería para coloración de ooquistes de apicomplexa intestinales y preparaciones control.

Referencias

1. Proctor E. Laboratory diagnosis of amebiasis. In: Clinics in Laboratory Medicine, 1991; 11(4). Yezid Gutiérrez and Maurice D. Little, Guest Editors W.B. Saunders Co. Philadelphia.
2. 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*. J Clin Pathol 1994; 47:236-239.

3.2 Estimado de la carga parasitaria de geohelmintos, tres métodos

Cuenta de huevos

Propósito

Estimar la intensidad de una infección intestinal por *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y uncinarias del humano en forma práctica, en una cantidad conocida de heces. El resultado de la cuenta en algunas situaciones ayuda al clínico a determinar la causa de morbilidad. 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 clínico, para encuestas, evaluar terapéutica, etc.

Métodos

Los más utilizados son tres:

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 directa de gusanos adultos expulsados después de tratamiento, el cual es más preciso si el tratamiento es efectivo y si se cumplen las instrucciones.

Interpretación 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 uncinarias, presencia de otros parásitos, fibra, grasas, moco; proficiencia técnica del examinador, interés. Los datos en el cuadro abajo indican huevos por mg de heces y por gramo de heces. (Tomado de: *Manual de Manejo de Enfermedades Parasitarias Prioritarias en Honduras, 2ª. Ed, IAV/OPS 2009*)

Cuadro No. 1. Cuenta de huevos y su interpretación por miligramo y gramo de heces

Cuenta de huevos			
Parásito	2 mg (Directo)	1 g (Kato-Katz)	Interpretación
A. lumbricoides	1 - 49	1 - 4,900	Leve
	50 - 99	5,000 - 49,999	Moderada
	≥ 100	≥ 50,000	Severa
T. trichiura	1 - 9	1 - 999	Leve
	10 - 49	1,000 - 9,999	Moderada
	≥ 50	≥ 10,000	Severa
Uncinarias	1 - 4	1 - 1,999	Leve
	5 - 20	2,000 - 3,999	Moderada
	≥ 21	≥ 4,000	Severa

mg= miligramo, g= gramo

1. Método directo en 2 mg de heces (Método de Beaver)

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.

Nota: *es un método similar al descrito en la página 41 con algunas variaciones.*

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 4.25 g
- Agua destilada 500 mL

Mezclar hasta disolución completa de los cristales. Guardar en frasco rotulado. Para uso diario transferir una porción a un 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 5 cm)
- Cubre-objetos de 22 X 22 mm, No. 1 ó No. 2
- Aplicadores de madera
- Solución salina fisiológica (0.85%)
- Marcador
- Contador manual
- Frasco con solución desinfectante para descartar material

Procedimiento

- a) Identificar el porta-objetos con la muestra de heces a examinar.
- b) Colocar 1 - 2 gotas de solución salina en cada extremo del porta-objetos.
- c) Con un aplicador, tomar una porción de heces y emulsificar en cada una de las gotas de solución salina.
- d) Cubrir cada preparación con un cubre-objetos.
- e) Contar en forma individual los huevos según la especie: de *Ascaris*, *Trichuris* y/o uncinarias del humano presentes en cada preparación. Sumar los resultados de ambas lecturas por especie, dividir entre dos y el resultado final será el número de huevos en dos miligramos de heces.
- f) Informar por especie de parásito: No. de huevos/frote de heces o bien No. de huevos/ 2 mg de heces.
- g) 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

Nota: En Honduras existen focos no confirmados de *Ancylostoma duodenale*, el cual en ocasiones puede causar sangrado digestivo alto en el recién nacido entre 35 días y 4 meses de edad. Tanto la madre como el recién nacido expulsan huevos de *A. duodenale* en las heces.

Referencias

1. Beaver PC. Quantitative hookworm diagnosis by direct smear. J Parasitol 1949; 35:125-135.
2. Beaver PC. The standarization of fecal smears for estimating egg production and worm burden. J Parasitol 1950; 36:451-456.

2. Método de Kato (variación Katz), en 41.7mg de heces

Principio

Aclarar con glicerina un frote grueso de heces no diluidas. El método de Kato, 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* varía; 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* spp. 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

Compra de un estuche con los materiales listos. El método en sí tiene varias limitantes: sólo puede utilizar heces frescas; no es adecuado 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; al inicio se agregaba para disminuir la luminosidad de la preparación).

* 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 hidrófilo que miden 25 X 30 mm. Preparar con anterioridad colocando durante 24 horas o más en la solución de glicerina
- Espátulas plásticas si utiliza las del estuche; de madera o las usadas para paletas o helados si debe sustituir (Figura 4b)
- Templete de plástico del tamaño seleccionado, en este caso de 6 mm de diámetro X 1.5 mm de grosor (reusable, lavado y desinfectado) (Fig. 4b)
- Cuadrados de 4 cm por lado de tela metálica o nylon de trama 105 (reusables, lavados y desinfectados)
- Papel absorbente que puede ser 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 o lápiz graso
- Baja-lenguas o de paleta o de helados
- Contador manual

Procedimiento

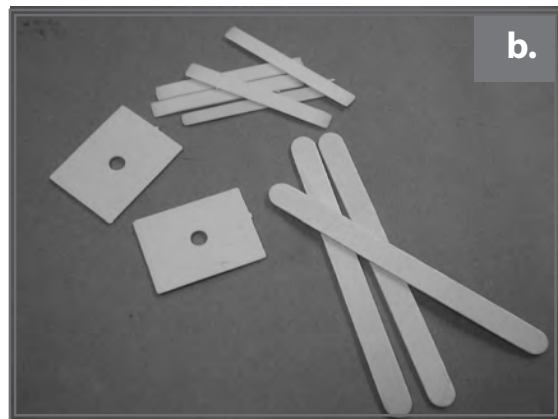
- a)** Extender el papel periódico, manila o de estraza sobre la mesa de trabajo.
- b)** Identificar el porta-objetos con la muestra a examinar. Colocar sobre éste el templete de plástico.
- c)** Con la espátula o paleta de madera tomar una cantidad de heces y colocarla sobre una superficie plana (tapadera plana del frasco, papel periódico).
- d)** Colocar sobre estas heces el cuadrado de tela metálica, plástico o nylon con trama de tamaño determinado (105 en este caso) que hace las veces de colador (Figura 4c).
- e)** Raspar la superficie de la tela con la espátula tomando suficientes heces coladas para llenar el agujero del templete. Descartar la espátula si es de madera.
- f)** Remover el templete, descartar éste y la tela metálica o nylon en desinfectante y cubrir el redondel de heces con un cuadrado de celofán empapado en glicerina (Figura 4d).
- g)** 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 de celofán.
- h)** 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, invertir la lámina sobre una superficie plana lo necesario hasta continuar el proceso.

Cont.

Cont.

- i) Para huevos de uncinarias, se recomienda examinar la preparación apenas aclare un poco (5-15 min según temperatura y humedad) antes que se vuelvan invisibles
- j) Observar al microscopio óptico con objetivo de 10X. Contar sistemáticamente y en forma individual todos los huevos de *Ascaris*, *Trichuris*, o uncinarias en toda la preparación (microfotografía No. 1)
- k) Multiplicar el resultado por 24 e informar «No. de huevos/gramo de heces». Descartar material usado en desinfectante
- l) Los huevos de *Taenia* se confirmarán si se observan los ganchos de la oncosfera con objetivo 40X (microfotografía No. 2).

FIGURA No. 4



Referencias

- 1.** Katz N, Chaves A and Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med trop Sao Paulo* 1972; 14:397-400.
- 2.** Martin LK, Beaver PC. Evaluation of Kato thick-smear technique for quantitative diagnosis of helminth infections. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 17:382-391.
- 3.** Montresor A, Crompton DWT, Hall A, Bundy DAP, and Savioli L. Guidelines for the evaluation of soil transmitted 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.

Procedimientos

- a) Informar al paciente y al personal (de hospital si es clínico; al voluntario si es de encuestas) para que colecte heces de 24 horas y las entregue diariamente al laboratorio durante 4-5 días después de iniciado el tratamiento. La forma de hacerlo dependerá de los recursos e ingenio de cada investigador. Las heces se pueden recoger en bolsas plásticas rotuladas con nombre del paciente y fecha.
- b) Lavar diariamente y por separado las heces de 24 horas recogidas en bolsas plásticas 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 del humano:

Contarlos y separarlos por sexo si se desea y fijarlos. Para recoger gusanos adultos de uncinarias del humano usar un pincel suave. Para recoger gusanos adultos de *T. trichiura* usar un alfiler entomológico colocado en aplicador de madera.

En heces disintéricas post tratamiento por infección de *T. trichiura* es necesario disolver el moco primero, de otra manera es muy laborioso y cansado liberar los gusanos adultos. Puede usar NaOH al 2% de forma rápida para no dañar los gusanos. N-acetil-cisteína, 0.25 g en 25 mL de citrato de sodio al 2.0% es otra opción. Esta sustancia es más costosa y puede que no la tenga en su laboratorio. Cuando utilice NaOH, hágalo por pequeñas porciones, mezclando las heces y el NaOH en un recipiente pequeño de acero inoxidable. Luego vierta pequeñas cantidades de este moco disuelto en una bandeja de acero inoxidable,

busque los gusanos sueltos y transfíeralos con el alfiler entomológico a una caja de Petri con solución salina fisiológica.

Beaver y col. 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 como durante encuestas, los datos iniciales del estimado de la intensidad de la infección por cuenta de huevos más la cuenta de gusanos adultos recobrados después del tratamiento 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 infectada.

Referencias

1. Beaver PC, Jung RC, and Cupp E. Clinical Parasitology. 9th edition, Lea and Febiger, 1985.
2. Kaminsky R. Morfología comparada entre *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* de casos hondureños. Ciencia y Tecnología 1999; 5:38-44.

Búsqueda de huevos de *Enterobius vermicularis* y de *Taenia* spp.

Método de la cinta transparente adhesiva

Principio

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.

Propósito

Recobrar huevos de *E. vermicularis* o de *Taenia* spp. de la región anal y perianal de individuos infectados. Para diagnosticar infecciones por *E. vermicularis*, la cinta transparente adhesiva es el método indicado; para identificar individuos infectados con *Taenia* spp. este método, en combinación con otros métodos, los datos epidemiológicos y la observación clínica, aumenta la probabilidad de diagnóstico (Figura No. 5, pág. 56).

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 defecue, 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 de E. vermicularis al separar los glúteos o sobre las heces al defecar. Si esto sucede, deberán llevarlos 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. De igual manera, los proglótidos o segmentos de Taenia spp. se llevan al laboratorio para identificación, sin fijar, en un frasco cerrado. Pueden guardarse en refrigeración hasta la entrega al laboratorio que no debe demorar más de 48 horas.*

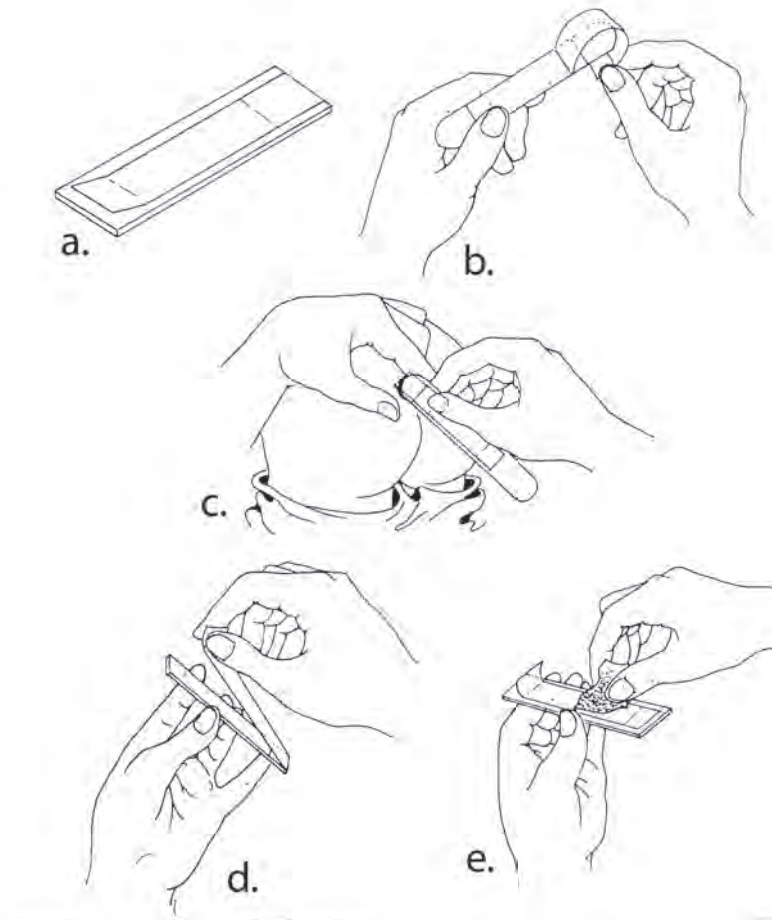
Materiales

- Porta-objetos de 7.5 X 2.5 cm
- Baja-lenguas o espátula 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

- a)** 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 5a).
- b)** Al momento de tomar la muestra, levantar la cinta suavemente del porta-objetos, tomándola por la parte etiquetada.
- c)** Colocar el porta-objetos sobre un baja-lenguas o espátula de paleta y doblar la cinta sobre un extremo de éste, con la parte adhesiva hacia fuera (Figura 5b).
- d)** 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 5c).
- e)** Volver a colocar la cinta sobre el porta-objetos y descartar el baja-lenguas (Figura 5d).
- f)** La muestra puede transportarse o guardarse protegida, hasta el momento del examen.
- g)** Para examinar, desprender la cinta transparente hasta la parte expuesta, agregar 1-2 gotas de xilol a la lámina y colocar de nuevo la cinta en su lugar, aplanando con un pedazo de gasa (Figura 5e). El xilol (puede ser tolueno) aclara la preparación, elimina las burbujas de aire y hace más visibles los huevos. Examinar inmediatamente al microscopio.

FIGURA No. 5



Características morfológicas de los huevos de *Taenia* spp. y de *Enterobius vermicularis*

Los huevos de *Taenia* se reconocen por su forma redonda, de igual tamaño (31 a 43 μm), con la cáscara color café o como objetos redondos u ovalados uniformes, oscuros; se deberá buscar ejemplares en donde se puedan visualizar los ganchos de la oncósfera. Utilizar mayor aumento para ver estos detalles diagnósticos (microfotografías Nos. 2 y 12).

Los huevos de *E. 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

1. Beaver PC. Methods for pinworm diagnosis. Am J Trop Med Hyg 1949; 29:577-587.
2. Kaminsky RG. Taeniasis-cysticercosis in Honduras. Trans R Soc Trop Med Hyg 1991; 85:531-5.

III. PARÁSITOS INTESTINALES LUMINALES Y TISULARES

MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN

- 4.1** FROTE GRUESO DE HECES O KATO
- 4.2** FLOTACIÓN POR SULFATO DE ZINC
- 4.3** FLOTACIÓN POR SHEATHER
- 4.4** SEDIMENTACIÓN FORMALINA ACETATO DE ETILO

4.1 Frote grueso de heces o Kato

Principio

Aclarar con glicerina un frote grueso de heces no diluidas. El método de Kato, originalmente introducido por japoneses para hacer encuestas epidemiológicas de schistosomiasis, ha sido mejorado y modificado varias veces. Beaver lo consideró uno de los avances técnicos para el examen de heces más importantes en el siglo pasado. En el Servicio de Parasitología del Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras, se utiliza como método de concentración para buscar huevos de *Taenia* spp. y otros huevos de helmintos.

Ventajas

Las heces no se diluyen, se utiliza materiales baratos y accesibles, el aprendizaje para personal no familiarizado con el método requiere apenas unas demostraciones y un poco de práctica en 2-3 horas, puede transportarse una vez preparado en el campo utilizando un mínimo de espacio y prácticamente sin mal olor, puede guardarse varios meses para verificar resultados de los huevos de cáscara resistente.

Desventajas

Este método no es cuantitativo ya que la cantidad de heces que se examina no se conoce, por lo tanto no se usa para cuenta de huevos. Es un método de concentración para huevos de helmintos en general. Entre las limitantes: sólo puede utilizar heces frescas; no es adecuado para heces diarreicas, líquidas o mucoides; no se aplica para la detección de protozoos ni larvas de nemátodos; huevos frágiles como los de uncinarias del humano y a menudo de *Hymenolepis nana* se vuelven irreconocibles en pocas horas, lo que exige estar atento al aclaramiento o examinar a los 5 minutos después de preparado el frote, o considerar métodos alternativos sobre todo para huevos de uncinarias. No es indicado para heces que contengan mucha fibra (ej. mango, naranja), restos gruesos de comida o grasa.

Preparación de solución de glicerina y agua

- Glicerina pura 100mL
- Agua destilada 100mL
- Verde de malaquita al 3% (sol. acuosa, opcional) 1mL

Mezclar todo 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 y ni siquiera necesario en caso que no se cuente con él. La razón para haberlo introducido fue para disminuir el exceso de luminosidad de la preparación).

Nota: En el Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, agregamos unos pocos cristales (o 1 mL) de fenol para evitar la fermentación y crecimiento de bacterias, ya que se mantiene listo durante varios meses en caso de solicitud para buscar huevos de *Taenia spp.* u otros de helmintos

Materiales

- Cuadrados de celofán hidrófilo que miden 25 X 30 mm. Preparar con anterioridad colocando durante 24 horas o más en la solución de glicerina
- Papel absorbente que puede ser 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 o lápiz graso
- Baja-lenguas o de paleta o de helados
- Contador manual

Procedimiento

- a) Extender el papel periódico o de estraza sobre la mesa de trabajo.
- b) Identificar el porta-objetos con la muestra a examinar.
- c) Tomar con la paleta de madera o simplemente con aplicadores una cantidad de heces como un grano de maíz.
- d) Cubrir con un cuadrado de celofán empapado en glicerina (Figura No. 4d)
- e) 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 de celofán.
- f) 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. El método original sugiere de 30 a 60 minutos. Si se desea interrumpir el aclaramiento, invertir la lámina sobre una superficie plana lo necesario hasta continuar el proceso.
- g) Para huevos de uncinarias del humano, se recomienda examinar la preparación apenas aclare un poco (5-15 min según temperatura y humedad del laboratorio) antes que se vuelvan invisibles.
- h) Los huevos de *Taenia* se confirmarán observando los ganchos de la oncosfera con objetivo 40X.
- i) Para huevos de *Schistosoma mansoni* esperar 24 horas antes de examinar (microfotografía No. 8). Observar al microscopio óptico con objetivo de 10X, usando 40X para confirmar estructuras.

Referencia

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

4.2 Flotación por sulfato de zinc (SO₄Zn)

Propósito

Concentrar huevos de ciertos helmintos y quistes de protozoos cuando las infecciones son muy leves y no se detectan en preparaciones directas. Puede utilizarse heces frescas o heces fijadas; deberá variar la densidad del sulfato de zinc según el tipo de muestra.

Muestra para laboratorio

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

Preparación de soluciones

- *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 muy 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 ya fue fijada, usar una solución con densidad 1.20.*

Ejercer precaución al manejar el hidrómetro para no quebrar. FRÁGIL

Materiales

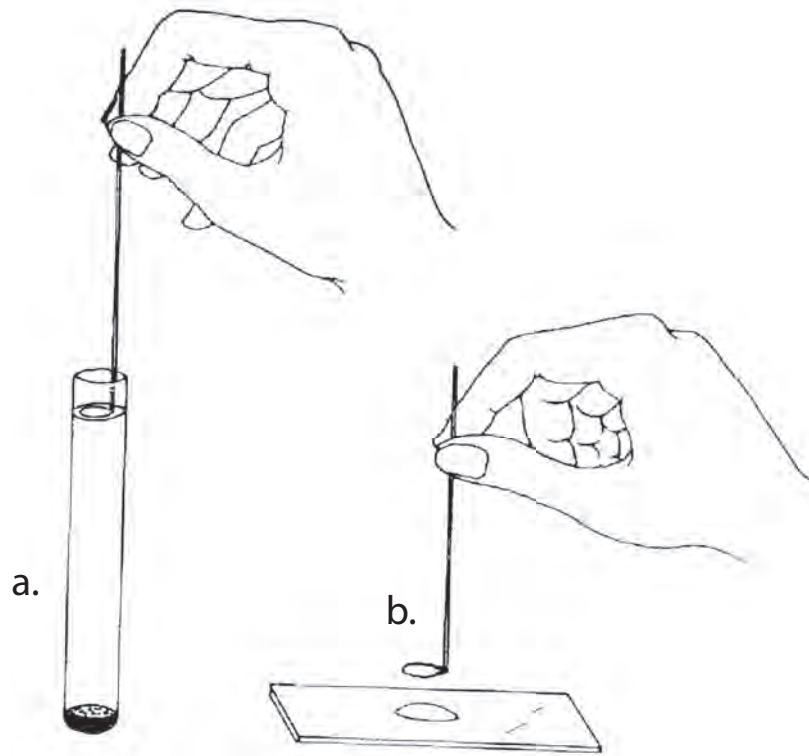
- Hidrómetro (Curtis Matheson Scientific Inc) para medir gravedad específica, rango 1,000-2,000
- Solución de sulfato de zinc, densidad 1.18 para heces frescas, 1.20 para heces fijadas en formalina 10%
- Cuadrados de gasa de 16 X 16 cm, en 2 dobleces
- Embudos de 5 cm de diámetro
- Aplicadores
- Tubos 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)
- Cobre-objetos 22 X 22 mm, No. 1 ó No. 2
- Solución de Lugol
- Asa bacteriológica de 5-7 mm de diámetro doblada en L
- Gradilla para tubos
- Solución salina fisiológica

Procedimiento

- a)** Identificar la muestra con el vaso y el tubo de ensayo a trabajar.
- b)** 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 de ensayo
- c)** Filtrar a través de gasa humedecida a otro tubo de ensayo. Centrifugar a 1,500-2,000 rpm por 2 minutos. Descartar el sobrenadante.
- d)** 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.
- e)** Centrifugar a 2,000 por 2 minutos. Los tubos deben tener posición vertical en la centrífuga, no inclinada.
- f)** Sin sacar el tubo de la centrífuga, remover varias asadas de la película superficial (Figura No. 6 a y b) y colocarlas sobre un porta-objetos, cubrir con un cubre-objetos. Esterilizar el asa por flameo.
- g)** Examinar sistemáticamente la preparación. Para colorear los quistes, remover con cuidado el cubre-objetos y añadir una gota pequeña de solución de Lugol, volver a cubrir o dejar que el Lugol penetre por capilaridad debajo del cubre-objetos. Para identificar los quistes se procede a examinarlos con el objetivo 100X, 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.

FIGURA No. 6



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

Causas de error o resultados poco satisfactorios

- 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. En ocasiones no puede observarse la morfología de los quistes coloreados con solución de Lugol
- A veces no flotan los huevos infértiles de *Ascaris*
- No es el método adecuado para huevos de céstodos ni de tremátodos
- Las larvas en heces frescas se encogen y no se puede reconocer su morfología específica.

Referencia

Bartlett M, Harper K, Smith N, Verbanac P and Smith S. Comparative evaluation of a modified zinc sulfate flotation technique. J Clin Microbiol 1978; 7:524-528.

4.3 Flotación por Sheather

Propósito

Método efectivo y barato utilizado para separar, concentrar y recobrar ooquistes de *Isoospora belli* y de *Cryptosporidium* spp. de las heces para facilitar el diagnóstico de isosporiasis o de criptosporidiasis en el laboratorio. Ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* pueden también concentrarse; sin embargo, para asegurar el diagnóstico de esta especie es preferible además, procesar la muestra por otros métodos (medición de ooquistes, esporulación en el laboratorio, separación de esporozoítos, microscopio fluorescente). Algoritmo No. 5 Pág. 177 diagrama los pasos al examinar heces diarreicas y líquidas.

Importancia del diagnóstico

El hallazgo de ooquistes de *Isoospora belli* ha cobrado importancia desde 1983 en que se recobró el organismo 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 inmunodeficientes y Sida. El hallazgo de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en niños menores de 5 años en un niño desnutrido o con otra enfermedad de base debe ser interpretado por el clínico y el resultado es de entrega inmediata.

El hallazgo de *Isoospora belli* requiere informe inmediato al médico. El Servicio de Parasitología del Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras, acostumbra agregar una nota diciendo: "Investigar causa de posible inmunocompromiso". De igual manera se procede con un hallazgo de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en personas mayores de 5 años. En casos de niños menores, también la madre podría estar infectada o vivir con Sida; el médico deberá conocer los signos de alarma o verificar si es caso conocido.

Nota: No se puede enfatizar suficiente la importancia que estas infecciones por apicomplexa intestinales representan para el paciente en general. Los datos conocidos documentados en Honduras desde 1986 y hasta la fecha (2013) son solamente del Servicio de Parasitología del Departamento de Laboratorios Clínicos del Hospital Escuela Universitario. Su búsqueda e informe se realiza de manera regular y constante. Conglomerado de resultados se han presentado a la comunidad general y científica en congresos y publicaciones en revistas científicas. La omisión injustificada de este examen conlleva un resultado falso para el clínico, con un daño al paciente, ya que el no informarlos demora el manejo correcto, o una asesoría necesaria o se realizan otras intervenciones innecesarias y costosas. Por otra parte, la OMS ha declarado (2004) al parásito *Cryptosporidium* spp. y a la infección que produce como una Parasitosis Desatendida de la Infancia.

Muestra para enviar al laboratorio

Heces frescas recolectadas en frasco (vidrio, plástico, cartón) de boca ancha, con tapadera, limpio y debidamente identificado. Puede ser un aspirado duodenal.

Preparación de soluciones**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.

Nota: *Los vapores del fenol son irritantes y tóxicos. Trabajar bajo campana.*

Materiales

- Vasitos de plástico para preparar suspensión de heces
- 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

- a) Identificar los tubos de ensayo con la muestra a examinar.
- b) 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.
- c) 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.
- d) Equilibrar el tubo en balanza de dos platos.
- e) Centrifugar a 1,500 rpm por 2 minutos. Destapar. Decantar el sobrenadante.
- f) Añadir un poco de solución fenolada azucarada al sedimento y agitar vigorosamente con un aplicador.
- g) Completar con más solución hasta 2 cm bajo el borde del tubo sin dejar de agitar. Tapar con parafilm o tapón de hule.
- h) Equilibrar el tubo en balanza de dos platos.
- i) Centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos.
- j) Remover el tapón con sumo cuidado para no agitar. Tomar 2-3 asadas de la superficie del menisco y colocar sobre un porta-objetos (similar al procedimiento para flotación por sulfato de zinc, Figura No. 6).
- k) Flamear el asa en el mechero.
- l) Cubrir la preparación con un cubre-objetos y examinar en el microscopio óptico toda la preparación.

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, a partir de f) (Algoritmo No. 5, pág. 177).

Heces con moco:

- a) Tomar una porción del moco y examinar al microscopio como frote directo; o bien
- b) utilizar un mucolítico (10 gotas de KOH al 10% o una preparación enzimática comercial) para disolver el moco y liberar ooquistes que estuvieran atrapados. Dejar actuar el mucolítico a temperatura ambiente durante 5-15 minutos, agitando con un aplicador (Algoritmo No. 5, pág. 177).
- c) Una vez disuelto, agregar agua destilada, mezclar, centrifugar, decantar y continuar la técnica utilizando el sedimento, a partir de f).

- Buscar los ooquistes con objetivo 10X a diferentes profundidades; a menudo flotan y se colocan justo debajo del cubre-objetos. Debe reconocer los ooquistes de las diferentes especies intestinales por morfología específica.
- Para confirmar un objeto como ooquiste, utilizar mayor magnificación. En el caso de infección por *Cryptosporidium*, buscar los ooquistes con objetivo de inmersión. Deberá asegurarse de la identificación continuando con una coloración ácido resistente modificada (microfotografías Nos. 14-16).
- Puede usar esta preparación para colorear con ácido resistente modificado; basta remover el cubre-objetos, dejar secar, fijar con metanol y colorear.
- Descartar el material utilizado en frasco con desinfectante.

Control de calidad

Ejecutar ambos métodos al mismo tiempo que incluye una muestra de heces conocida con ooquistes de estos apicomplexa.

Características de la flotación

Los ooquistes de apicomplexa pueden deformarse un poco; los ooquistes de *I. belli* pueden tomar un color rosa pálido en su interior. Habrá que diferenciar entre levaduras, *Blastocystis hominis*, otras estructuras. Deberá ensayar el método en el laboratorio hasta perfeccionar la técnica antes de implementarlo.

Referencias

1. Sheather AL. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. J Comp Technol 1923; 36:26 6-275.
2. McNabb SJN, Hensel DM, Welch DF, HeijbelL H, Mckee GL, and Istre GR. Comparison of sedimentation and flotation techniques for identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in a large outbreak of human diarrhea. J Clin Microbiol 1985; 22:587-589.
3. Kvác M, Kvetonová D, Pzová G, Ditrich O. Comparison of selected diagnostic methods for identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* in routine examination of faeces. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2003; 50:405-411.

4.4 Sedimentación 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, Sheather) 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 cuando se desea recobrar ooquistes de apicomplexa, pero encontramos que esta duración en el centrifugado forma demasiado sedimento de heces que impide realizar el examen parasitológico para el cual fue diseñado (Figura No. 7, pág. 70).

Ventajas

Puede utilizarse con heces frescas o heces fijadas previamente en formalina o en Mertiolate-Iodo-Formalina (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 con nombre del paciente.

Preparación de soluciones

Formalina al 10%

- | | |
|------------------|-------|
| - Formaldehído | 10 mL |
| - Agua destilada | 90 mL |

Materiales

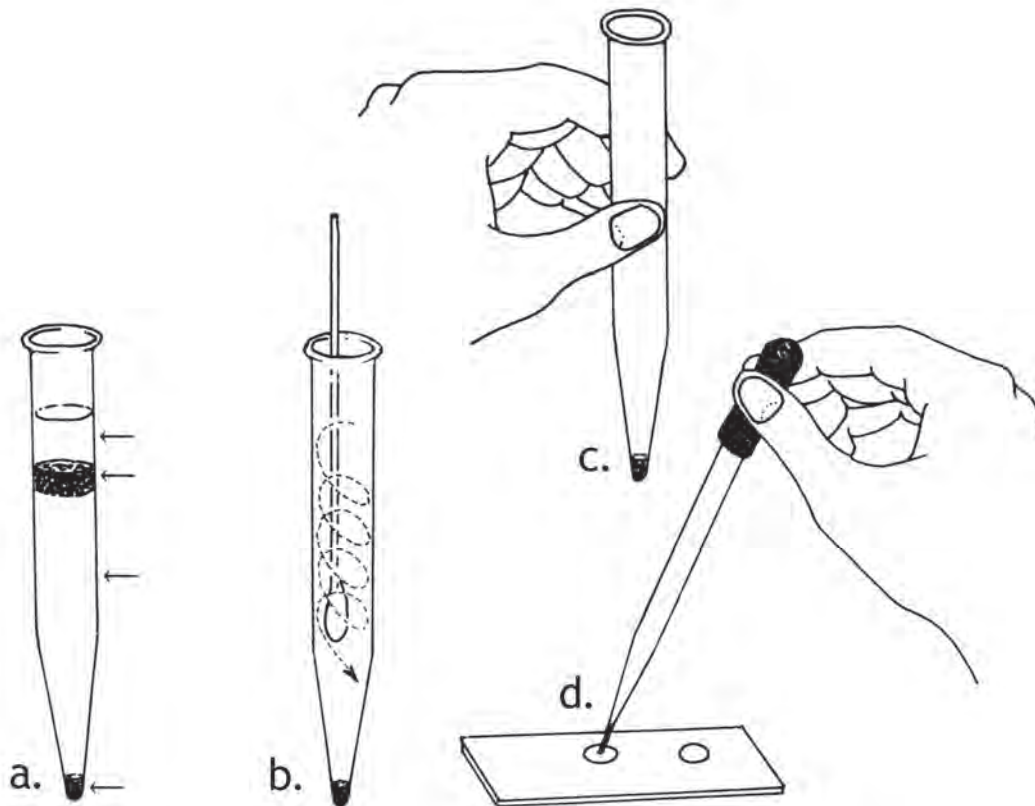
- Vasos de plástico o cartón (30 mL de capacidad)
- Tubos de centrífuga o de ensayo 13 X 100 mm
- Aplicadores
- Marcador
- Embudos de 5 cm de diámetro
- Gasa quirúrgica en rectángulos de 16 X 16 cm en 2 dobleces
- Parafilm o tapones de hule
- Solución de formalina al 10%
- Acetato de etilo
- Aplicadores 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

- a)** Identificar frascos, tubos y láminas con la muestra a examinar.
- b)** Transferir 1-2 g de heces a un vaso de plástico o cartón y agregar 10 mL de formalina.
- c)** Desmenuzar y suspender completamente las heces con ayuda de aplicadores.
- d)** Descartar aplicadores. Dejar fijar mínimo 30 minutos.
- e)** Filtrar por dos dobleces de gasa a un tubo cónico o de ensayo ayudado por embudo. Descartar gasa. Tapar tubos con parafilm o tapones de hule
- f)** Equilibrar los tubos en balanza de dos platos junto con los tapones.
- g)** Centrifugar a 1,500 rpm por 2 minutos; destapar.
- h)** Descartar el sobrenadante.
- i)** Agregar más formalina al sedimento, agitando éste con un aplicador, hasta \pm la mitad del tubo.
- j)** Agregar 2-3 mL de acetato de etilo.
- k)** Tapar el tubo con parafilm o tapón de hule y agitar vigorosamente 15 segundos.

- l)** Centrifugar a 1,500 rpm por 2 minutos.
Al final de la centrifugación se obtienen 4 capas (Figura No. 7a): sedimento, formalina, tapón de detritus y acetato de etilo. Destapar con cuidado y con un aplicador desprender el tapón de detritus todo alrededor (Figura No. 7b) y decantar el sobrenadante de un solo movimiento.
En el fondo del tubo quedará el sedimento a estudiar (Figura No. 7c).
- m)** Con un aplicador con algodón limpiar las paredes interiores del tubo (Figura 7b).
- n)** Transferir el sedimento a un porta-objetos (Figura No. 7d), cubrir con un cubre-objetos y examinar toda preparación con objetivo 10X. Pasar a mayores magnificaciones cuando sea necesario.
- o)** Para colorear quistes, agregar una gota de solución de Lugol. Descartar material utilizado en desinfectante (microfotografía No. 3). Cuando se encuentren larvas, colorear con solución de Lugol y reconocer morfología diferencial (microfotografías Nos. 5 y 6).

FIGURA No. 7*



Control de calidad

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

Referencias

- *1. Ash L. and Orihel T. Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press. American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 1987.
2. García L and Bruckner D. Diagnostic Medical Parasitology, 2nd. Edition, American Society for Microbiology Washington, D.C. 1993.

III. PARÁSITOS INTESTINALES LUMINALES Y TISULARES

RECOBRAR Y DIFERENCIAR LARVAS DE NEMATODOS Y VERIFICAR VIABILIDAD DE HUEVOS DE ALGUNAS ESPECIES DE HELMINTOS

- 5.1** MÉTODO DE HARADA MORI
- 5.2** MÉTODO DE BAERMANN MODIFICADO
- 5.3** MIGRACIÓN DE LARVAS EN AGAR
O MÉTODO DE KOGA
- 5.4** IDENTIFICAR LARVAS DE TEJIDOS:
MÉTODO DE COMPRESIÓN
- 5.5** DIGESTIÓN ARTIFICIAL

5.1 Método de Harada-Mori

Propósito

En investigaciones para estudiar la distribución regional o geográfica de las uncinarias de humanos *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*; para la diferenciación entre larvas de uncinarias del humano y de los «huevos parecidos a los de uncinarias del humano» (*Trichostrongylus*, *Ternidens*, *Strongyloides fülleborni*); en la diferenciación entre larvas de uncinarias 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*, microfotografías Nos. 9 y 10) y de céstodos (*Diphyllobothrium*, microfotografía No. 11 y *Spirometra*); para estadios similares en parasitología veterinaria.

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 dos 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 (Figura No. 8 A y B).

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 No. 8)

- a)** Con un lápiz de grafito, escribir la identificación de la muestra en el extremo más delgado de la tira de papel filtro.
- b)** 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.
- c)** Insertar esta tira con la parte escrita fuera del tubo de ensayo. Quedará una porción extendida fuera del tubo por la que pasarán elementos solubles de las heces.
- d)** Con todo cuidado agregar agua destilada hasta que el nivel llegue por debajo del extendido de heces. Tener cuidado de no mojar las heces.
- e)** No es necesario tapar los tubos, pero esta modificación se prefiere en lugares muy calientes para evitar la evaporación rápida del agua, teniendo cuidado de dejar el extremo del papel con la identificación por fuera. Puede utilizar tapón de corcho o de hule
- f)** Colocar los tubos así preparados en una gradilla y mantener en lugar seguro a temperatura ambiente.
- g)** Revisar diariamente el nivel de agua. Reemplazar aquella perdida por evaporación, con mucho cuidado de no remover el sedimento. Para verificar si hay larvas móviles en el sedimento:
- h)** Colocarse los guantes
- i)** Obtener una porción del sedimento con una pipeta Pasteur, colocandolo en la caja de Petri y observándolo al microscopio estereoscópico
- j)** Para estudiar la morfología diferencial, deberá aspirar larvas con la pipeta y colocar las larvas entre porta y cubre-objetos, o agregar solución de Lugol al sedimento para inmovilizarlas; aspirar algunas y observar al microscopio óptico entre porta y cubre-objetos. (Figura No. 8 A y B, pág. 77)
- k)** Descartar material en frasco con desinfectante. Descartar guantes.

FIGURA No. 8

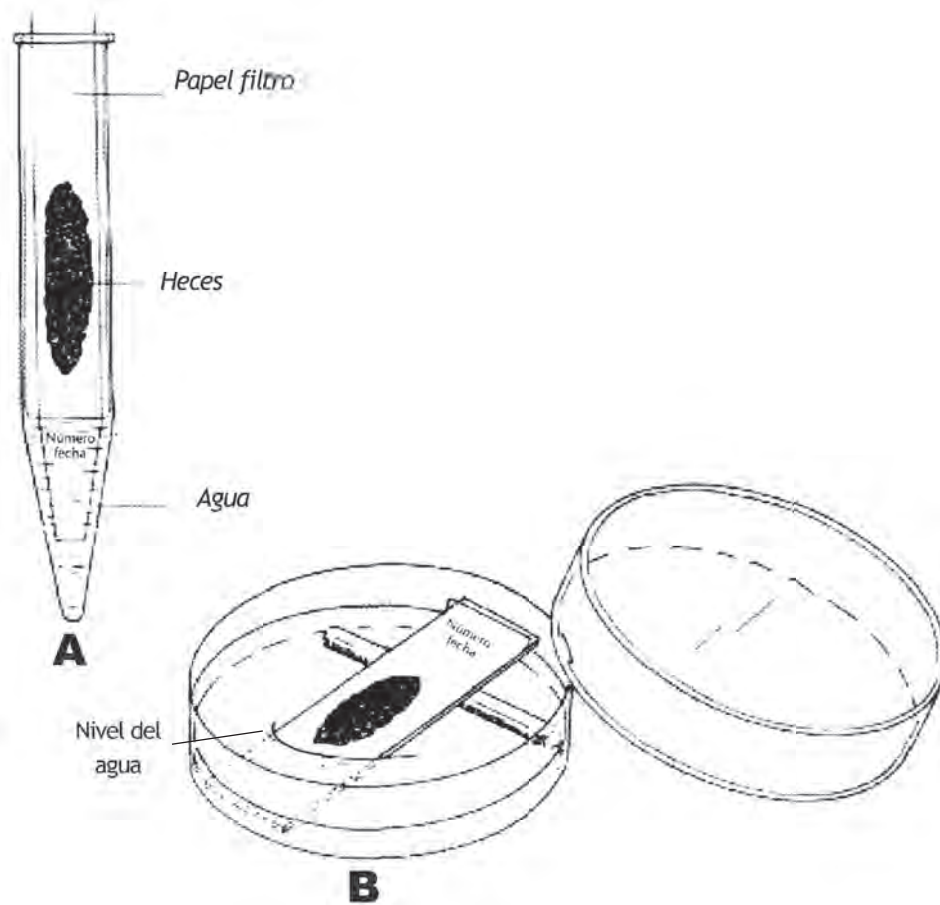


Figura No. 8. A= Harada-Mori en tubo de ensayo; **B=** Harada-Mori en caja de Petri.

(Tomado de: Ash L and Orihel TC. Parasites: a guide laboratory procedures and identification. ASCP Press, American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 1987).

Variación en caja de Petri (Figura No. 8B).

El propósito es el mismo que para el método en tubo de ensayo, excepto que aquí puede utilizar mayor cantidad de heces y puede observar el sedimento en el agua directamente al microscopio para determinar la presencia de 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.

Procedimiento

- a) Extender las heces sobre la tira de papel, la que se coloca sobre el porta-objetos u otro soporte.
- b) Colocar esta preparación en la caja de Petri reposando en un extremo por aplicadores o por una varilla de vidrio para lograr una inclinación.
- c) Agregar agua destilada a la caja de Petri asegurando que el agua ascienda por capilaridad en la tira de papel con heces.
- d) Tapar y dejar a temperatura ambiente por 2-3 días. Asegurar que la preparación no se seque.
- e) Al cabo de 2-3 días, colocar la preparación en el microscopio estereoscópico y buscar larvas en el agua. Estos procedimientos deben realizarse con guantes.
- f) Con una pipeta Pasteur obtener una porción del agua de la caja tratando de aspirar larvas y examinar entre porta y cubre en un microscopio óptico para verificar la morfología. O bien, verter el líquido en un tubo de ensayo, centrifugar y recobrar las larvas del sedimento. Si desea, puede agregar formalina al 10% antes de centrifugar para fijar las larvas. Identificarlas según características morfológicas específicas.
- g) Consultar con las microfotografías provistas Nos. 4-6 para reconocer la morfología específica de larvas más comunes en heces humanas.
- h) Todo material se descarta en la solución desinfectante.

Referencias

1. Beaver PC, Malek E, and Little MD. Development of *Spirometra* and *Paragonimus* eggs in Harada-Mori cultures. J Parasitol 1964; 50:664-666.
2. Little MD. 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.
3. Tulane University, School of Public Health and Tropical Medicine, Department of Tropical Medicine. Parasitologic Methods, 1992.

5.2 Método de Baermann modificado

Propósito

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

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 No. 9, pág. 81).

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, con cirrosis, quemadas severas, que recibirán radiaciones, pacientes oncológicos, pacientes viviendo con SIDA y otros. Para verificación terapéutica. Se aumenta la probabilidad de diagnóstico con exámenes repetidos durante varios días o semanas.

Nota *Es posible, pero raro, encontrar larvas de primer estadio de Angiostrongylus costaricensis en heces de algunos individuos infectados. Son menos móviles que las de Strongyloides, miden 260-290 μm de largo y poseen una muesca en la terminación de la cola, característica de larvas de Metastrongilideos (microfotografía No. 6).*

Recolección de la muestra

Heces frescas, sin fijar, 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 luego 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 espátulas 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

- a)** Identificar el vaso con la muestra a examinar.
- b)** Verter el agua a 37°C dentro del vaso de sedimentación más o menos hasta 3 cm antes del borde.
- c)** 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.
- d)** Cubrir esta preparación con la gasa.
- e)** Colocar esta preparación con la gasa hacia abajo, dentro del vaso, procurando que las heces queden sumergidas en el agua.
- f)** Esperar una hora. Las larvas migrarán de las heces al agua y caerán al fondo del vaso.
- g)** Después de la hora, identificar la caja de Petri, 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.
- h)** Colocar este sedimento en la caja de Petri. Esta operación puede repetirse 2-4 veces.
- i)** 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.
- j)** Reconocer las características de la larva de *S. stercoralis*: Cápsula bucal corta, primordio genital grande (microfotografía No. 5).
- k)** Descartar material en frasco con desinfectante.

FIGURA No. 9



Figura No. 9. Vaso de sedimentación o de cerveza. Las larvas caen al fondo del vaso y se aspiran con una pipeta Pasteur usando un bulbo de goma. (Esquema: Darlan Matute).

Referencias

1. Lumbreras H. Strongiloidosis. I. Evaluación de la técnica de Baermann modificada en copa en el estudio de la estrogiloidosis. Rev Méd Peruana 1967; 22:119-126.
2. Kaminsky R. Evaluation of three methods for the identification of *Strongyloides stercoralis* infection. J Parasitol 1993; 79:277-280.
3. Knopp S, Mgen AF, Khamis IS, Steinmann P, Stothard JR, Rollinson D, Marti HP, Utzinger J. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. PLoS Negl Trop Dis 2008; 2(11):e331.

5.3 Migración de larvas en agar o Método de Koga

Propósito

Este método fue desarrollado por investigadores japoneses y demostrado de aumentar la sensibilidad de detección en heces de infecciones por *Strongyloides stercoralis*. Se ha reconocido más sensible y el que provee un diagnóstico más exacto de infecciones por *S. stercoralis*. Para estudios epidemiológicos debe ensayarse primero y perfeccionar la técnica, sobre todo en situaciones que necesitan transportarse del campo al laboratorio situado en lugar diferente. Incidentalmente podrían recobrase larvas de *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale* si las infecciones estuvieran presentes.

Una vez probado en el campo para encuestas epidemiológicas, el método de migración en agar sería una herramienta útil para el salubrista involucrado en el diseño de estrategias de control de estrombiloidiasis, permitiendo identificar como estaría distribuida la infección en una comunidad y la intensidad de la carga que causaría morbilidad.

Importancia del diagnóstico

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

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). Es útil en encuestas epidemiológicas.

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. Debe ser probado cuidadosamente antes de implementarlo en encuestas epidemiológicas; material potencialmente infectante.

Muestra necesaria

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)
- 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
- Centrifuga
- 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. Esterilizar en 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*
- *Guantes*
- *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 potencialmente infectante. Utilizar guantes durante todo momento de la observación de las muestras. La literatura japonesa ofrece otras recomendaciones de protección, 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

- a) Identificar la placa de agar con la muestra de heces a examinar.
- b) Con la ayuda de baja-lenguas, palo de paleta o aplicadores de madera, colocar 1g de heces en el centro de la placa. Si las heces están duras o formadas, ablandar con unas gotas de agua destilada en un frasco aparte primero. Tratar de que las heces queden extendidas lo más posible y en contacto con el medio de agar.
- c) Tapar la placa.
- d) Incubar a 37°C. Pueden asimismo dejarse en un lugar protegido a temperatura ambiente, pero el tiempo de observación se prolonga.
- e) Incubar 24 horas.
- f) Antes de sacar las placas de la incubadora, ponerse los guantes. Sacar las placas y llevar a la mesa de trabajo.
- g) Colocar una placa en el microscopio estereoscópico y sin destapar buscar caminos de larvas y/o larvas en la superficie del medio (fotografía No. 24 contraportada). Si se forma agua de condensación en la tapadera, limpiar con papel absorbente y descartar este en desinfectante. Volver a tapar y continuar.
- h) Si no se observan caminos ni larvas (microfotografía No. 25 contraportada) dejar en incubación otras 24 horas. Al cabo de ese tiempo, volver a examinar en microscopio estereoscópico.

- i) Para recobrar larvas, verter formalina al 10% sobre la superficie del agar, sin verterla sobre las heces.
- j) Inclinar la placa y con una pipeta Pasteur aspirar la formalina y colocar en un tubo de ensayo previamente identificado.
- k) Centrifugar a 1,500 rpm durante 2 minutos.
- l) Decantar o extraer cuidadosamente el sobrenadante.
- m) Recobrar el sedimento con otra pipeta y colocar en un porta-objetos, cubrir y observar al microscopio óptico.
- n) Identificar larvas presentes por morfología específica bajo objetivo 40X: 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* (microfotografía No. 5).

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

1. 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. J Parasitol 1990; 16:425-428.
2. Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C, Sukavat K, Nakamura Y, et al. An evaluation of the agar plate method for the detection of *Strongyloides stercoralis* in northern Thailand. J Trop Med Hyg 1990; 93:183-188.
3. Kaminsky R. Evaluation of three methods of laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. J Parasitol 1993; 79:277-280.
4. Jorgensen T, Montresor A and Savioli L. Effectively controlling strongyloidiasis. Parasitology Today 1996; 12:164.
2. Glinz D, Silue´ KD, Knopp S, Lohourignon LK, Yao KP, Steinmann P, Rinaldi R, Cringoli G, N’Goran EzK, Utzinger J. Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga agar plate, ether-concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(7):e754.

5.4 Identificar larvas de tejidos: 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, que es más sensible. Algunos autores sugieren un xenodiagnóstico, en donde se alimentan ratas de laboratorio libres de la infección con el tejido sospechoso, examinándose los tejidos del animal sacrificado un mes después.

Materiales

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

Procedimiento

- a)** Dependiendo de la cantidad de tejido no fijado a examinar, utilizar un triquinoscopio (diafragma entero de cerdo) o dos porta-objetos de 7.5 X 2.5 cm (3 X 2 pulgadas) para colocar 0.5 g o menos de tejido.
- b)** 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.
- c)** Observar en un microscopio estereoscópico o uno óptico para determinar la presencia de larvas de *Trichinella spiralis*.

Características

Si la infección es reciente, las larvas no estarán 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.

5.5 Digestión artificial

Propósito

Recobrar larvas y adultos de helmintos o quistes tisulares incluyendo 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. Se ha comprobado que es superior al método de compresión de tejidos, especialmente cuando las infecciones en músculo podrían ser leves.

Parásitos

El método descrito sirve específicamente para recobrar larvas de *T. spiralis* (músculo de animales infectados o material de autopsia) y larvas de *A. costaricensis* (tejidos de babosas veronicelidos). Pueden recobrase otros parásitos tisulares como especies de *Onchocerca* de nódulos, otras filarias, *Capillaria* en hígado, huevos de tremátodos en tejidos, etc (en 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.

Opciones de muestras

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

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 los cuales son digeridos, ni para estadios calcificados, perdiéndose infecciones muy recientes o muy viejas.

Preparación de líquido de digestión artificial

- 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

- a)** Pesar el tejido en cuestión para determinar la cantidad de líquido de digestión necesario.
- b)** Desmenuzar el tejido o cortar en pedazos pequeños con bisturí, o introducir en la licuadora.
- c)** Agregar el líquido de digestión artificial, 20-30 mL por cada gramo de tejido. Licuar. Verter en un frasco de vidrio e incubar a 37°C varias horas o toda la noche, o a 45°C por 30 minutos, agitando periódicamente con una varilla de vidrio.
- d)** 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.
- e)** Esperar que sedimente como mínimo 1 hora.
- f)** 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.
- g)** Examinar bajo microscopio estereoscópico. Para identificar las larvas a nivel de especie tomar algunas con una pipeta, colocar entre porta y cubre-objetos y examinar al microscopio óptico, reconociendo morfología característica según especie.
- h)** Si se desea recobrar todas las larvas, centrifugar todo el sedimento y recobrarlas del fondo del centrifugado.

Características morfológicas

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

Larvas de *A. costaricensis* recuperadas de babosas: larvas L3 miden 480 μ m de largo por unas 28 μ m de ancho. La parte anterior es redondeada y presenta dos rabdiones prominentes. El esófago mide 164 μ m de largo, es decir, casi la mitad del total de la larva. La cola presenta una indentación en su lado dorsal, característica de larvas de metastrongilideos (microfotografía No. 6).

Para otros helmintos adultos o quistes de protozoos, consultar literatura específica.

Referencias

1. Kozek W. *Trichinella spiralis*: Morphologic characteristics of male and female intestine-infecting larvae. Exp Parasitol 1975; 37:380-387.
2. Kaminsky R, Andrews K y Morán E. *Angiostrongylus costaricensis* en babosas en Honduras. Rev Méd Hondur 1987; 55:4-8.
3. Morera P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. Am J Trop Med Hyg 1973; 613-621.
4. Gajadhar A, Forbes L, and Rajic A. The double separation funnel technique for the detection of *Trichinella* larvae in pork. Official Protocol, Canadian Food Inspection Agency, versión 1.0, Ottawa, Canada, 1996.

MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

III. PARÁSITOS INTESTINALES LUMINALES Y TISULARES

IDENTIFICACION ESPECIAL DE ALGUNOS CESTODOS: PROGLÓTIDOS, LARVAS Y GANCHOS ROSTELARES

- 6.1** MÉTODO RÁPIDO DE TINTA CHINA PARA ESPECIACIÓN DE *TAENIA*

- 6.2** MÉTODO DE MONTAJE EN BERLESE DE GANCHOS ROSTELARES DE CISTICERCOS

- 6.3** MÉTODO DE MEDICIÓN E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE GANCHOS ROSTELARES.

6.1 Método rápido de tinta china para especiación de *Taenia*

Propósito

Identificar específicamente proglótidos de *Taenia* expulsados por individuos infectados.

Nota: *No se puede enfatizar suficiente la importancia de identificar infecciones por *T. solium*, por el peligro que representa la diseminación de los huevos de este parásito y el riesgo de adquirir una cisticercosis para el individuo, su familia y la comunidad, así como pérdidas económicas en cerdos. 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 para enviar al laboratorio

Proglótidos grávidos sin fijar, o fragmentos de estróbila o cualquier proglótido expulsado, con o sin heces, 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 ya que se desconoce en este momento si es o no *T. solium*; requiere manipulación cuidadosa, puede contaminar fácilmente el área del laboratorio. Puede no inyectarse bien el proglótido, o éste puede estar con las ramas uterinas vacías o estar semimacerado y no revelar claramente el número de ramas uterinas necesarias para diagnóstico.

Alternativas

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.

Un método de identificación permanente es la coloración con carmín, que demora varios días y requiere personal más calificado.

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

- a)** 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.
- b)** Colocar un proglótido sobre 3-4 dobleces de papel absorbente y secarlo por ambos lados.
- c)** Aspirar algunas gotas de tinta china en la jeringa de tuberculina.
- d)** Inyectar el proglótido afianzado sobre el papel absorbente, introduciendo la aguja en la rama uterina central del proglótido como si fuera inyección subcutánea.
- e)** Secar con otro papel el exceso de tinta y humedad y colocar el proglótido entre dos porta-objetos.
- f)** Ejercer presión para apretar el proglótido al mismo tiempo que otra persona sella alrededor de la preparación con cinta adhesiva.
- g)** 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 13.
- h)** 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.
- i)** 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.

6.2 Método de montaje en Berlese de ganchos rostellares de cisticercos

Propósito

Destacar ganchos rostellares de cisticercos provenientes de hospederos intermediarios diferentes (ej., animales silvestres) o del humano infectado accidentalmente. El método descrito es una modificación que utiliza líquido modificado de Berlese.

Nota: Para cisticercos en general, basta colocar el cisticerco, sin el líquido contenido en la vesícula, entre dos porta-objetos y ejercer presión suave, observando al microscopio estereoscópico u óptico a menor aumento (X 25 ó 45). La presencia de 4 ventosas y una corona de doble fila de ganchos confirmaría la identificación. Cuando se prefiere una preparación más permanente y no se cuenta con un laboratorio de patología, o en investigación de campo en animales silvestres se utilizan otros métodos como el descrito abajo.

Preparación del medio de Berlese

- Goma arábiga 4.0 g
- Agua destilada 4.0 mL
- Glicerina 2.5 mL
- Hidrato de cloral 35.0g
- Ácido acético glacial 1.5 mL

Mezclar, guardar en frasco tapado y rotulado.

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 Berlese
- Aplicadores de madera o alfileres entomológicos

Procedimiento

- a) Remover con cuidado el quiste del tejido.
- b) Abrir el quiste con un bisturí sobre una caja de Petri y exponer el cuello del protoescolex.
- c) Colocar éste entre dos porta-objetos y comprimir apretando suavemente.
- d) Transferir de esta manera a una solución de ácido clorhídrico al 1% durante unos minutos para disolver los corpúsculos calcáreos.
- e) 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.
- f) Transferir el escolex aclarado a una gota del medio de Berlese durante unos minutos sobre un porta-objetos, cubrir con un cubre-objetos y oprimir suavemente, lo que esparce los ganchos y facilita su medición y cuenta.

El rostelo de *T. solium* presenta doble fila de ganchos en número de 22 a 36; cortos externos (100-150 µm) y grandes internos (140-200 µm).

Referencia

Beaver PC, Jung RC, and Cupp E. Clinical Parasitology. 9th Edition. Lea and Febiger, (pg. 778), 1985

6.3 Método de medición e identificación morfológica de ganchos rostelares.

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 No. 10, pág. 98). *Echinococcus vogeli* y *E. oligarthus* son especies nuevas reconocidas de países suramericanos, diferentes de *E. granulosus* que exigen diferenciación para poder considerar manejo y pronóstico de los pacientes infectados.

Solución

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 No. 2
- Lápiz de grafito con borrador o caucho en el extremo posterior
- Microscopio óptico calibrado

Procedimiento

- a) Identificar al microscopio la presencia de cápsulas prolíferas o protoescólicas, colocarlos en una gota de solución salina con una pipeta Pasteur.
- b) Cubrir con el cubre-objetos.
- c) 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.
- d) Observar al microscopio en busca de ganchos sueltos. Si no los hay repetir la operación de desintegración.
- e) 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. Usar en las medidas el objetivo de inmersión o 90X y oculares 10X.
- g) Medir la longitud total (Figura No.10a).
- h) Medir la longitud del mango (Figura No.10b).
- i) Restar la segunda de la primera, lo que da la longitud del talón y hoja.
- j) 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*.

FIGURA No. 10

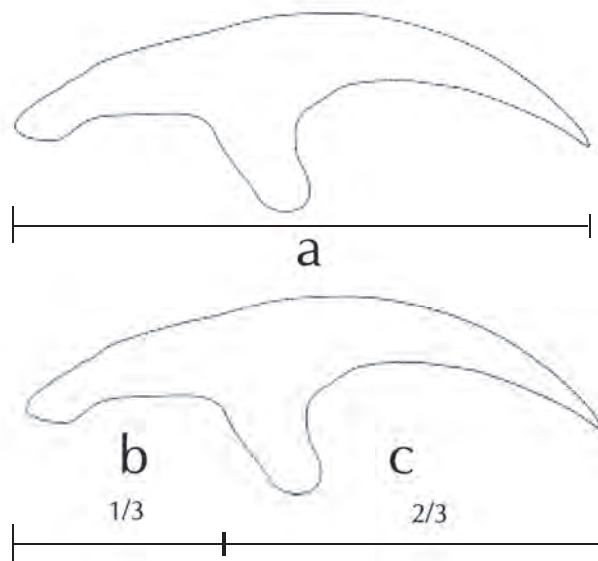
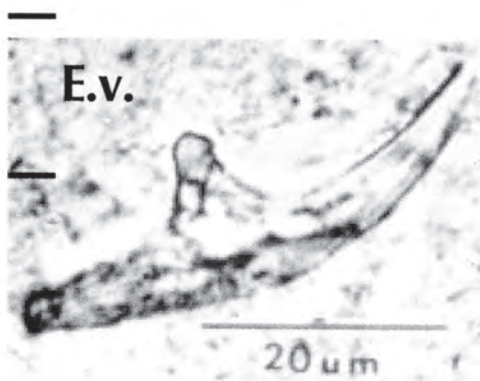


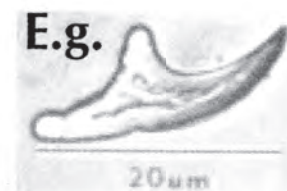
Figura No. 10 Medición de ganchos de protoesclólices:
a- longitud total; b- longitud del mango; c- longitud de la hoja.



E. vogeli



E. oligarthus



E. granulatus

Medidas

E. vogeli: El largo promedio de los ganchos grandes es de 42 μm (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 μm (rango 29-35 μm); tienen el lomo de la hoja casi recto y la hoja-talón constituyen casi la mitad del largo del gancho.

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 de *E. granulosus* es de 22.5 μm (rango 22-23 μm); en *E. multilocularis* miden 27.4 μm , (rango 27-28.5 μm). 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.

Referencias

1. 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). Am J Trop Med Hyg 1978; 27:1195-1202.
2. Abdul-Hadi S, Chacón NdeJ, Bruces A, Gutierrez JE, Safar JA, Egui MA, Falco A, Cantele HE. Echinococosis hepática poliquística autóctona por *Echinococcus vogeli* en el amazonas venezolano: descripción de un caso. Rev Soc Venezolana Microbiol 2007; 27:120-126.
3. D'Alessandro A & Rausch RL. New aspects of neotropical polycystic (*Echinococcus vogeli*) and unicystic (*Echinococcus oligarthus*) echinococosis. Clin Microbiol Rev 2008; 21:380-401.
4. D'Alessandro A. Hidatidosis poliquística tropical por *Echinococcus vogeli*. Rev Asoc Méd Argentina 2010; 123:16-23.

III. PARÁSITOS INTESTINALES LUMINALES Y TISULARES

COLORACIONES: IDENTIFICACIÓN DE PROTOZOOS INTESTINALES LUMINALES Y TISULARES; ESPORAS DE MICROSPORIDIA

- 7.1** COLORACIÓN CON HEMATOXILINA FÉRRICA DE HEIDENHAIN PARA PROTOZOOS INTESTINALES.
- 7.2** COLORACIÓN ÁCIDO RESISTENTE MODIFICADA PARA OOQUISTES DE APICOMPLEXA INTESTINALES.
- 7.3** COLORACIÓN TRICROMO MODIFICADA PARA ESPORAS DE MICROSPORIDIA.
- 7.4** COLORACIÓN AZUL DE METILENO-TRICROMO, ESPORAS DE MICROSPORIDIA.

7.1 Coloración con Hematoxilina férrica de Heidenhain para protozoos intestinales.

Propósito

Método clásico para colorear e identificar estadios de protozoos patógenos y comensales comunes en heces del humano, sobre todo cuando sólo hay trofozoítos o cuando hay infecciones mixtas. Las descripciones clásicas en los libros de referencia sobre la morfología y características de cada estadio y de cada especie están basadas en organismos coloreados por este método. Método confiable para identificación de estadios de *Dientamoeba fragilis*. Aunque la identificación de infecciones por *Entamoeba histolytica* necesita de pruebas moleculares, este método es útil en países en desarrollo para la confirmación de trofozoítos hematófagos de heces disentéricas, de exudados, líquidos, esputo, aspirados, raspado de úlcera de piel.

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 dos décadas, con la redescrición 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 (dientérica 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 tres 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 Fournoy y colaboradores.

Muestra para laboratorio

Heces frescas recolectadas en un frasco (vidrio, plástico, cartón) limpio, seco, con tapadera, sin contaminación (agua, tierra, orina). Evitar colocar la muestra a temperaturas extremas. Deben ser recogidas al momento de evacuadas y llevarlas al laboratorio lo más pronto posible, no más de 30 minutos. El laboratorio deberá fijarlas inmediatamente.

Cuando haya moco y sangre, recoger de esta parte.

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

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 Mayer

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».

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 1 000 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
- Papel lente para limpiar lentes de microscopio.

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.

- a)** Agitar el frasco conteniendo la muestra fijada y verter 1 mL a un tubo de centrifuga.
- b)** Si hubiere partículas muy gruesas, en este momento puede filtrarse por un embudo con gasa en dos dobleces. Descartar la gasa y poner el embudo en solución desinfectante.
- c)** Llenar el tubo con agua destilada y centrifugar 2 min a 2,000 rpm.
- d)** Descartar el sobrenadante.
Este paso puede repetirse otra vez para eliminar fijador en exceso.

- e) 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.
- f) 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:
 - g) Alcohol 50% 5 min
 - h) Alcohol 70% yodado 2- 5 min
 - i) Alcohol 70% 2-5 min
 - j) Alcohol 50% 3 - 5 min
 - k) Lavar en agua corriente 3-10 min
 - l) Solución mordente sulfato férrico amónico 10 min
 - m) Lavar en agua corriente 3 min
 - n) Hematoxilina acuosa 10 min
 - o) Lavar en agua corriente 2 min
 - p) Ácido pícrico saturado, diferenciador 10-15 min
 - q) Lavar en agua corriente 15-30 min
 - r) Deshidratar por una batería de alcoholes en incremento 70%, 95%, y dos cambios en 100% 2 min en c/u
 - s) Xilol 2 min
 - t) Colocar 1-2 gotas de permount, cubrir con cubre-objetos, dejar secar y observar con objetivo de inmersión.

Control de calidad

Una coloración bien hecha depende de una fijación correcta y una coloración diferenciada que destaca claramente las características del núcleo y las inclusiones citoplásmicas. Preparar extendidos finos de heces que contengan estadios de protozoos de determinada especie previamente identificada o de cultivos de protozoos. Guardar toda muestra de heces positiva fijada y toda lámina positiva teñida 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: láminas positivas coloreadas, fotografías, microfotografías, atlas, libros de texto.

Nota: *En sospecha clínica de amebiasis intestinal es obligatorio: a) identificar trofozoitos hematófagos en heces; b) comprobar úlceras en recto o sigmoide y recobrar tofozoitos de E. histolytica de las mismas; c) realizar una serología específica para comprobar títulos altos de anticuerpos compatibles con amebiasis.*

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 lavado en agua no removió los cristales y que requiere más tiempo de lavado.
- La diferenciación en ácido pícrico saturado es crítica; debe hacerse pruebas hasta obtener una diferenciación satisfactoria de estructuras.
- 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, secar bien los frascos coplin antes de verter el nuevo alcohol y volver a deshidratar la lámina.
- 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

1. Scholten T. and Yang S. Evaluation of unpreserved and preserved stools for the detection and identification of intestinal parasites. Am J Clin Pathol 1974; 62:563-567.
2. Flournoy DJ, McNabbSJM, Dodd ED. Rapid trichrome stain. J Clin Microbiol 1982; 16:573-574.
3. Parasitologic Methods. Dept of Tropical Medicine, School of Public Health and Tropical Medicine, Tulane University 1996.
4. Chacín-Bonilla L. Microscopic diagnosis of amebiasis: an obsolete method but necessary in the developing world. Invest Clin 2011; 52(4):291-294.
5. Alves Garcia J & Cimerman S. Detection of *Dientamoeba fragilis* in patients with HIV/AIDS by using a simplified iron hematoxylin technique. Rev Soc Brasileira Med Trop 2012; 45(2):156-158.

7.2 Coloración ácido resistente modificada para ooquistes de apicomplexa intestinales

Propósito

Poner en evidencia por medio de una coloración, los ooquistes de apicomplexa intestinales *Cryptosporidium* spp., *Isospora belli* y *Cyclospora cayetanensis* excretados en heces de individuos infectados.

El análisis de los resultados de búsqueda pasiva (informes diarios del libro de registro) de pacientes con criptosporidiasis facilitaría la obtención de estadísticas vitales sobre la frecuencia de este parásito por meses del año, sobre la edad, sexo y nivel socioeconómico de los infectados; características de las heces, otras parasitosis asociadas, etc., que, a falta de encuestas puntuales, llenaría un vacío con datos útiles, necesarios y contributorios procedentes de todos los laboratorios de salud del país de estas parasitosis y su impacto.

Nota: La OMS ha declarado (2004) *Cryptosporidium* spp. como Parasitosis Desatendida de la Infancia, por lo que su identificación e informe son importantes. Estas infecciones por apicomplexa intestinales se han identificado y documentado en Honduras desde 1986. Hasta la fecha (2013) solamente el Servicio de Parasitología del Departamento de Laboratorios Clínicos del Hospital Escuela realiza su búsqueda e informe de manera regular y constante. Conglomerado de resultados se han dado a conocer por medio de presentaciones a congresos y publicaciones en revistas científicas. La omisión injustificada de este informe al clínico puede significar un daño al paciente, ya que el no informarlos demora el manejo correcto o se realizan intervenciones innecesarias, costosas y potencialmente perjudiciales.

Opciones de 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. Guardar en 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

Preparación del extendido:

Identificar el porta-objetos con la muestra a examinar. Considerar consistencia y aspecto de las heces y escoger lo que compete (Algoritmo No. 5, pág. 177).

- **Heces formadas o blandas, frescas, 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 fijadas en formalina:** mezclar bien y hacer un extendido fino sobre un porta-objetos. Puede aspirar unas gotas con pipeta en vez de aplicador. Dejar secar.
- **Heces frescas con moco:** tomar también el moco y hacer un extendido fino. Dejar secar.

- **Heces diarreicas o líquidas con abundante moco:** utilizar previamente un mucolítico en una porción de la muestra y utilizar esta porción para hacer un extendido fino y dejar secar.
- **Si las heces son líquidas** (como agua) es preferible aspirar unas pocas gotas del fondo del frasco o después de agitar las heces, con una pipeta Pasteur en vez de utilizar aplicador de madera y con estas gotas hacer un extendido fino en un porta objetos. Dejar secar.
 - a) Fijar el extendido con metanol puro 30 segundos. Dejar secar.
 - b) Introducir en carbol fucsina 5 minutos.
 - c) Escurrir sobre gasa, introducir en alcohol etílico 3-5 segundos.
 - d) Enjuagar en agua corriente, escurrir sobre gasa.
 - e) Introducir en diferenciador ácido sulfúrico 0.1 N durante 8-10 segundos. Este es un paso crítico, por lo que debe asegurarse del tiempo necesario según sus reactivos.
 - f) Lavar en agua corriente por ambos lados, escurrir sobre gasa.
 - g) 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 40X.

Una vez que se encuentren cuerpos parecidos a ooquistes teñidos, asegurar el 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 (microfotografías Nos. 14-16). Los ooquistes de *I. belli* 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 permanecen 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 Sheather pág. 64). Heces de cualquier consistencia pueden contener ooquistes, no solamente las diarreicas o líquidas. Guardar las láminas positivas, debidamente rotuladas, para referencia y control.

Referencias

1. Ash L and Orihel T. Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press, American Society of Clinical Pathology, Chicago, 1987.
2. Eberhard ML, Pienazek NJ, Arrowood MJ. Laboratory diagnosis of *Cyclospora* infections. Arch Pathol Lab Med 1997; 121:792-797.

7.3 Coloración tricromo modificada para esporas de microsporidia

Propósito

Detectar esporas de microsporidia intestinales en materia fecal u otro tipo por microscopía óptica como un nuevo método no invasivo y práctico, cuando se sospecha esta infección en pacientes viviendo con SIDA con diarrea crónica y sin otro hallazgo en las heces o pacientes VIH positivos, sujetos desnutridos con diarrea crónica sin otros hallazgos parasitológicos o en otros sujetos en quienes se sospeche la infección VIH/SIDA. Se ha informado microsporidiasis intestinal en niños con diarrea.

Opciones de muestras

Heces fijadas en formalina al 10% en la proporción 1:3
Heces frescas que se pueden fijar en el laboratorio
Aspirado duodenal fijado en formalina al 10%
Orina
Raspado de cornea, aspirado de humor acuoso.

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. Puede aplicarse para otro material distinto a las heces, como raspado de cornea.

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 o por PCR, requiere de personal adiestrado en la técnica y muy calificado para observar la preparación e identificar los organismos. Algunos autores informan un 25% de positividad únicamente. Puede haber falsos negativos, en ocasiones en que la excreción de esporas es baja.

Preparación de reactivos

Colorante de tricromo

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

Mezclar los 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
- Permout
- Alcohol etílico puro de 95%
- Alcohol etílico puro de 100%
- Xilol (o tolueno, sustituto)
- Frascos coplin de coloración

Procedimiento

- a) Identificar la lámina con la muestra a diagnosticar
- b) Hacer un extendido muy fino con la suspensión de heces fijadas. Dejar secar
- c) Fijar en metanol puro durante 5 minutos
- d) Colorear con tricromo durante 90 minutos
- e) Enjuagar en alcohol ácido 10 segundos
- f) Enjuagar brevemente en alcohol al 95%
- g) Deshidratar en alcohol al 95%, 5 minutos
- h) Deshidratar en alcohol 100%, 10 minutos
- i) Xilol (o sustituto) 10 minutos
- j) Cubrir con una gota de permount y un cubre-objetos
- k) Examinar bajo objetivo de 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 brillante, con un tamaño aproximado de 1.5 µm X 0.9 µm. Esporas de *Encephalitozoon intestinalis* miden 2.2 X 1.2 µm. A veces levaduras y otras estructuras toman la tinción y se diferencian por su tamaño más grande y color más intenso. Las bacterias y el material de fondo se tiñen de verde.

Referencias

1. Weber R, Bryan R, Owen R, Wilcox M, Gorelkin L, Visvevara G. Improved light microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. NEJMed 1992; 326:161-166.
2. Kaminsky R, Stovall M, Mayer ML, Martin AD, Bowers L and Didier E. Microsporidia intestinales en pacientes viviendo con SIDA en Honduras. Rev Méd Hondur 2007; 75:116-123.

7.4 Coloración azul de metileno-tricromo, esporas de microsporidia

Propósito

Para el diagnóstico de microsporidia intestinales en heces de personas viviendo con SIDA y otras. La coloración se adaptó para países en desarrollo. Es más rápida que la coloración tricromo modificado (Sección 7.3) 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 en formalina al 10% en proporción 1:3.

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

- Cromotopo 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
- Papel lente para limpiar oculares y objetivos

Procedimiento

- a) Preparar un extendido muy fino de una muestra de heces previamente fijada en formalina salina al 10% (proporción 1:3). Dejar secar.
- b) Fijar en metanol absoluto durante 3 minutos.
- c) Colorear con azul de metileno 3 minutos. Enjuagar en agua corriente.
- d) Colorear con tricromo por 10 minutos.
- e) Enjuagar en alcohol ácido 5 segundos.
- f) Enjuagar en etanol al 95% 1 minuto.
- g) Deshidratar en alcohol al 95% y al 100%, 1 minuto cada uno.
- h) Deshidratar en xilol o su equivalente por 10 minutos.
- i) 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. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95:605-60.

IV. PARÁSITOS TRANSMITIDOS POR VECTORES

DIFERENTES MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN, COLORACIÓN Y CULTIVO

- 8.1** CONCENTRACIÓN Y COLORACIÓN DE MICROFILARIAS.
- 8.2** DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE LA MALARIA.
- 8.3** DIAGNÓSTICO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN ENFERMEDAD DE CHAGAS.
- 8.4** MÉTODOS MÁS COMPLEJOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*.
- 8.5** CONFIRMACIÓN PARASITOLÓGICA DE LEISHMANIASIS: DOS MÉTODOS
- 8.6** ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD PARASITARIA DE AMASTIGOTES EN FROTES DE MATERIAL ESPLÉNICO ASPIRADO.

MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

8.1 Concentración y coloración de microfilarias

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 resultados iguales. Orina recolectada en frasco limpio. Linfa tomada por un médico.

Preparación de reactivos

Formalina al 2%

- Formalina 2 mL
- Agua destilada 98 mL

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

Colorante de Giemsa

Colorante de Giemsa diluido 1:50 con buffer pH 7.2 (preparación del buffer, página 128).

Buffer (o solución amortiguadora) alcalino, solución madre

- Na₂HPO₄ (fosfato de sodio dibásico) 9.5 g
- Agua destilada 1,000 mL

Mezclar bien y guardar en frasco tapado y rotulado.

Buffer (o solución amortiguadora) ácido, solución madre:

- NaH₂PO₄ (fosfato de sodio monobásico) 9.2 g
- Agua destilada 1,000 mL

Mezclar bien y guardar en frasco tapado y rotulado.

Para preparar el buffer, mezclar las soluciones de acuerdo al cuadro abajo (para 200 mL de búffer). Notar que se ofrecen 3 pH diferentes.

Cuadro No. 2. Preparación de buffer de diferente pH

pH	Buffer Alcalino (mL)	Buffer Acido (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

Colorante de hematoxilina de Delafield

- Cristales de hematoxilina 4 g
- Alcohol etílico al 95% 125 mL
- Solución saturada de sulfato de aluminio y amonio
[AlNH₄(SO₄)₂.12H₂O] 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 pulgadas) nuevos y limpios
- Colorante de Giemsa
- Colorante de hematoxilina de Delafield
- Permout

- Xilol
- Cubre-objetos 22 X 30 mm. No.1
- Tubos cónicos de centrífuga, 15 mL de capacidad, o tubos de 13 X 100 mm de fondo redondo.

Procedimiento:

- a)** Rotular cada tubo con los datos más importantes de cada paciente a examinar.
- b)** 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.
- c)** Centrifugar a 1,500 rpm por 2 minutos.
- d)** Decantar el sobrenadante cuidando de no agitar el sedimento en el fondo del tubo.
- e)** 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.
- f)** Con la otra porción del sedimento, hacer un extendido fino en lámina previamente identificada y dejar secar completamente a temperatura ambiente.
- g)** Colorear con Giemsa, para distinguir las diferentes células y poros, y con hematoxilina de Delafield, para reconocer la vaina cuando presente.

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

- a)** Fijar el extendido fino ya seco en metanol durante 30 segundos. Dejar secar.
- b)** Introducir en frasco con colorante de Giemsa, esperar el tiempo, indicado según la dilución preparada.
- c)** 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 se tiñen 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 se vera. La vaina de *Brugia* tendrá un color rosado brillante; la de *Loa loa* no se tiñe con Giemsa.

FIGURA No. 11

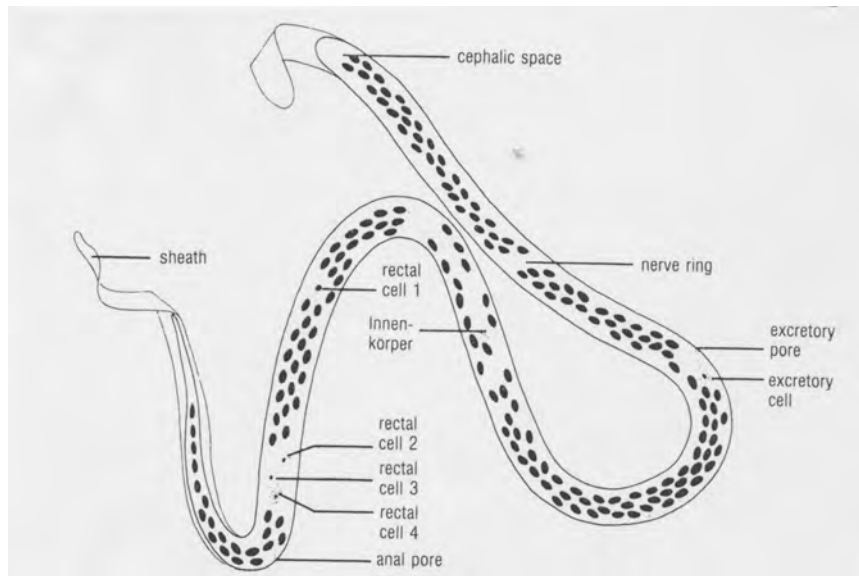


Figura No. 11. Microfilaria, estructuras y células que debe reconocer para la identificación de especies. (Tomado de: Ash L and Orihel T. Parasites: a guide laboratory procedures and identification. ASCP Press, American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 1987).

Procedimiento

Coloración con hematoxilina de Delafield

- a) Fijar la preparación del sedimento en alcohol etílico 95% caliente (60°C) durante 10-15 minutos.
- b) Escurrir el alcohol y colocar la preparación en hematoxilina de Delafield, en un coplin o en bandeja inclinada, durante 10-15 minutos.
- c) Lavar la preparación en agua corriente.
- d) Diferenciar introduciendo la preparación en solución acuosa al 0.1% ácido clorhídrico durante un minuto.
- e) Agregar algunas gotas de amonio durante 5 minutos. El agua se pondrá de color azulado. Enjuagar en agua corriente 2 minutos.
- f) 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.
- g) Deshidratar en 2 cambios de xilol, 5 minutos por cambio.
- h) Colocar una gota de Permunt y cubrir con cubre-objetos No. 1.
- i) Dejar secar. Examinar al microscopio a 10 X o más.

Reacción

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

FIGURA No. 12

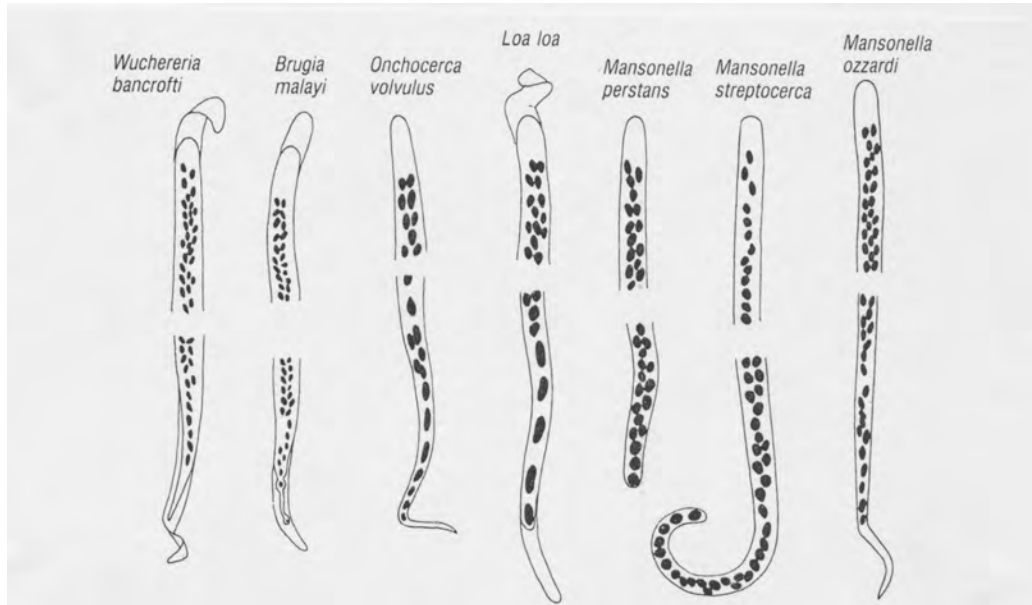


Figura No. 12. Microfiliad de diferentes especies de filaria. (Tomado de: Ash L and Orihel T. Parasites: a guide laboratory procedures and identification. ASCP Press, American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 1987).

Referencia

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

8.2 Diagnóstico microscópico de la malaria

Gota Gruesa y Extendido Fino

Propósito

Colorear parásitos de *Plasmodium* spp. en sangre 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 (densidad parasitaria).

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 densidad parasitaria, 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 de cuatro parásitos/ μL de sangre (100 campos/objetivo de inmersión = $0.25 \mu\text{L}$ de sangre). El extendido fino permite identificar la especie 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. Un microscopista responsable y 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 del colorante es un factor crítico.

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.*

Preparación de soluciones**Coloración de Giemsa. Solución Madre**

- 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.

Buffer o Solución amortiguadora**Solución Alcalina**

- Na_2HPO_4 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.

Solución Ácida

- NaH_2PO_4 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 (KH_2PO_4).

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

Cuadro No. 3. Buffer pH 7.0-7.2, diferentes volúmenes

Solución Ácida (mL)	Solución Alcalina (mL)	Agua Destilada (mL)	Volumen Final (mL)
0.4	0.6	9	10
0.8	1.2	18	20
2.0	3.0	45	50
3.9	6.1	90	100

Coloración de Wright**Preparación de la Solución de Wright**

- Wright en polvo (certificado) 1.5 g
- Alcohol metílico puro, absoluto 485 mL
- Glicerina 15 mL

Mezclar el Wright poco a poco con la glicerina en un mortero, transferir a una botella color ámbar y mezclar con el metanol; usar parte del metanol para lavar todo el colorante en el mortero. 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, identificadas y enumeradas. La solución que está en uso se debe colocar en un frasco con gotero.

Muestra

Sangre periférica del dedo (pinchazo con lanceta) o sangre venosa (con EDTA) son las muestras recomendadas. En el caso de usar sangre anticoagulada, se debe secar a temperatura ambiente por más tiempo (10 minutos adicionales) o intensificar el proceso de secado con calor (superficie a aproximadamente 60°C) para que la muestra no se desprenda de la lámina durante la coloración. Se recomienda preparar en un mismo porta-objetos la gota gruesa y el extendido fino y colorearlos simultáneamente utilizando la coloración de Giemsa.

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 color oscuro, cilindros graduados, cuentas de vidrio
- Soluciones amortiguadoras
- Solución de Giemsa o bien
- Solución de Wright
- Contador manual

Procedimiento

Preparación de la Gota Gruesa y Extendido Fino (serie de fotografías 17.a – 17.f)

- a)** Contar con todos los materiales. 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).
- b)** Seleccionar el dedo donde se hará la punción (se prefiere el tercer dedo de la mano izquierda, talón en caso de niños pequeños o lóbulo de la oreja) y limpiar la yema del dedo del paciente con algodón humedecido con alcohol al 70%. Secar con algodón o gasa seca.
- c)** sostener enérgicamente la yema del dedo (importante en caso de niños) y realizar rápidamente una punción con la lanceta en el borde lateral del dedo.
- d)** Descartar la primera gota de sangre con algodón o gasa seca.
- e)** Se utilizan dos porta-objetos. En el primero de ellos se depositan dos gotas de sangre que se obtiene por presión leve en el dedo.
- f)** Sobre la superficie de trabajo y usando la esquina del segundo porta-objetos preparar la gota gruesa extendiendo una de las gotas de sangre de manera que

forme un rectángulo de grosor uniforme (dimensiones aproximadas: 1.5 x 1.0 cm).

- g) Después de preparar la gota gruesa, realizar un extendido fino (o frotis de sangre periférica) en el mismo porta-objetos con la otra gota de sangre; usar el segundo porta-objetos y colocarlo 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.
- h) Dejar secar la muestra. Cuando el extendido fino se seca, se puede utilizar su extremo grueso para identificar la muestra con un lápiz carbón o de grafito.

Coloración de Giemsa

- i) Elaborar la solución de trabajo: 1 gota de solución de Giemsa por cada 2 mL de solución amortiguadora o 1 mL de solución de Giemsa en 20 mL de solución amortiguadora para colorear unas 10 láminas portaobjeto (~2 mL/lámina). No es posible colorear una gota gruesa con coloración de Wright.
- j) Una vez que la gota gruesa y el extendido fino estén secos, proceder a fijar el extendido fino. Para ello, colocar el porta-objetos en posición vertical en un bloque para secar, con la gota gruesa hacia arriba y el extendido hacia abajo, y con ayuda de una pipeta Pasteur, verter alcohol metílico puro sobre el extendido fino y dejarlo secar nuevamente.
- k) 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 20 minutos.
- l) El exceso de colorante se lava sumergiendo con delicadeza el porta-objetos en un recipiente con agua corriente. Si el agua corriente no es de buena calidad, utilizar agua destilada.
- m) Dejar secar a temperatura ambiente. Observar con aceite de inmersión.

Coloración de Wright

- n) El extendido fino no se fija con metanol, puesto que la solución de Wright contiene suficiente cantidad de metanol para fijar y colorear la muestra simultáneamente. Esta coloración solo es para extendido fino, si se prepara gota gruesa y extendido fino en la misma lamina usar Giemsa.
- o) Agregar la cantidad necesaria de colorante para cubrir la muestra. Colorear por 1-3 minutos (el tiempo óptimo de coloración variará con cada botella de colorante).
- p) Agregar 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.
- q) Lavar agregando suavemente agua corriente con una pizeta. Dejar secar y observar con aceite de inmersión.

Interpretación (microfotografías 18 – 22)

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

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

- Estadíos 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, morado-gris a rosado; plaquetas, rosado intenso a morado; núcleo de leucocitos, azul intenso a morado; gránulos de leucocitos: rosado (neutrófilos), rojo-naranja (eosinófilos) o morado (basófilos).

Gota gruesa. Grosor: de 10 a 20 leucocitos por campo de inmersión. Coloración: fondo de la muestra debe ser claro y azul; puede haber restos de eritrocitos, pero no deben interferir en la lectura; plaquetas y leucocitos, como descritos para el extendido fino; no se debe observar colorante precipitado.

Cálculo de la densidad parasitaria

Este es un cálculo semicuantitativo. Se necesitan los recuentos de leucocitos y/o eritrocitos del paciente. Si los datos del hemograma no están disponibles, se asumen concentraciones constantes de los eritrocitos (5,000,000/ μ L de sangre) y de los leucocitos (8,000/ μ L). Se cuentan y se informan por separado los estadios asexuales y sexuales (gametocitos). 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 (donde se observen uno al lado del otro y no traslapados); contar el número de eritrocitos en un campo. Dividir 10,000 entre el número de eritrocitos contados en el campo y el resultado es el número de campos que se deben examinar. Los eritrocitos infectados por más de un parásito se cuentan como uno.

Ejemplo: 280 eritrocitos/campo, se deben contar 35.7, o sea 36 campos. Si se contaron 160 parásitos de estadio asexual en los 36 campos, calcular así: 160 parásitos / 10,000 eritrocitos \times 100 = 1.6% de densidad parasitaria. Si hay 5,000,000 de eritrocitos/ μ L de sangre, entonces calcular: 1.6% \times 5,000,000/100 = 80,000 parásitos/ μ L 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 el conteo de leucocitos en todo ese último campo).

Si se contaron 82 estadios asexuales y 100 leucocitos se informa: 82 estadios asexuales sanguíneos en 100 Leucocitos. Para calcular la cantidad de parásitos/ μ L de sangre se aplica la siguiente fórmula: parásitos contados en gota gruesa \times 8,000 leucocitos (o el recuento del hemograma) / leucocitos contados en gota gruesa, 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, se redondea a 6,500 parásitos/ μ L de sangre.

Referencias

1. López-Antuñano FJ y G Schmunis, eds. Diagnóstico de Malaria. Organización Panamericana de la Salud 1988; Publicación Científica No. 512.
2. Ash L and T Orihel. Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press, Chicago, 1987.
3. Alger J. Diagnóstico microscópico de la malaria: gota gruesa y extendido fino. Revista Médica Hondureña 1999; 67:216-218.

4. Alger J. Densidad parasitaria en Malaria: métodos de determinación y su interpretación. *Revista Médica Hondureña* 2001; 69:118-120.
5. Palmer CJ, Lindo S, Klaskala wl, Quesada J, Kaminsky R, Baum M and Ager A. Evaluation of optiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36:203-206.
6. World Health Organization 2000.WHO/MAL/2000.1091. New perspectives in malaria diagnosis. World Health Organizatiobn, Geneva, Switzerland.
7. Alger J, Matute ML, Mejía RE. Manual de Procedimientos Operativos Estándar para el Diagnóstico Microscópico de la Malaria. Secretaría de Salud, Tegucigalpa, Honduras. 2006.

8.3 Diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* en Enfermedad de Chagas

Diagnóstico 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 buenas prácticas de laboratorio (guantes, máscara total para la cara de material transparente, anteojos especiales, gabacha, zapatos cerrado, no sandalias; trabajo en campana). Los tripomastigotes son altamente infectantes y algunas cepas del parásito son más virulentas que otras. El tratamiento en fase aguda no es 100% efectivo y no hay tratamiento efectivo para fase crónica.

Opciones para examen microscópico de la sangre

Se puede examinar la sangre por:

1. Gota gruesa
2. Extendido fino
3. Concentración de Strout
4. Preparación de capa de leucocitos

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

Gota gruesa y extendido fino

Muestra requerida

Seguir las mismas indicaciones que para un diagnóstico de malaria, en cuanto a la preparación y coloración de la gota gruesa y extendido fino (Pág. 126). 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 (microfotografía No. 23).

Método de Strout

Muestra requerida

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

Materiales para coloración de Giemsa (capítulo de diagnóstico de Malaria, página 126)

- Pipetas Pasteur
- Bulbo para pipetas
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- Porta objetos limpios
- Centrífuga
- Aplicadores de madera

Procedimiento

- a) 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.
- b) Con una Pipeta Pasteur, pasar el sobrenadante a un tubo de ensayo limpio.
- c) Centrifugar el suero a mayor velocidad (6,000 rpm) por 5-10 minutos para concentrar los parásitos en el sedimento.
- d) 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, ó
 - b. Hacer extendidos en porta-objetos limpios y secos y colorearlos con Giemsa (igual método que para malaria, pág. 126).
- e) Proceder a examinar las coloraciones al microscopio con objetivo de inmersión y buscar formas de tripomastigote.

Preparación de capa de leucocitos: Wintrobe o tubo capilar

Materiales

- Tubo de Wintrobe
- Sangre citratada
- Pipeta capilar para llenar el tubo de Wintrobe
- Porta objetos limpios y secos
- Pipetas Pasteur y bulbo para pipeta
- Batería para coloración de Giemsa coloración de Giemsa para malaria, página 88).
- Centrífuga corriente o microcentrífuga, según el método a realizar.

Procedimiento usando tubo de Wintrobe

- a) Con ayuda de la pipeta llenar el tubo de Wintrobe con la sangre citratada y centrifugar por 30 minutos a 1,000 rpm.
- b) Se formarán 3 capas: la primera, arriba, de plasma; en medio una capa de leucocitos y la tercera, de eritrocitos.
- c) Con una pipeta Pasteur y mano firme, remover la capa de leucocitos del tubo de Wintrobe.
- d) Colocar una gota en un porta-objetos.
- e) Colocar otras dos gotas en otros dos porta-objetos.
- f) Examinar una de ellas en fresco, al microscopio, entre porta-objetos y cubre-objetos para observar tripanosomas móviles.
- g) Extender las otras gotas, dejar secar, fijar con metanol y seguir la coloración con Giemsa.
- h) 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 kinetoplasto voluminoso en el extremo posterior. En regiones donde haya *T. rangeli*, éste se diferencia de *T. cruzi* por tener un kinetoplasto más pequeño colocado un poco antes del extremo posterior y por medir entre 26 y 34 μm .

Procedimiento usando tubo capilar

- a) Cuando se trata de un niño pequeño o cuando se desea una punción capilar, se puede recolectar sangre por punción del dedo, llenando 3 tubos capilares con anticoagulante.
- b) Los tubos se centrifugan en la microcentrífuga a 5,000 rpm durante 10 minutos.
- c) 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 40X. Si hay tripomastigotes, se observará alguna motilidad en esa zona.
- d) 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.
- e) Examinar buscando parásitos móviles usando objetivo 40X e iluminación reducida durante 10 minutos como mínimo.
- f) Hacer un extendido de los leucocitos una vez que se observó en directo.
- g) Dejar secar, fijar en metanol.
- h) 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 kinetoplasto 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 (microfotografía 23).

Nota: *En el Hospital Escuela Universitario 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 capa de eritrocitos (parte inferior) y el plasma (parte superior). Con la capa leucocitaria se hacen extendidos para colorear por Giemsa, también es posible sembrar en medio de cultivo para *T. cruzi*.*

8.4 Métodos más complejos para el diagnóstico de *Trypanosoma cruzi*

A. Xenodiagnóstico para Enfermedad de Chagas

Propósito

Recobrar tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* en infección crónica durante exacerbación y período febril utilizando 40-50 ninfas del 4º. estadio de *Triatoma dimidiata* u otra especie de triatómineo, estériles por *T. cruzi*, cultivadas y mantenidas en el laboratorio. Es un método complejo que requiere 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.

Proceso

El xenodiagnóstico es, unido al cultivo de sangre periférica, tal vez el método más sensible para diagnosticar estadios crónicos de la Enfermedad de Chagas. Requiere del mantenimiento en el laboratorio de una colonia de triatóminos limpios. Recientemente la técnica utiliza 40-50 ninfas (pueden ser otros estadios además del 4º) del vector, distribuidas en 4-5 cajas, las cuales se colocan en el antebrazo del paciente para que se alimenten de sangre. Se completa el proceso al comprobar que la mayoría ha chupado a satisfacción. Se espera un período de 30-60 días después de la alimentación para examinar sus heces o el intestino disectado. Este proceso se ha modificado aun más al sembrar el intestino disectado positivo en un medio LIT (Liver Infusión Tryptose) 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. Es necesario obtener consentimiento informado de los pacientes sometidos a este procedimiento, explicando las características del mismo.

B. Hemocultivo

Este método ofrece otras ventajas sobre el xenodiagnóstico:

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

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, 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. El estadio observado es el epimastigote.

Referencias

- 1.** García L. and Bruckner D. Diagnostic Medical Parasitology 2nd edition, American Society of Microbiology, Washington DC, 1993.
- 2.** Wendel S, Brener Z, Camargo MG y Rassi A. Chagas disease (American Tripanosomiasis): its impact on transfusión and clinical medicine. ISBT Brasil 92, Sao Paulo, Brazil.
- 3.** Genes and Antigens of Parasites. A laboratory manual. C.M. Morel, Editor, 2nd. Ed., Fundação Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brazil, 1984.

8.5 Confirmación parasitológica de Leishmaniasis

Propósito

Es un diagnóstico de certeza donde se evidencia la presencia directa de amastigotes de *Leishmania* en diferente material humano, según la enfermedad; ejemplo: aspirado de médula ósea para leishmaniasis visceral, raspado de lesión para leishmaniasis cutánea. Se pueden utilizar varios métodos, como frote, cultivo y biopsia. Se explicará la técnica para cada uno que se utiliza en el Servicio de Parasitología, Departamento de Laboratorios Clínicos, Hospital Escuela Universitario.

A. Frote

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. Su análisis se hace por coloración y observación microscópica.

Muestra

Se extrae de una incisión del borde de la lesión (lesión cutánea ulcerada), o del centro de la lesión (lesión cutánea no ulcerada), o aspirado de médula ósea o de otros órganos (hepático, ganglionar; en raras ocasiones esplénico) (leishmaniasis visceral); recobrado de pacientes o de material post-mortem. La toma de muestra requiere de personal de laboratorio capacitado.

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 mucocutánea, 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

Preparar de igual manera que para el diagnóstico de malaria (pág. 130).

Solución Amortiguadora pH = 7.0-7.2

Preparar de igual manera que para el diagnóstico de malaria (Pag. 126-130)

Materiales

- Porta-objetos de 3 X 1 pulgada, limpios y secos.
- Bisturí estéril (se recomienda hoja No. 15).
- Algodón o gasa quirúrgica.
- Alcohol al 70% o yodo Povidone (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

Toma de muestra para frote (se requiere el uso de guantes)

- a) Seleccionar la lesión cutánea (ulcerada o no ulcerada) de donde se tomará la muestra. Elegir la lesión con menor tiempo de evolución, de mayor actividad (eritematosa, de bordes elevados, etc.) y con los bordes más indurados. De ser necesario tomar muestra de varias lesiones.
- b) Limpiar el área elegida con algodón o gasa y etanol al 70%. Dejar secar.
- c) Con los dedos índice y pulgar hacer presión en el borde de la lesión y realizar una pequeña incisión por fuera del borde externo de la ulcera o por el centro de la lesión en lesión cutánea no ulcerada.
- d) Extraer de la dermis tejido inflamado y esparcirlo suavemente sobre la lámina porta-objetos. Si hay sangrado excesivo, se recomienda absorber la sangre en una gasa, teniendo cuidado de no perder el material extraído.
- e) Cuando se trata de una médula ósea, el médico extiende el aspirado en varios porta-objetos, como si fuera extendido fino para malaria.
- f) Si es un fragmento de tejido-biopsia, el médico realiza 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.

Coloración

- g) Fijar la muestra depositando metanol puro directamente sobre el preparado colocando la lámina verticalmente. Dejar secar.
- h) Colorear con la solución de Giemsa (igual que para el diagnóstico de malaria, pag. 126-130). Si es una muestra de medula ósea preparar solución de trabajo de Giemsa 1:50 y colorear durante una hora.
- i) Enjuagar suavemente.
- j) Dejar secar y observar al microscopio con aceite de inmersión.

Proceder a examinar las coloraciones al microscopio con objetivo de inmersión y buscar amastigotes de *Leishmania* spp. en toda la lámina, intracelulares en macrófagos o libres.

Interpretación

Parásitos: Los amastigotes de *Leishmania* spp. son cuerpos ovoides que miden entre 2-3 μm de ancho por 1-1.5 μm de largo; pueden estar intracelulares (macrófagos, monocitos, histiocitos) o extracelulares; su característica tintorial es un citoplasma vacuolado levemente azul, un núcleo y un cinetoplasto, ambos de color púrpura. La visualización de ambos elementos es la clave en la diferenciación con otros organismos, levaduras, etc.

B. Cultivo

Propósito

Aislar los parásitos en un medio de cultivo artificial, preparado en el laboratorio, para aumentar la sensibilidad del diagnóstico de leishmaniasis. El estadio observado es el promastigote.

Ventajas

Es más sensible que el frote, pues permite la reproducción de los promastigotes 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 *L. 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 Senekjie.

Preparación de medios de cultivo

Tener acceso a

- Autoclave
- Mechero
- Incubadora a 25°C ± 2°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

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 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. Guardar en refrigeración a 4°C hasta el momento de usar.

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

Medio de Senekjie (Seneca)

- 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	10-15 mL

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 No. 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 y guardar en refrigeración hasta tener lista la sangre de conejo.

Para adicionar la sangre de conejo, fundir el medio sólido en baño María y dejar enfriar a 45-50°C. Agregar en condiciones asépticas la sangre defibrinada de conejo, mezclar y servir 2-3 mL en cada uno de los tubos estériles; dejar inclinados 2 horas al medio ambiente y luego guardar en refrigeración, rotular.

***Nota** La sangre de conejo se utiliza en el medio a una proporción de 10-15%.

Solución de Locke

- Cloruro de sodio	8.0 g
- Cloruro de calcio	0.2 g
- Cloruro de potasio	0.2 g
- Cloruro de magnesio	0.01 g
- Fosfato dibásico de sodio	2.0g
- 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.

Al momento de utilizar, agregar a esta solución los antibióticos a una concentración final de 100 Unidades Internacionales (UI) de Penicilina y 100 µg de Estreptomicina. Agregar a los tubos con agar sangre, la cantidad necesaria de Solución de Locke (1-1.5 mL) en forma aséptica.

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 Streptomycim (base) 10 mg/mL (Gibso 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 µg Estreptomicina/mL. Guardar en congelación debidamente rotulados.

Solución salina fisiológica con antibiótico (P/S)

Solución salina fisiológica (NaCl 0.85%) estéril se le agrega 200 Unidades de Penicilina y 200 µg de Estreptomicina por 1 mL, en viales esteriles (1mL/vial). Se mantienen congelados hasta su uso (uno por cultivo).

Materiales

- Solución salina fisiológica con antibiótico
- Tubos con medio NNN o medio de Senekjie (fase solida mas sangre y fase liquida)
- 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 lesión cutánea

- a) Después de la toma de muestra para frote de lesión cutánea, introducir la jeringa de 1 mL con aguja calibre 26 3/8 mm, que contiene 0.1 mL de solución salina mas antibiótico (P/S), en la incisión. Hacer girar la jeringa 2-3 veces por lado (izquierda y derecha) aspirando y sin introducir líquido. Retirar lentamente aspirando material de la lesión, evitando obtener sangre.
- b) El material aspirado se mezcla con la solución salina moviendo el émbolo hacia arriba y abajo.
- c) Se inoculan los frascos con medio de cultivo bajo condiciones aseptivas, con precauciones para evitar contaminaciones bacterianas (flameando el tubo de cultivo que se mantiene casi horizontal).
- d) Incubar los cultivos a 25°C ±2°C.

Otras muestras

El medio de cultivo 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 tubos de medio que se guardan a 26° C ± 2°C en una gradilla, debidamente rotulados.

Examen del cultivo

El líquido en el fondo del tubo de cultivo debe revisarse 1-2 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

En coloraciones de cultivos, se observan promastigotes, alargados como huso, 15-25 µm por 1.5-3.5 µm, con un flagelo corto, núcleo más o menos central color rojo y un kinetoplasto en la base del flagelo, color rojo intenso.

Referencias

1. Ash L. and Orihel T. Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press, American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 1987.
2. Weigle KA, Dávalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia N, and D'Alessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36:489-496.
3. Escobar M, Martínez F, Scott Smith D, Palma G. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (tequimentary): a diagnostic challenge. *Tropical Doctor* 1992; 22(Suppl.1): 69-78; 63-4.
4. Miranda MC, Prager M, Rodríguez I, Pacheco R. Manual de normas y procedimientos para la atención de la leishmaniasis en los municipios del Valle del Cauca. Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM). Segunda Edición. Cali, Colombia. 2007.

8.6 Estimación de la densidad parasitaria de amastigotes en frotos de material esplénico aspirado

Propósito

Aumentar la sensibilidad de la detección de los 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, 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 126-132).

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.

PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO (PDR)

- 9.1** IMMUNOCARD STAT! CRYPTO/GIARDIA.
- 9.2** PRUEBA DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO (PDR) PARA MALARIA.
- 9.3** PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO PARA LA ENFERMEDAD CHAGAS Y MÉTODO INDIRECTO POR SEROLOGÍA.
- 9.4** PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO Y SEROLOGÍA PARA LEISHMANIASIS.

9.1 Prueba Rápida ImmunoCard STAT! Crypto/Giardia

Propósito

La Prueba Rápida ImmunoCard STAT! Crypto/Giardia es un inmunoensayo rápido para la detección cualitativa de antígenos específicos de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en extractos acuosos de muestras de heces del humano. Según el folleto adjunto con información sobre esta prueba, la sensibilidad para detectar antígenos de *Cryptosporidium* fue de 97.3% (IC: 85.8%-100%) y una especificidad del 100% (IC: 96.6%-100%). Para los antígenos de *Giardia* la sensibilidad fue del 100% (IC: 89.4%-100%) y una especificidad del 100% (IC: 96.7%-100%). Hacen la observación de que no se hizo una correlación entre los resultados de la prueba con la presencia o ausencia de enfermedad.

Nota: Todas las muestras de heces, irrespectivamente de su consistencia, deben diluirse 1:4 y utilizar el sobrenadante para la prueba.

El estuche consiste de 30 pruebas, conteniendo buffer, dos diferentes reactivos conjugado, pipetas marcadas a un nivel para transferencia del sobrenadante de heces, tubos para la dilución de la muestra y las tarjetas plásticas para realizar la prueba. Requiere un tiempo de preparación, pero la reacción demora 10 minutos solamente y no requiere de aparatos para su lectura. Las líneas de positividad son fáciles de ver. El estuche trae instrucciones escritas en varios idiomas.

Ventajas

Detecta antígenos de ambos protozoos, lo cual indica infección presente. Se encontró 100% reproducible. No requiere de otro equipo de laboratorio más que recipientes para recoger la muestra de heces y un medio de transporte recomendado para las muestras, que puede ser formalina al 10%, medio de transporte Cary-Blair, MIF y la necesidad de un cronómetro.

Desventajas

Los resultados de la prueba deben ser interpretados por el clínico junto con los datos que presenta el paciente. No hay correlación directa entre intensidad de la banda con la gravedad de la infección. Los valores de la prueba fueron comparados con la prevalencia de estas infecciones en países desarrollados, donde las incidencias de giardiasis y criptosporidiasis varían entre 2%, 5% para *Giardia* y 1%, 3% para *Cryptosporidium*. Será necesario probar este estuche en poblaciones que tienen mayores porcentajes de prevalencia.

Referencia

IVD In Vitro Diagnostic Medical Device, Número de Catálogo 750830.

9.2 Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR) para malaria

El diagnóstico de malaria debe ser basado en la detección del parásito mediante pruebas de laboratorio, siendo la microscopía por gota gruesa el estándar de oro por su alta sensibilidad con un umbral teórico de detección de 4 parásitos / μ L de sangre (100 campos = \sim 0.25 μ L). Las Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR) son un apoyo para el diagnóstico de malaria mediante la detección inmunocromatográfica de antígenos (proteínas) del parásito en lugares donde el diagnóstico microscópico de calidad no está disponible o cuando hay necesidad de un diagnóstico rápido para iniciar tratamiento. Tienen las ventajas de ofrecer resultados en aproximadamente 15 minutos, no requieren de equipo especial ni de electricidad, pueden detectar *P. falciparum*, aún cuando el parásito se encuentre citoadherido en la microvasculatura, facilitan el adiestramiento del personal en pocas horas, aún aquel voluntario, y son fáciles de ejecutar.

La sensibilidad es uniforme y alta (>90%) en presencia de infecciones con alta densidad parasitaria (2000-5000 parásitos/ μ L), pero la sensibilidad es variable en densidades bajas (<200 parásitos/ μ L). La mayoría de las PDR se basan en la detección del antígeno HRP2 (Histidine Rich Protein 2) específico de *P. falciparum*, pLDH (*Plasmodium* Lactate Dehydrogenase) específica de *P. vivax* y pLDH o pAldolase específico para las cuatro especies de *Plasmodium*. Algunas solo detectan *P. falciparum* y otras detectan una o más de las otras especies que infectan al humano (*P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*).

La decisión de escoger otras opciones de diagnóstico, diferentes de la microscopía, dependerán de condiciones endémicas, geográficas, económicas, de infraestructura (almacenamiento y transporte) y la accesibilidad de los diferentes métodos. Las PDR vienen en estuches comerciales cuyo costo oscila entre US\$1.50–3.00 por cada prueba y básicamente consisten de:

- a) Anticuerpo específico marcado con un fluorocromo en una cinta de nitrocelulosa.
- b) El anticuerpo marcado se une a los antígenos del parásito presentes en sangre del paciente.
- c) El complejo antígeno-anticuerpo es arrastrado por toda la cinta y es capturado por anticuerpos monoclonales adsorbidos en el otro extremo de la cinta, formando una banda de color visible.

Esto se ejemplariza en la Figura No. 13.

FIGURA No. 13

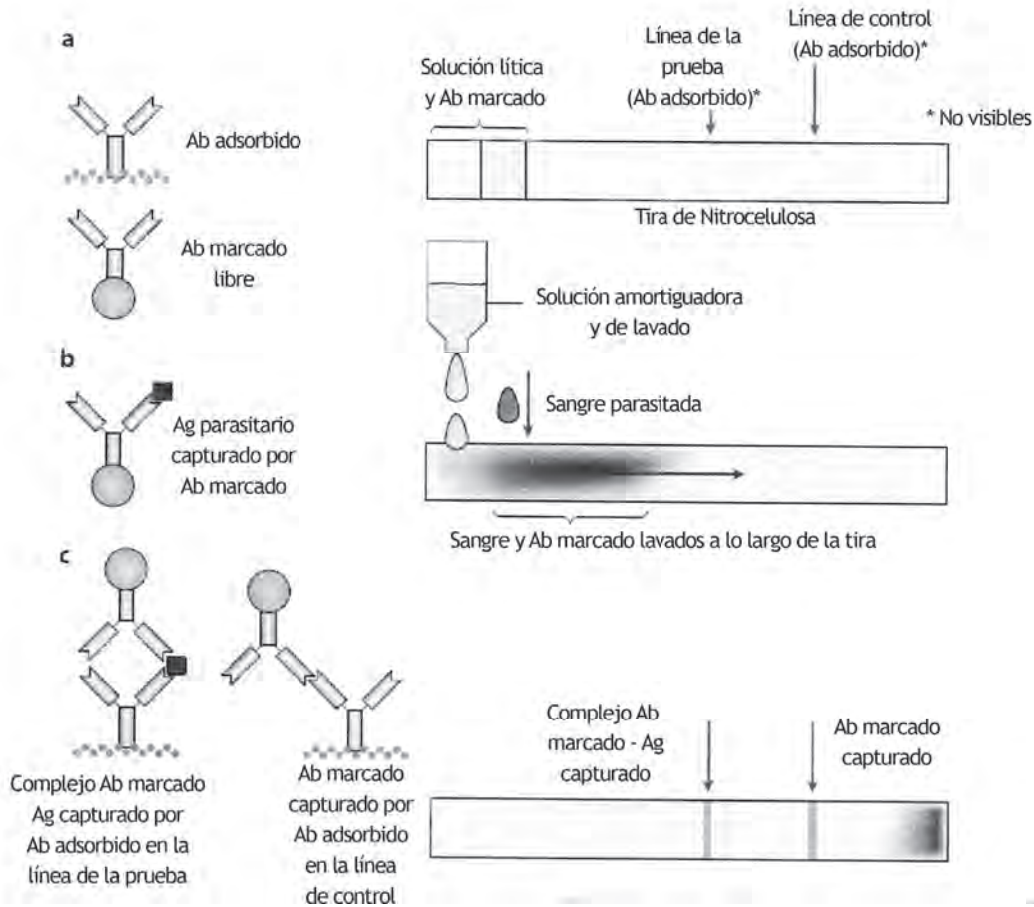


Figura No. 13. Modo de acción de las Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR) de malaria más comunes. Fuente: World Health Organization. Malaria Rapid Diagnostic Test Performance Results of WHO product testing of malaria RDTs: 4 (2012) (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77748/1/9789241504720_eng.pdf) acceso septiembre 2013.

- a)** Anticuerpo (Ab) marcado con colorante, específico para el antígeno (Ag) blanco, está presente en el extremo inferior de la tira nitrocelulosa o en el pozo provisto con la tira. Anticuerpo, también específico para el antígeno blanco, está adsorbido a la tira en una línea fina (prueba) y cualquier anticuerpo específico para el anticuerpo marcado, o antígeno, está adsorbido.
- b)** Sangre y solución amortiguadora, que han sido colocadas en la tira o en el pozo, se mezclan con el anticuerpo marcado y son succionados hacia un extremo de la tira atravesando las líneas de la prueba y del control, donde el anticuerpo está adsorbido.
- c)** Si el antígeno está presente, parte del anticuerpo marcado quedará atrapado en la línea de la prueba. Otra parte del anticuerpo marcado quedará atrapado en la línea de control.

Aparte de su baja sensibilidad en bajas densidades parasitarias, las PDR tienen otras desventajas:

- a)** El no reconocimiento de gametocitos de *Plasmodium* por medio de las tiras reactivas tiene un significado clínico y epidemiológico importante y requiere de interpretación.
- b)** No ofrecen estimación de la densidad parasitaria.
- c)** La persistencia de antígenos aun cuando ya desapareció la parasitemia periférica, en algunos casos reduce su utilidad para poder monitorear la respuesta a drogas.
- f)** Una PDR negativa exige una confirmación microscópica.
- g)** Su costo es más elevado que la microscopía.

Las PDR han mostrado utilidad en ciertas situaciones:

- 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.
- Se pueden utilizar cuando en una región existe resistencia a drogas y éstas deben ser utilizadas o hacer combinaciones de las mismas, siendo más costosas que las pruebas diagnósticas.
- El diagnóstico y tratamiento tempranos son importantes 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 PDR 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.

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.

- a)** Algunos, como el QBC, que utiliza fluorocromos como naranja de acridina en extendidos o en capilares con sangre, es muy costoso y requiere de equipo especial.
- b)** 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.
- c)** La detección de anticuerpos por métodos serológicos mide únicamente la presencia de anticuerpos de exposiciones anteriores, pero que no indican una infección actual.

Referencias

1. López-Antuñano FJ y G Schmunis, eds. Diagnóstico de Malaria. Organización Panamericana de la Salud 1988; Publicación Científica No. 512.
2. Ash L and T Orihel. Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press, Chicago, 1987.
3. Alger J. Diagnóstico microscópico de la malaria: gota gruesa y extendido fino. Revista Médica Hondureña 1999; 67:216-218.
4. Alger J. Densidad parasitaria en Malaria: métodos de determinación y su interpretación. Revista Médica Hondureña 2001; 69:118-120.
5. 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.
6. World Health Organization 2000. WHO/MAL/2000.1091. New perspectives in malaria diagnosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
7. Instituto de Enfermedades Infecciosas y Parasitología Antonio Vidal. Manual de Manejo de Enfermedades Parasitarias Prioritarias en Honduras. Instituto Antonio Vidal; Organización Panamericana de la Salud. Segunda Edición; Tegucigalpa, Honduras. 2009.
8. World Health Organization (WHO). Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: 4 (2012). World Health Organization; Foundation for Innovative new diagnostics (FIND); Control Disease Center (CDC); Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR). 2012.

9.3 Pruebas de Diagnóstico Rápido para la Enfermedad Chagas y método indirecto por serología

Propósito

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 (o Serología)

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 (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayo inmunoenzimático (ELISA); pero existen otras aceptadas. Se ha considerado que un resultado positivo en más de una de estas pruebas equivale a un diagnóstico definitivo; sin embargo, en la actualidad una sola prueba de IFI o ELISA positiva puede ser suficiente debido a su alta sensibilidad y especificidad por el uso reciente de combinaciones de proteínas o péptidos recombinantes de epimastigotes y tripomastigotes.

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).

Pruebas de diagnóstico rápido (PDR)

Estas pruebas se fundamentan en la detección inmunocromatográfica de anticuerpos anti-*T. cruzi* presentes en sangre total, suero o plasma. Generalmente consisten en:

1. Una combinación de antígenos recombinantes adsorbidos a la membrana y una proteína específica conjugada con un fluorocromo.
2. La proteína se une a los anticuerpos presentes en la muestra del paciente.
3. El complejo anticuerpo-proteína es capturado por los antígenos recombinantes.
4. Se lee una reacción de color, generalmente en 15 minutos.

Es necesario confirmar un resultado de PDR con una prueba confirmatoria, como ELISA. Aunque se ha visto que el desempeño de las PDR es variable, hay estudios donde se reporta una concordancia de 98% entre PDR y ELISA.

Referencias

1. García L and Bruckner D. Diagnostic Medical Parasitology 2nd edition, American Society of Microbiology, Washington DC, 1993.
2. Wendel S, Brener Z, Camargo MG. y Rassi A. Chagas disease (American Tripanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brasil 92, Sao Paulo, Brazil.
3. Genes and Antigens of Parasites. A laboratory manual. C.M. Morel, Editor, 2nd. Ed., Fundacao Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brazil, 1984.
4. Organización Mundial de la Salud. Control de la enfermedad de Chagas. Segundo informe del comité de expertos de la OMS. Ginebra, OMS; 2002. Serie de informes Técnicos 905.
5. Instituto de Enfermedades Infecciosas y Parasitología Antonio Vidal. Manual de Manejo de Enfermedades Parasitarias Prioritarias en Honduras. Instituto Antonio Vidal; Organización Panamericana de la Salud. Segunda Edicion; Tegucigalpa, Honduras. 2009
6. Sosa-Estani S, Gamboa-León MR, del Cid-Lemus J, Althabe F, Alger J, Almendares O, et al. Short Report: Use of a Rapid Test on Umbilical Cord Blood to Screen for *Trypanosoma cruzi* Infection in Pregnant Women in Argentina, Bolivia, Honduras, and México. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008; 79(5):755–759

9.4 Pruebas de Diagnóstico Rápido y serología para leishmaniasis

El diagnóstico laboratorial de leishmaniasis se realiza identificando amastigotes intra o extracelulares coloreados con Giemsa o Wright o mediante el aislamiento en cultivo. Hay varias pruebas serológicas que han sido evaluadas con resultados variables, pero generalmente presentan una serie de inconvenientes ya que permanecen positivas meses después de la cura y no todas permiten diferenciar entre una infección actual y una infección pasada.

Hay varias pruebas serológicas, pero no se recomiendan como única prueba de diagnóstico debido a su baja sensibilidad y especificidad:

- Aglutinación Directa: con una sensibilidad de 70-100% y especificidad de 90-100%, es el primer test serológico usado para leishmaniasis visceral (LV).
- ELISA: es el más ampliamente usado para LV y tiene una sensibilidad de 80-100%; sin embargo, hay reacciones cruzadas con tripanosomiasis, tuberculosis y toxoplasmosis.

Los prototipos de las PDR han sido evaluados para diagnóstico de LV en diferentes regiones con sensibilidad de 99-100% y especificidad de 95-100%. Generalmente las pruebas que usan el antígeno rK39 son recomendadas para diagnóstico de LV y ofrecen un método de diagnóstico en lugares remotos. Básicamente consisten en:

1. Antígeno recombinante y una proteína específica conjugada con un fluorocromo adsorbidos en una membrana.
2. La proteína específica se une a los anticuerpos anti-Leishmania de la muestra de un paciente con LV.
3. El complejo proteína-anticuerpo es capturado por los antígenos recombinantes y se forma una banda de color.
4. La lectura se realiza entre 10-20 minutos.

Referencias

1. World Health Organization. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. WHO; 2012. Serie de informes Técnicos: 975.
2. Instituto de Enfermedades Infecciosas y Parasitología Antonio Vidal. Manual de Manejo de Enfermedades Parasitarias Prioritarias en Honduras. Instituto Antonio Vidal; Organización Panamericana de la Salud. Segunda Edición; Tegucigalpa, Honduras. 2009.

FOTOGRAFÍAS Y MICROFOTOGRAFÍAS

MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

DESCRIPCION DE LAS FOTOGRAFIAS

1. *Ascaris lumbricoides*, huevos fértiles en su mayoría; *Trichuris trichiura*, un huevo (flecha). Método de Kato-Katz. El frote grueso aclarado con una mezcla de glicerina y agua aclaró las heces y destacó los huevos, fáciles de reconocer y contar. 100X. Original Kaminsky RG.
2. *Ascaris lumbricoides*, huevo fértil (a); *Taenia* spp., huevo (b). El huevo de *A. lumbricoides* (a) no muestra la cubierta mamilonada; se pueden observar los ganchos de la oncósfera en el huevo embrionado de *Taenia* (b). Al escribir el resultado, se dice: "huevos de *Taenia* spp." y se coloca una nota diciendo: "se considera *T. solium* mientras no se confirme lo contrario" y se solicita que el paciente envíe proglótidos o que se envíe al laboratorio el parásito recobrado después de tratamiento, según estipulado por la OMS. 400X. Original Kaminsky RG.
3. *Trichuris trichiura*, huevo (a); uncinaria del humano, huevo (b); quistes de diferentes especies de protozoos (c). Sedimento recobrado por el método de la formalina acetato de etilo. Para identificar los quistes de protozoos, debe colorear temporalmente la preparación con solución de Lugol y diferenciar núcleo e inclusiones citoplásmicas. El multiparasitismo es común en individuos infectados en Honduras. 400X Original, Kaminsky RG.
4. *Necator americanus*, larva filariforme, entre 5-8 día en el ambiente. Se muestran los extremos de la larva, el anterior de cápsula bucal grande (a) y la extremidad posterior muy fina (b). Compare esta morfología con la microfotografía No. 5 de *S. stercoralis* y con la No. 6, larva infectante de *A. costaricensis*. 400X. Original Kaminsky RG.
5. *Strongyloides stercoralis*, larva rabdiforme recobrada de una muestra de heces y coloreada levemente con solución de Lugol para destacar morfología diferencial: primordio genital grande (flecha larga) y cápsula bocal corta (flecha corta). Pacientes con estrongiloidiasis pueden presentar eosinofilias entre 10%-70%. 400X, original Kaminsky RG.
6. *Angiostrongylus costaricensis*, larva L3 infectante. La larva fue recobrada por digestión artificial de babosas, recolectadas en el campo. Las características morfológicas más sobresalientes son: dos rabdiones en la región cefálica (flecha gruesa) y la muesca o indentación en la parte subterminal (flecha fina). 400X. Original. Kaminsky RG.
7. *Schistosoma mansoni*, huevo con miracidio en su interior y una espícula prominente en la parte inferior derecha, preparación en solución salina. Miden 114 - 175 μm x 45 - 70 μm (reproducido de Medios auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales 1994, con permiso de la Organización Mundial de la Salud).
8. *Schistosoma mansoni*, huevo; se observa la espícula prominente en la parte inferior izquierda; preparación con método de Kato (reproducido de Medios auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales 1994, con permiso de la Organización Mundial de la Salud).

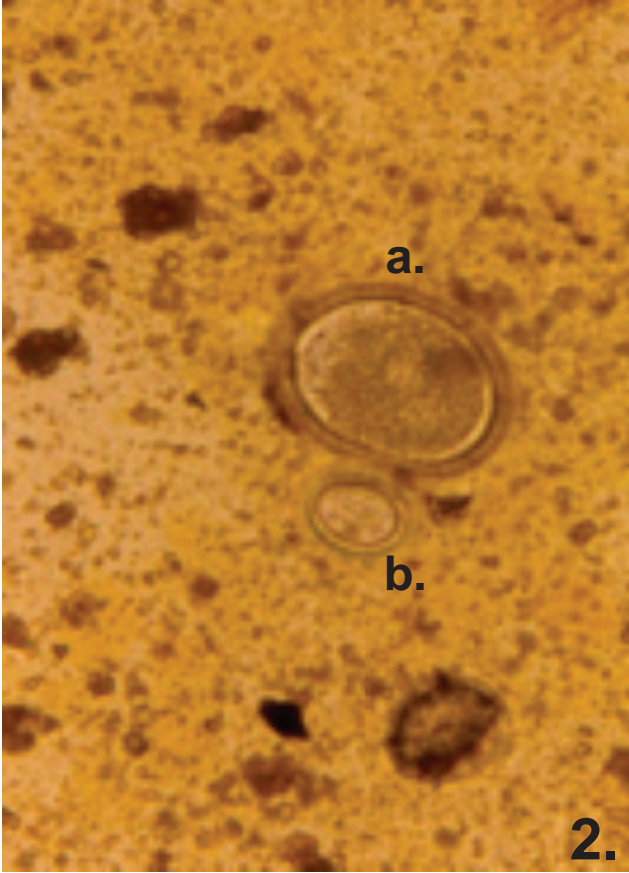
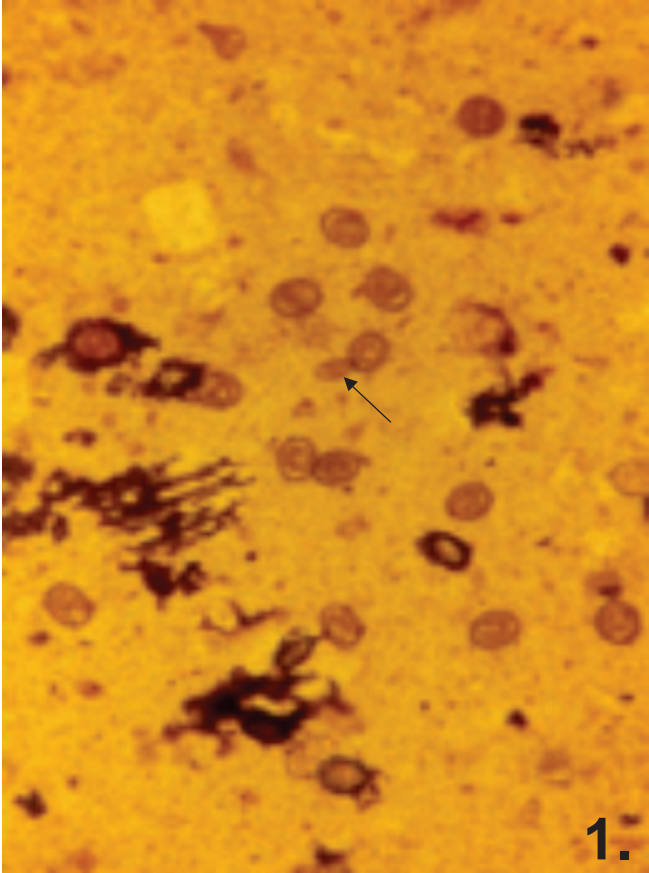
9. *Fasciola hepatica*, huevo de tremátodo con opérculo poco visible; preparación en solución salina. Los huevos salen no embrionados en las heces y miden 130 - 150 μm x 63 - 90 μm (reproducido de Medios auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales 1994, con permiso de la Organización Mundial de la Salud).
10. *Paragonimus westermani*, huevo de tremátodo con opérculo prominente y un engrosamiento de la cubierta en el extremo aboperculado. Puede encontrarlos en heces o esputo de personas infectadas y miden 80- 120 μm x 45 - 70 μm (reproducido de Medios auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales 1994, con permiso de la Organización Mundial de la Salud).
11. *Diphyllobothrium latum*, huevo. Este céstodo presenta huevos operculados y no están embrionados al salir en las heces. En el extremo aboperculado pueden presentar un pequeño nudo o protuberancia. Sus medidas son 58 - 75 μm x 45 - 50 μm (reproducido de Medios auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales 1994, con permiso de la Organización Mundial de la Salud).
12. *Taenia* spp. huevo idéntico para ambas especies de *T. saginata* y *T. solium*. Cada huevo contiene un embrión u oncosfera con seis ganchos, visibles en esta microfotografía. Miden entre 35 - 43 μm (reproducido de Medios auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales 1994, con permiso de la Organización Mundial de la Salud).
13. *Isospora belli*, ooquiste en un examen directo de heces frescas. La pared del ooquiste es fina y rígida y presenta un esporoblasto en su interior. Esta forma no es infectante. La esporulación ocurre en 2-3 días en el ambiente. En Honduras, el hallazgo de estos ooquistes en heces de cualquier paciente, obliga de agregar al resultado del laboratorio: "investigar causa de probable inmunocompromiso". 1000X. Original Kaminsky RG.
14. *Isospora belli*, ooquistes coloreados con el método ácido resistente modificado. 400X. Original Kaminsky RG.
15. *Cryptosporidium* spp, ooquistes teñidos con el método ácido resistente modificado. Los ooquistes miden entre 4 a 6 μm y en uno de ellos (flecha fina) pueden observarse los esporozoitos en su interior. Este parásito es común en niños menores de un año y en pacientes con algún inmunocompromiso en Honduras. 1000X. Original Kaminsky RG.
16. *Cyclospora cayetanensis*, ooquistes coloreados de rojo intenso sobre fondo azul con el método ácido resistente modificado. Miden entre 8 a 10 μm y en el Hospital Escuela Universitario son de diagnóstico frecuente entre los meses de mayo a julio de cada año. 1000X. Original Kaminsky RG.
17. Serie de fotografías mostrando por pasos la toma de muestra por punción dactilar para gota gruesa y extendido fino (a-f). Original, Servicio Parasitología, HEU.
 - a) Seleccionar el dedo anular y limpiar el área con una solución desinfectante. Original, Servicio Parasitología, HEU.

- b) y c) Sostener el dedo fuertemente y realizar rápidamente una punción en el borde lateral del dedo con una lanceta. Original, Servicio Parasitología, HEU.
- d) Descartar la primera gota de sangre utilizando algodón o gasa seca. Original, Servicio Parasitología, HEU.
- e) Presionando el dedo, dejar caer libremente dos gotas de sangre sobre una lámina portaobjetos. Original, Servicio Parasitología, HEU.
- f) Con otra lámina portaobjetos, hacer un extendido fino (o frotis de sangre periférica) con una gota de sangre y con la esquina de la misma lámina distribuir la otra gota de sangre para formar un rectángulo de grosor uniforme con dimensiones aproximadas de 1.5 x 1.0 cm. Original, Servicio Parasitología, HEU.
- 18.** *Plasmodium falciparum*, trofozoítos jóvenes (anillos) y gametocitos. Gota Gruesa coloreada con Giemsa (x1000). Se observan numerosas formas en anillo en todo el campo. La flecha señala un gametocito. Barra= 5 µm. Original, Servicio Parasitología, HEU.
- 19.** *Plasmodium falciparum*, gametocito. Extendido fino coloreado con Giemsa (x2000). Se observa pigmento malárico grueso en una masa en el centro del gametocito. Barra= 5 µm. Original, Servicio Parasitología, HEU.
- 20.** *Plasmodium vivax*, trofozoítos maduros intracelulares en eritrocitos. Extendido fino coloreado con Giemsa (x2000). Ambos eritrocitos parasitados están agrandados y deformados. En uno de los eritrocitos se observan dos trofozoítos. Se observan gránulos de Schüffner. Barra= 5 µm. Original, Servicio Parasitología, HEU.
- 21.** *Plasmodium vivax*, trofozoítos en anillo. Gota Gruesa coloreada con Giemsa (x2000). Observe el citoplasma ameboide con una vacuola. Barra= 5 µm. Se observa un neutrófilo (a). J Alger y Colaboradores. Servicio de Parasitología, Departamento de Laboratorios Clínicos, Hospital Escuela Universitario, Tegucigalpa, Honduras.
- 22.** Infección mixta con *Plasmodium vivax* y *P. falciparum*. Gota Gruesa coloreada con Giemsa (x2000). En el campo se observa un trofozoíto maduro de *P. vivax* (a) y un gametocito de *P. falciparum* (b). Barra= 5 µm. Original, Servicio Parasitología, HEU.
- 23.** *Trypanosoma cruzi*, tripomastigote sanguíneo. Extendido fino coloreado con Giemsa. Fuente: Center for Disease Control (CDC) http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.htm

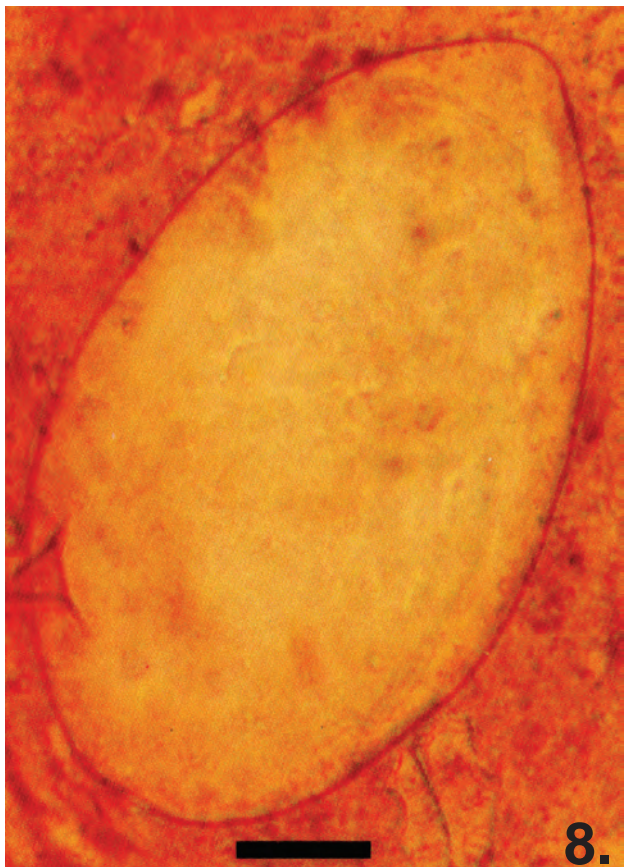
MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

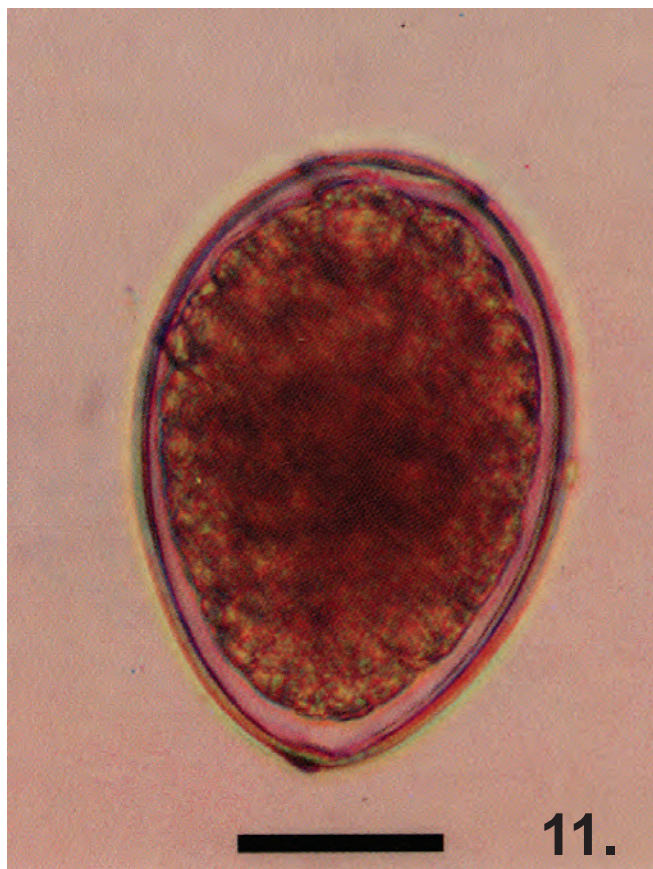
- 24.** Método de migración en Agar o de Koga para larvas de *Strongyloides stercoralis*. (contraportada).
- 25.** *Strongyloides stercoralis*, larvas vistas al microscopio estereoscópico para observar los caminos en el medio de agar. Para asegurar la especie debe recobrar las larvas e identificarlas específicamente (contraportada)..
- 26.** *Leishmania* spp. amastigote. Frote de lesión cutánea coloreado con Giemsa (x2000). Barra= 5 µm. El amastigote es ovalado y en su interior se observa el núcleo (a) y el kinetoplasto (b). J Alger y Colaboradores. Servicio de Parasitología, Departamento de Laboratorios Clínicos, Hospital Escuela, Tegucigalpa, Honduras (contraportada).

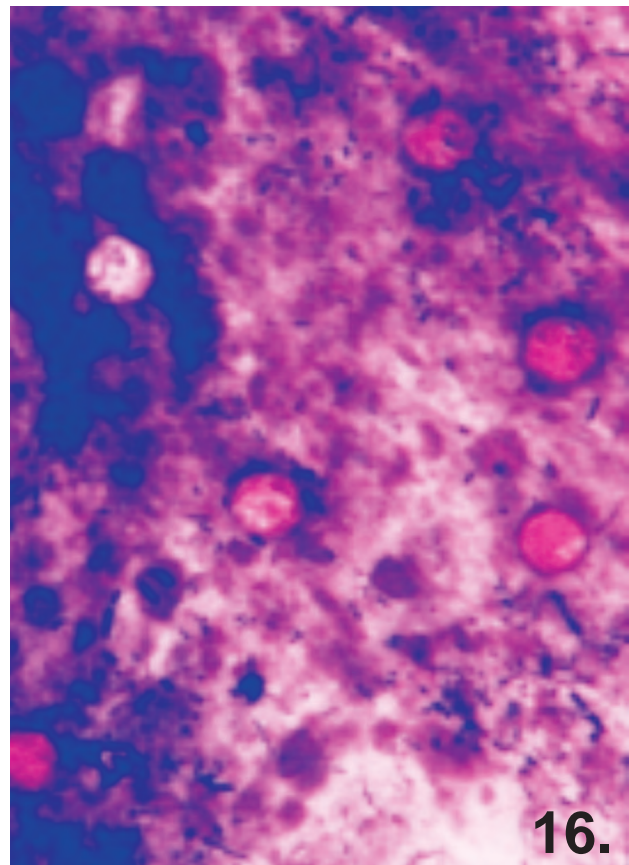
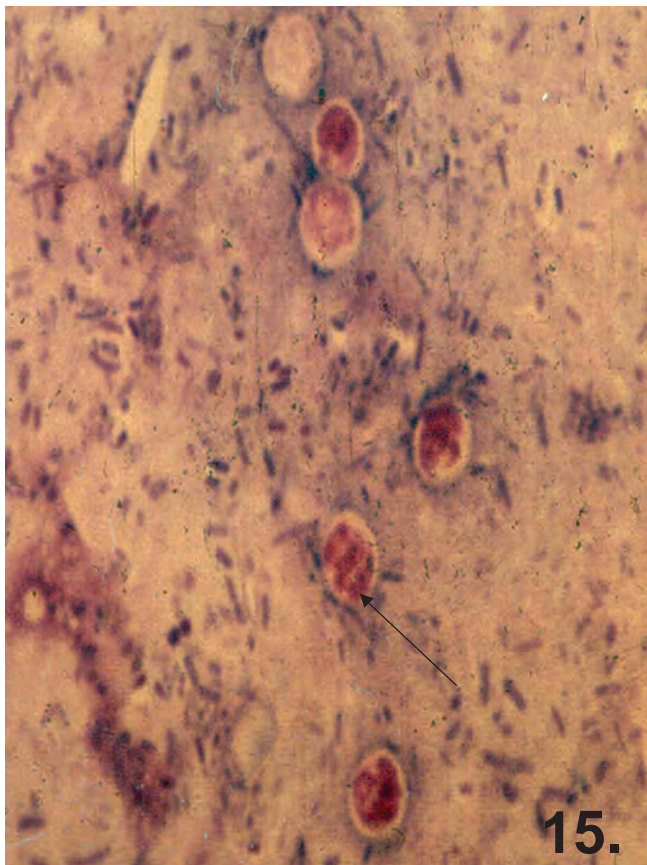
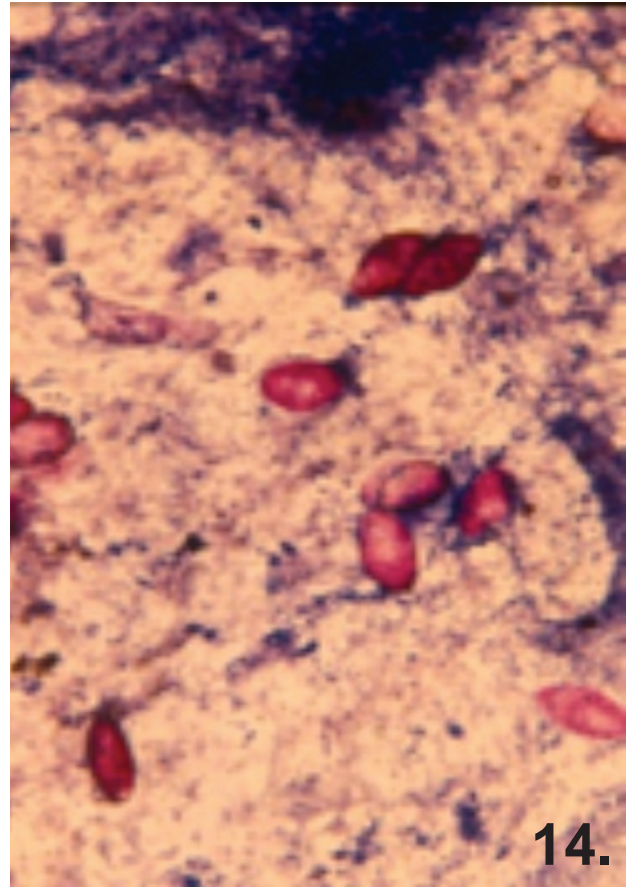


Nota: Todas las indicaciones de escala = 25 μ m

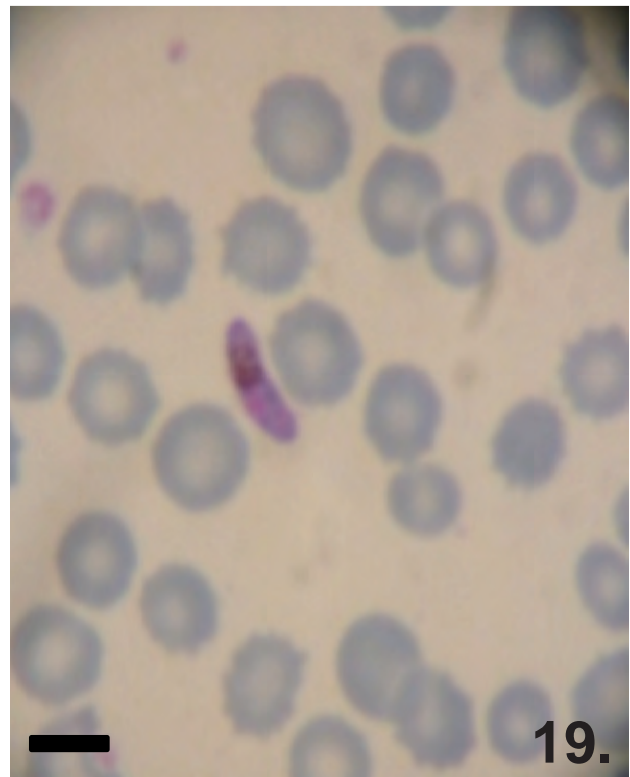
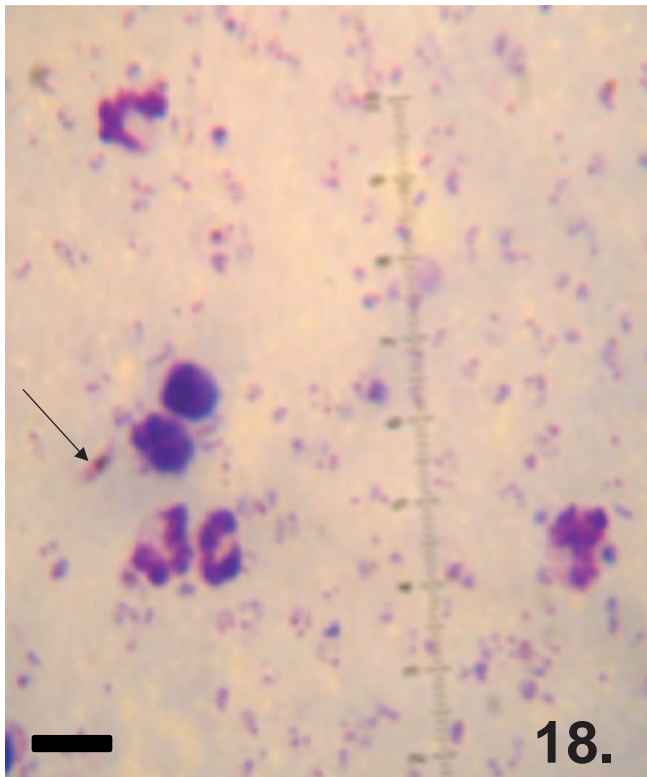
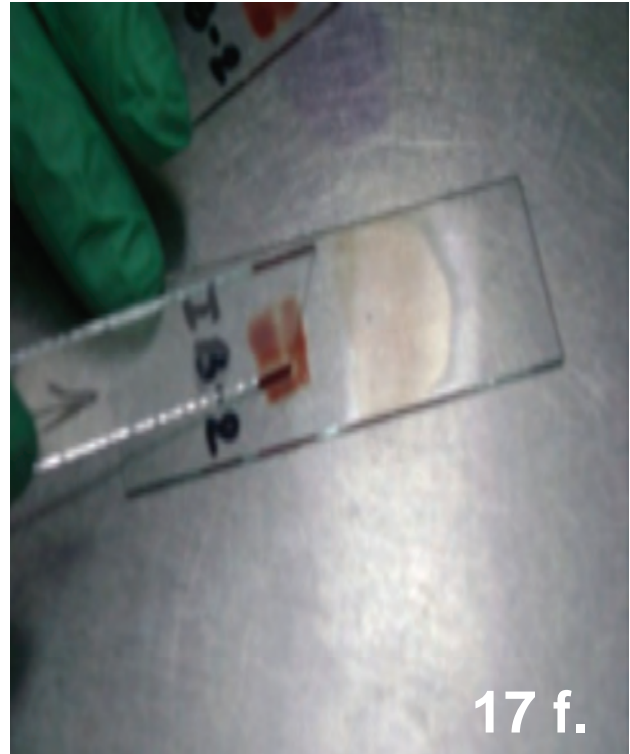


Nota: Todas las indicaciones de escala = 25 μ m

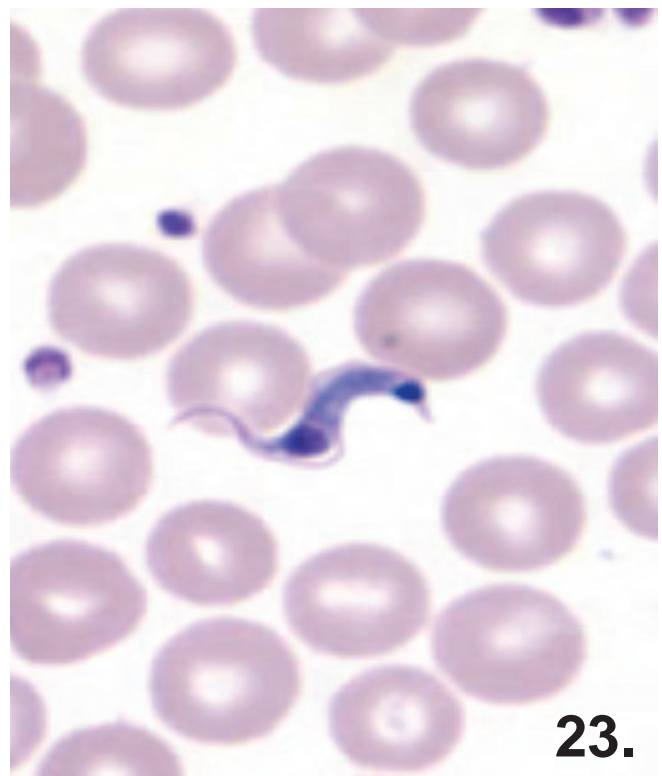
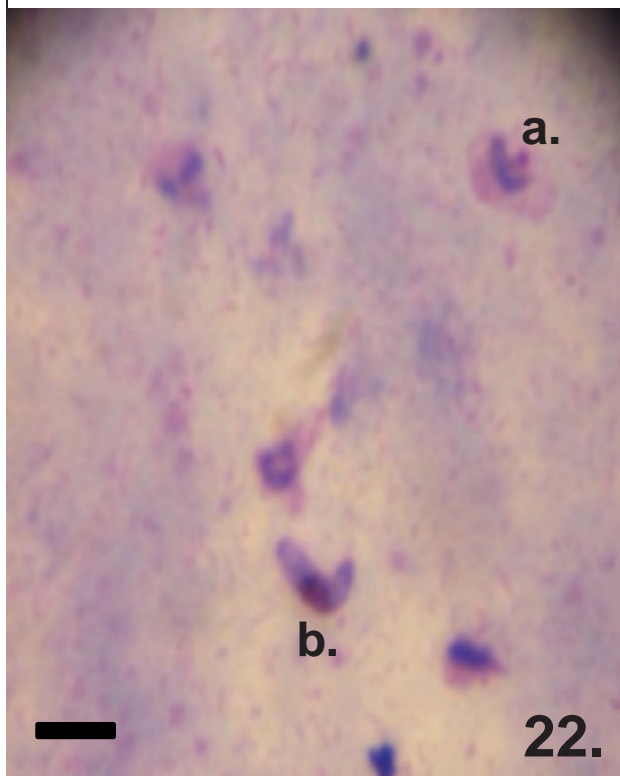
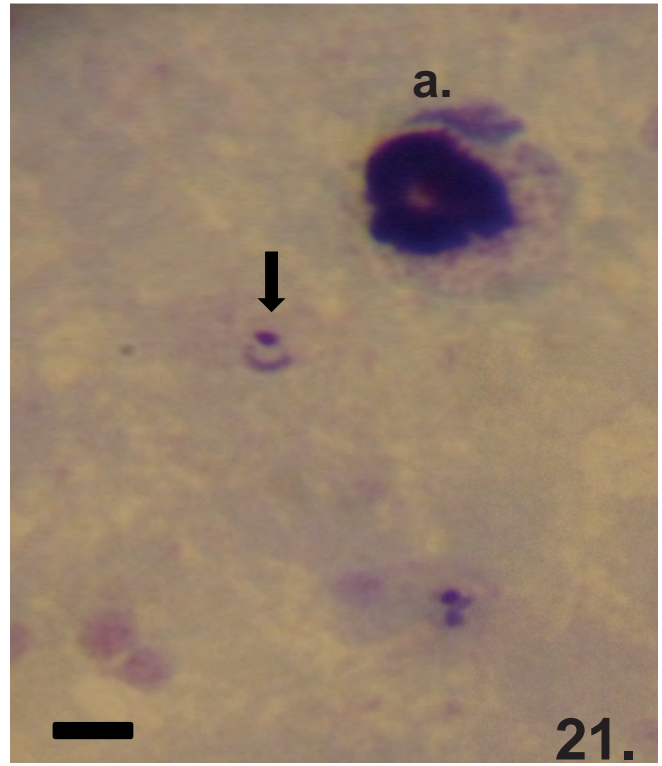
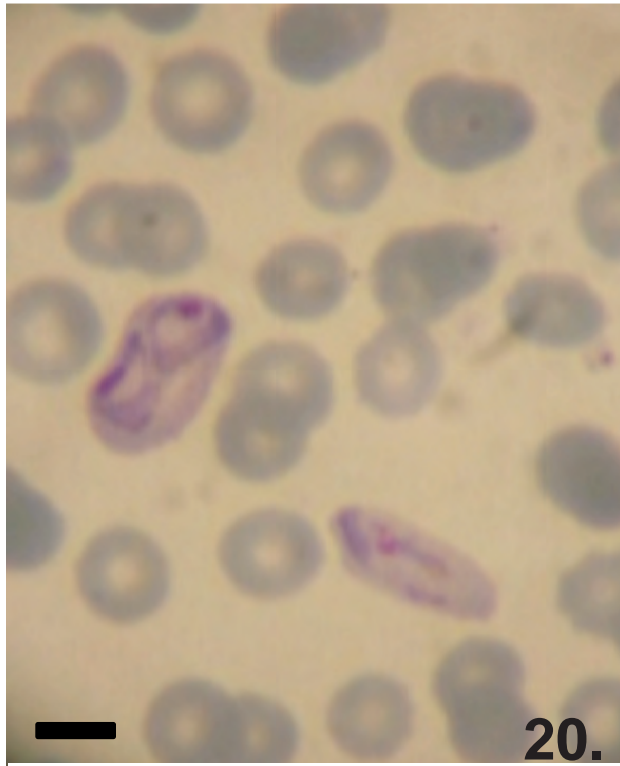








Nota: Las barras en microfotografías Nos. 18-22 equivalen a 5µm.



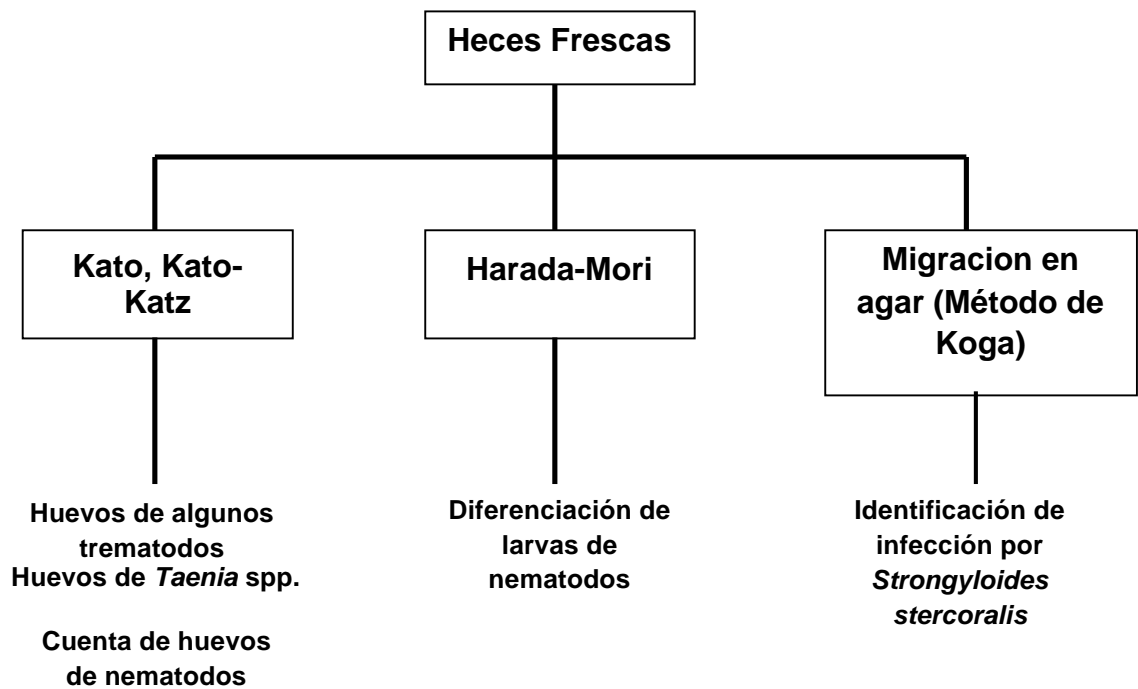
MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

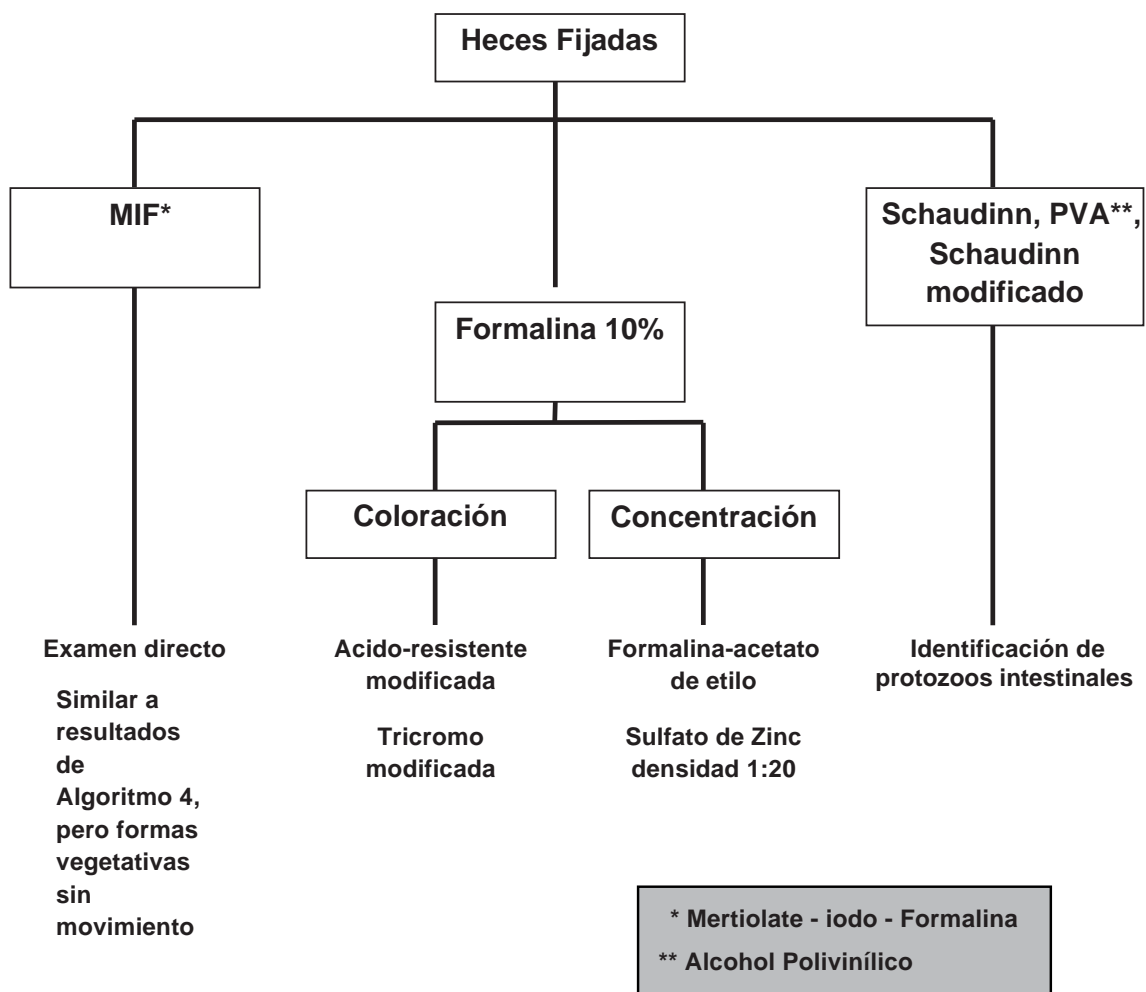
V. ALGORITMOS

- 1.** ALTERNATIVAS DE MÉTODOS PARA EXAMEN DE HECES.
ENCUESTAS EPIDEMIOLÓGICAS. HECES FRESCAS.
- 2.** ALTERNATIVAS DE MÉTODOS PARA EXAMEN DE HECES.
ENCUESTAS EPIDEMIOLÓGICAS. HECES FIJADAS.
- 3.** DIAGRAMA PARA SELECCIONAR MÉTODOS EN EL EXAMEN DE HECES FRESCAS Y EL PROPÓSITO DE CADA MÉTODO.
- 4.** DIAGRAMA PARA SELECCIONAR MÉTODOS EN EL EXAMEN DE HECES FIJADAS. LA CLASE DE FIJADOR DETERMINARÁ EL TIPO DE MÉTODO A UTILIZAR.
- 5.** DIAGRAMA PARA HECES DIARREICAS O LÍQUIDAS, CON O SIN MOCO. LA SELECCIÓN DEL MÉTODO PERMITIRÁ MEJORES RESULTADOS, ASUMIENDO QUE EL MÉDICO HAGA UNA SOLICITUD DIRIGIDA.

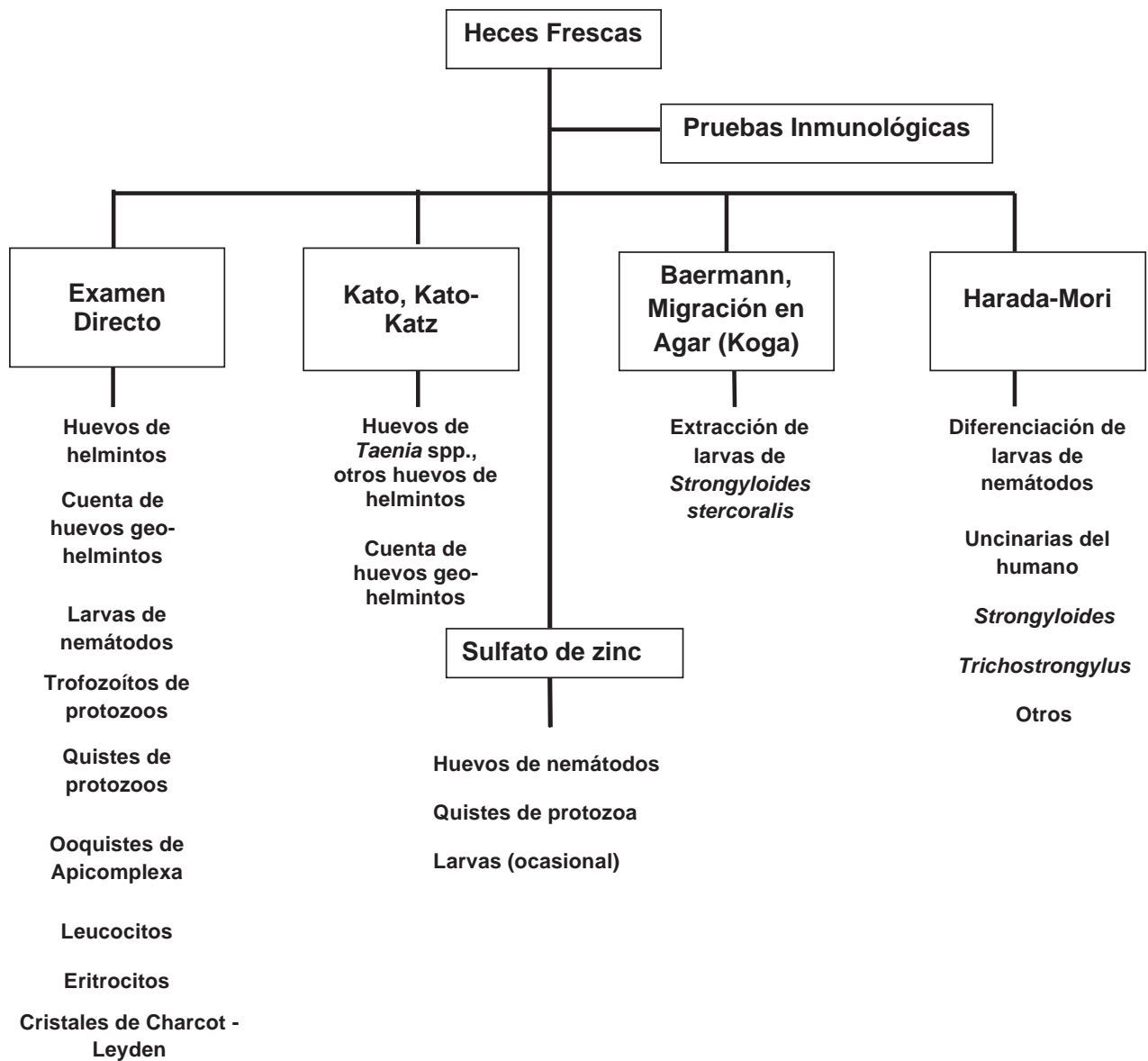
Algoritmo No. 1. Alternativas de métodos para examen de heces. Encuestas epidemiológicas. Heces frescas.



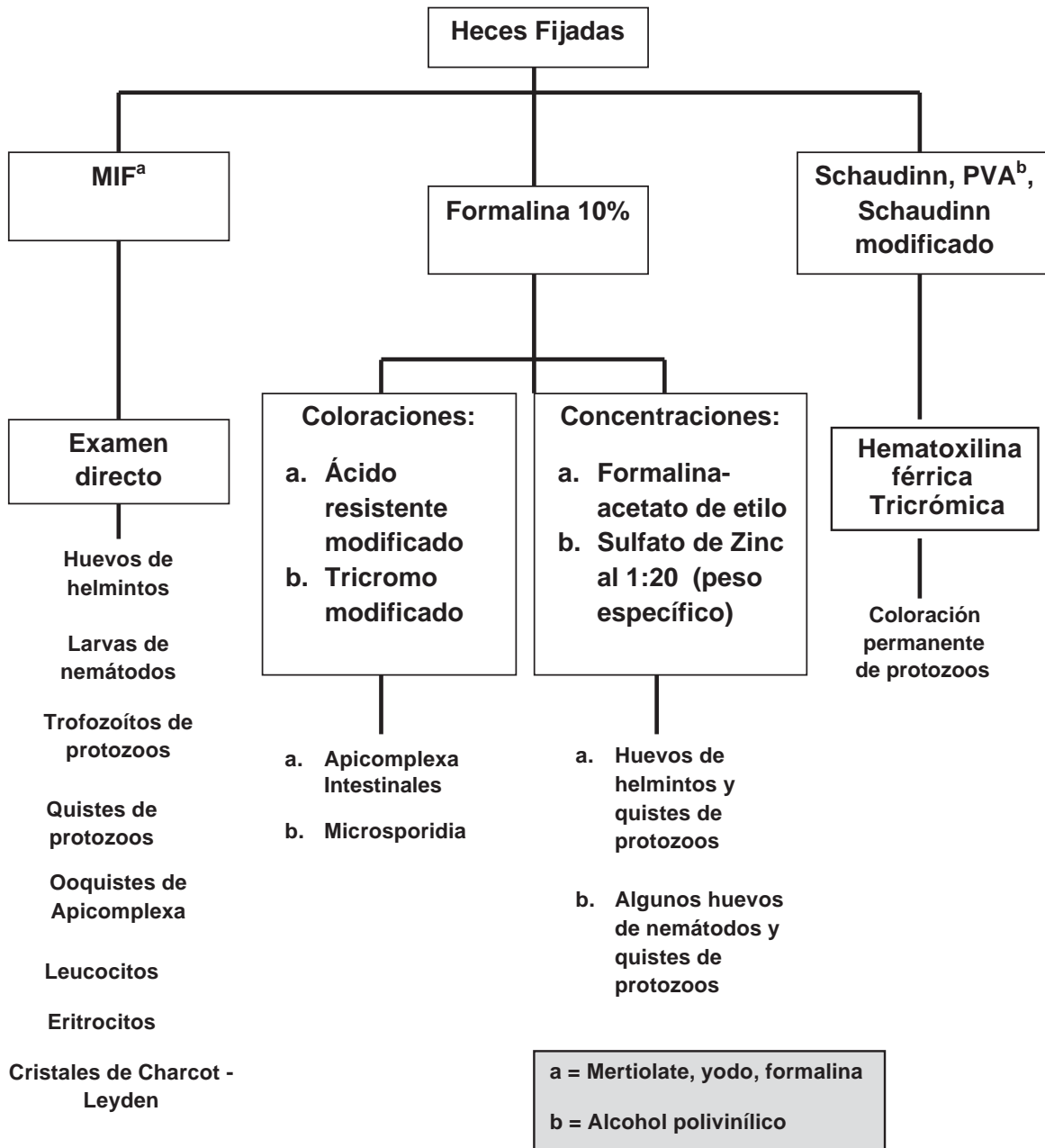
Algoritmo No. 2. Alternativas de métodos para examen de heces. Encuestas epidemiológicas. Heces fijadas.



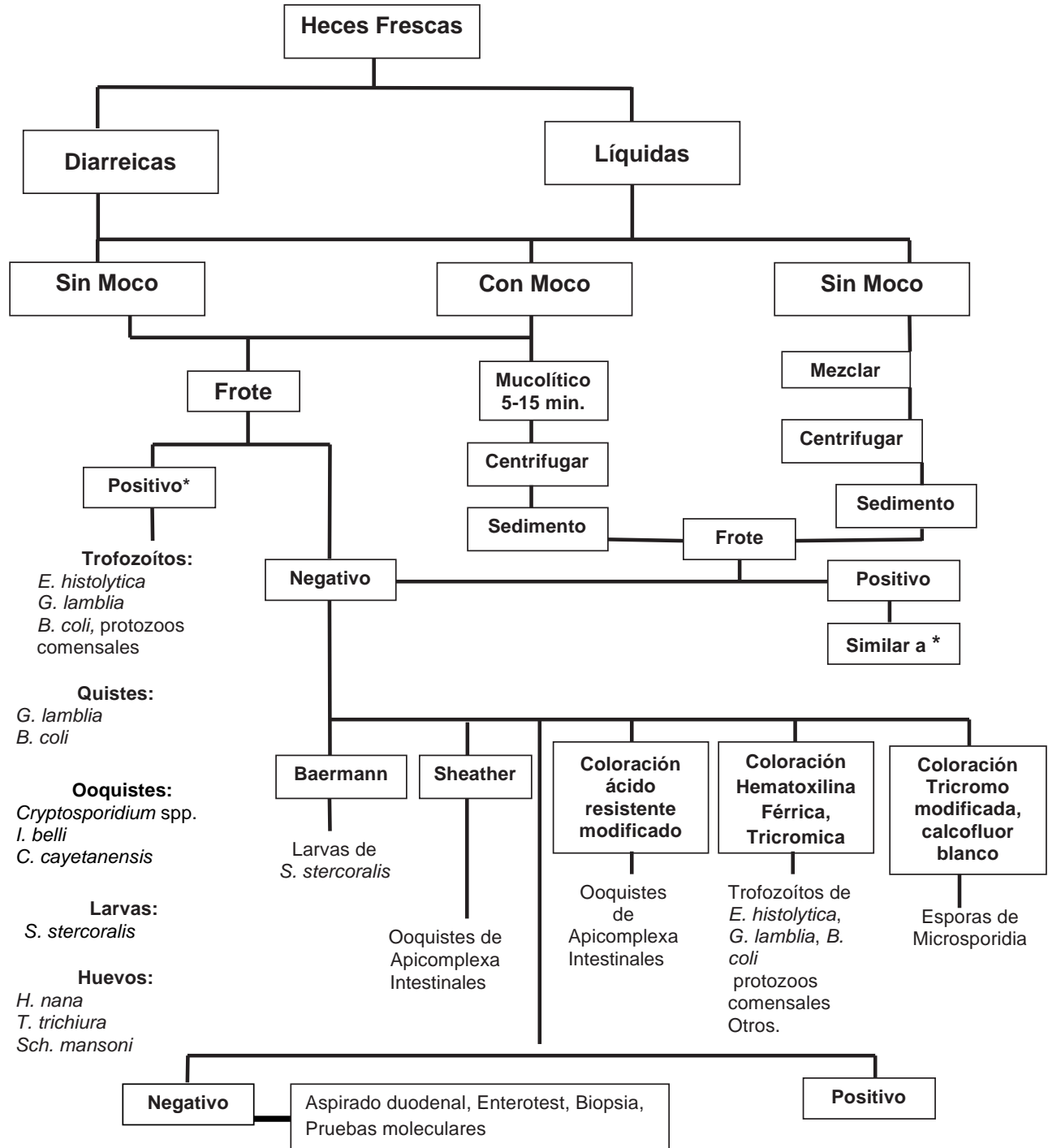
Algoritmo No. 3. Diagrama para seleccionar métodos en el examen de heces frescas y el propósito de cada método.



Algoritmo No. 4. Diagrama para seleccionar métodos en el examen de heces fijadas. La clase de fijador determinará el tipo de método a utilizar.



Algoritmo No. 5. Diagrama para heces diarreicas o líquidas, con o sin moco. La selección del método permitirá mejores resultados, asumiendo que el médico haga una solicitud dirigida.



MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

ANEXOS

MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

Accesos a páginas web. Accesado: 18 de Marzo 2013

1. World Health Organization, Global Malaria Programme. <http://www.who.int/malaria/en/index.html>
2. Roll Back Malaria, The Global Partnership for a Malaria-free World. <http://www.rbm.who.int/>
3. World Health Organization, Malaria rapid diagnostic test performance: Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 4 (2012) http://www.who.int/malaria/publications/rapid_diagnostic/en/index.html
4. World Health Organization, Health topics Leishmaniasis <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>
5. World Health Organization, Health topics Chagas Disease. http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/
6. Organización Panamericana de la Salud. <http://new.paho.org/index.php>
7. World Health Organization, Neglected Tropical Disease. http://www.who.int/neglected_diseases/en/
8. World Health Organization, Health topics Helminthiasis. <http://www.who.int/topics/helminthiasis/en/>
9. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. <http://www.who.int/tdr/en/>
10. Asociación Hondureña de Parasitología (AHPA). <http://www.bvs.hn/php/level.php?lang=es&component=35&item=2>
11. Instituto Hondureño de Enfermedades Infecciosas y Parasitología Antonio Vidal. <http://www.bvs.hn/E/IAV.htm>
12. Biblioteca virtual en Salud de Honduras. <http://www.bvs.hn/php/index.php>
13. Center for Disease Control and Prevention (CDC), Parasites. <http://www.cdc.gov/parasites/>
14. Center for Disease Control and Prevention (CDC), Neglected Tropical Disease. <http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/>
15. Center for Disease Control and Prevention (CDC), Yellow Book Homepage. <http://wwwnc.cdc.gov/travel/page/yellowbook-2012-home.htm>
16. USAID, Neglected Tropical Disease Program. <http://www.neglecteddiseases.gov/>

MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

Ilustraciones

Ejemplo hoja de registro diario	23
Esquema de un microscopio (Fig 1)	31
Iluminación (Fig. 2)	33
Escala para calibración de microscopio (Fig. 3)	36
Técnica de Kato-Katz (Fig. 4)	50
Recolección de muestra, método de la cinta adhesiva transparente (Fig. 5)	56
Manera de recobrar la muestra, método sulfato de zinc (Fig. 6)	63
Método Formalina – Acetato de Etilo (Fig. 7)	70
Harada-Mori en tubo (Fig. 8)	77
Harada-Mori en placa (Fig. 8)	77
Vaso de sedimentación, método de Baermann (Fig. 9)	81
Ejemplo, gancho de protoescólex de <i>E. vogeli</i> (Fig. 10)	98
Microfilarias estructuras y células	124
Microfilarias de diferentes especies de filaria	125
Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR)	153

Índice de soluciones

Ácido pícrico, diferenciador	105
Ácido sulfúrico 0.1 N, diferenciador	110
Agar para migración de larvas	83
Albúmina de Mayer	104
Alcohol ácido	53
Alcohol etílico al 70%	105
Alcohol etílico al 50%	110
Alcohol yodado stock	105
Alcohol glicerinado al 20%	53
Amortiguadoras para malaria	128
Anticoagulante de citrato al 2%	122
Azul de metileno alcalino	110, 116
Búfer ácido para malaria	128
Búfer ácido para Delafield	122
Búfer ácido para <i>Leishmania</i>	128
Búfer alcalino para malaria	128
Búfer alcalino para Delafield	122
Búfer alcalino para <i>Leishmania</i>	128
Carbol-fucsina	109
Colorante de hematoxilina de Delafield	122
Colorante de Giemsa solución madre	127
Colorante de hematoxilina de Heidenhain	105
Colorante de tricromo	114
Colorante de Wright	128
Cultivo NNN	143
Cultivo de Senejkie's	144
Formalina al 2%	121
Líquido para digestión artificial	87
Medio de Berlese	95
Mordente sulfato férrico amónico	105
Shaudinn modificado	104
Solución amortiguadora pH 7	141
Solución concentrada fenolada de azúcar	65
Solución de Lugol	42
Solució de glicerina y agua (Kato-Katz)	48, 59
Solución de penicilina-estrptomocina	145
Solución salina fisiológica	41, 46

Solución salina fisiológica con antibiotico	145
Solución de Locke	144
Solución de sulfato de zinc	61
Tricromo-azul de metileno	116

Indice de parásitos

<i>Ancylostoma duodenale</i> (uncinaria del humano)	24, 47, 53, 75, 82
<i>Angiostrongylus costaricensis</i>	21, 79, 89
Babosas veronicélicos	87
<i>Ascaris lumbricoides</i>	24, 45, 52
Interpretación de cuenta de huevos	45
<i>Balantidium coli</i>	41
<i>Capillaria</i>	87
<i>Cryptosporidium</i> spp	64, 109
Apicomplexa intestinales	109
Ooquistes	43
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	43, 109
<i>Echinococcus</i>	97, 99
<i>vogeli</i>	97, 99
<i>granulosus</i>	97, 99
<i>oligarthus</i>	97, 99
<i>Entamoeba histolytica</i>	20, 22, 41, 103, 107
<i>Enterobius vermicularis</i>	54
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	115, 117
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	115, 117
<i>Fasciola</i>	43
Embrionar huevos	75
<i>Giardia lamblia</i>	19
<i>Hymenolepis nana</i>	48, 59
<i>Iso spor a belli</i>	43, 109, 64
<i>Leishmania</i> spp	26, 140
Toma de muestra	141
Cultivo	142
Estimación de la densidad parasitaria	148
Prueba de Diagnóstico Rápido	158
Malaria (ver <i>Plasmodium</i>)	
Microfilarias	121
Estructuras y células	124
Especies	125
Microsporidia	113, 116
<i>Necator americanus</i> (uncinaria del humano)	45, 48, 52
<i>Paragonimus</i>	43, 75
<i>Plasmodium</i> spp	
Gota gruesa y extendido fino	129
Coloración de Giemsa	130
Coloración de Wright	130
Calculo de la densidad parasitaria	132
<i>Sarcocystis</i>	87
<i>Schistosoma</i>	43, 48, 60
<i>Spirometra</i>	75
<i>Strongyloides stercoralis</i>	19, 21, 43, 75, 79, 82, 85
<i>Taenia</i>	25, 54, 93
<i>Ternidens</i>	75
<i>Trichinella spiralis</i>	86, 87, 89
<i>Trichuris trichiura</i>	41, 45, 50, 52

MANUAL DE PARASITOLOGÍA

Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas

<i>Trypanosoma cruzi</i> (Enfermedad de Chagas)	134
Método de Strout	135
Capa de leucocitos	135
Procedimiento con tubo capilar	136
Xenodiagnóstico	138
<i>Trichostrongylus</i>	75

