



MANUAL ACADÉMICO

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO

Lcda. Elisa Boucourt Rodríguez. Ms. C.

Dra. Alina Izquierdo Cirer. Ms. C.



AUTORAS PRINCIPALES

Lcda. Elisa Boucourt Rodríguez. MSc.

Licenciada en Tecnología de la Salud, perfil Microbiología.

Máster en Enfermedades Infecciosas.

Investigadora Agregada II.

Docente Titular de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador. <https://orcid.org/0000-0002-7570-709X>

eboucourt@utb.edu.ec

Dra. Alina Izquierdo Cirer. MSc.

Doctora en Medicina.

Especialista de Primer y Segundo Grado en Microbiología.

Máster en Parasitología.

Investigadora Auxiliar I.

Docente Titular de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador. <https://orcid.org/0000-0002-6748-1772>

aizquierdo@utb.edu.ec

CO-AUTORES

Lcdo. Melvin Fabricio Jiménez Manzaba

Licenciado en Enfermería. Instituto de Neurociencias. Guayaquil.

Diplomado de Salud Ocupacional.

Especialista en Salud Ocupacional

Diplomado de Higiene Ocupacional (Monitoreo ocupacionales) 53-SSO-004

Especialista en Higiene Ocupacional

Cursando el Programa de “Máster en Gestión de los Servicios de Salud”. Universidad “Cesar Vallejo Piura-Perú.

<https://orcid.org/0000-0003-1997-5249>

Lcda. Janeth Aurora Cruz Villegas, MSc

Licenciada en Laboratorio Clínico.

Diploma Superior en Gestión de Desarrollo de los Servicios de Salud.

Magister en Planificación, Evaluación y Acreditación de la Educación Superior.

Docente Titular de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador. <https://orcid.org/0000-0002-7612-4574>

Lcda. Stalin Fabian Martínez Mora, MSc

Químico-Farmacéutico.

Magister en Microbiología, mención Biomédica.

Docente Titular de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador.

<https://orcid.org/0000-0002-5642-5476>

Lcda. Luz Angélica Salazar Carranza, MSc

Química-Farmacéutica.

Magíster en Bioquímica Clínica.

Docente Titular de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador.

Cursando el Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud.

<https://orcid.org/0000-0003-2668-9262>



ISBN: 978-9942-606-12-9



Manual Académico - Diagnóstico Parasitológico
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO
ISBN: 978-9942-606-12-9 (eBook)

Editado por:
Universidad Técnica de Babahoyo
Avenida Universitaria Km 2.5 Vía a Montalvo
Teléfono: 052 570 368
© Reservados todos los derechos 2023

Babahoyo, Ecuador
www.utb.edu.ec
E-mail: editorial@utb.edu.ec

Este texto ha sido sometido a un proceso de evaluación por pares externos.

Diseño y diagramación, montaje y producción editorial
Universidad Técnica de Babahoyo

Babahoyo – Los Ríos – Ecuador

Queda prohibida toda la reproducción de la obra o partes de la misma por cualquier medio, sin la preceptiva autorización previa.

AGRADECIMIENTO

Nuestro entrañable agradecimiento a las máximas autoridades de la Universidad Técnica de Babahoyo por la confianza depositada en los autores de este Manual y por el permanente apoyo brindado en la intensa y sistemática búsqueda como investigadores, de la verdad científica, con el fin supremo de contrinuir con nuestros modestos conocimientos y experiencia en el ámbito del diagnóstico microbiológico y parasitológico, al aprensizaje y permanente actualización de los profesionales de la salud, estudiantes y todas aquellas personas interesadas en el bien común de la sociedad.

LOS AUTORES

DEDICATORIA

Este Manual va dedicado a nuestros seres amados que han brindado un puntal imprescindible en nuestro crecimiento humano, académico y científico, muy especialmente a nuestros padres, hijos, tíos, hermanos y demás familiares que con su constante apoyo, nos impulsaron e impulsan de manera anónima pero decisiva a alcanzar un peldaño más en el desempeño profesional, a ellos, que siempre se han mantenido al lado de nuestro Dios, sosteniéndonos junto a Él con su fé infinita en nuestro trabajo, con permanente devoción y respeto.

También se lo dedicamos con profundo amor a nuestros estudiantes de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Babahoyo, que, con su permanente interés en la asignatura de Microbiología y Parasitología, han incentivado de manera sistemática la búsqueda de nuevos recursos con mayor calidad y rigor científico, que redunden en un mayor beneficio del proceso enseñanza-aprendizaje tanto desde la teoría como de la práctica.

LOS AUTORES

ÍNDICE

CAPITULO 1.....	2
GENERALIDADES DEL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	2
INTRODUCCIÓN	2
REGLA DE ORO PARA EL DIAGNÓSTICO EN PARASITOLOGÍA	3
FASES DEL PROCESO DE LABORATORIO	3
ASPECTOS FUNDAMENTALES A TENER EN CUENTA PARA SOLICITAR LA TOMA DE MUESTRAS Y LA REALIZACIÓN DE EXÁMENES PARASITOLÓGICOS.	6
RESUMEN.....	8
REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍAS.....	9
CAPÍTULO 2.....	12
DIAGNÓSTICO COPROPARASITOLÓGICO.....	12
INTRODUCCIÓN	12
REQUISITOS PARA LA RECOGIDA DE LA MUESTRA DE HECES.....	13
DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	14
COPROGRAMA.....	16
Restos alimenticios.....	17
Residuos de alimentos vegetales o de animales:	18
Leucocitos y hematíes	18
Cristales	18
Detección de grasas en heces. Técnica del Sudán III.....	19
TÉCNICAS DE LABORATORIO EMPLEADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS PARASITOSIS INTESTINALES.....	20
Técnicas de Examen Coprológico Directo	20
MÉTODOS CUALITATIVOS	21
Métodos de examen directo	21
Método de examen directo húmedo con eosina roja al 1 % o solución de lugol.....	21
Método de coloración de Ziehl-Neelsen modificada (directo seco)	24
Método de la coloración tricromo modificada para esporas de Microsporidia	25
Método azul de metileno –Tricromo.....	27
Método de la coloración con hematoxilina férrica de Heidenhain (para protozoos intestinales).	29
MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN.	34
MÉTODOS POR FLOTACIÓN.	35
Técnica de Willis (modificada por Basnuevo).....	35
Técnica de Faust o por flotación por Sulfato de Zinc (SO ₄ ZN)	36
Técnica de Flotación por Sheather	38
MÉTODO POR SEDIMENTACIÓN	41
Método de la Copa Cónica	41
Técnica de Ritchie (concentración de formol-éter/etil acetato).	43
MÉTODOS CUANTITATIVOS	45
Método de Kato (variación Katz), en 41,7mg de heces.....	45
Técnica de concentración Amido Schwartz. (tinción de taranto).....	48
CULTIVOS PARASITOLÓGICOS	49

MÉTODOS DE DESARROLLO PARA HELMINTOS	49
Técnica de placa de agar	49
Método de Harada-Mori	50
MEDIOS DE CULTIVO PARA PROTOZOOS	53
Medio Pavlova	53
Medio Diamond	53
Medio de Tanabe y Chiba modificado para Entamoeba histolytica/dispar.	54
RESUMEN	54
REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA	55

1 PROCEDIMIENTOS ESPECIALES Y DIAGNÓSTICO INDIRECTO EN

PARASITOLOGÍA CAPITULO 3..... 58

PROCEDIMIENTOS ESPECIALES Y DIAGNÓSTICO INDIRECTO EN PARASITOLOGÍA	59
INTRODUCCIÓN	59
MÉTODO ESPECIAL DE DIAGNÓSTICO	60
Método de Graham o Método de la cinta adhesiva transparente	60
Técnica de Baermann modificada con cultivo de heces	61
Estudio del contenido duodenal (cuerda encapsulada, cápsula de beal o enterotest)	65
Estudio del contenido duodenal (intubación duodenal para obtener aspirados, secreciones o jugo duodenal)	66
Examen de biopsias de las paredes del sistema digestivo	67
Estudio de materiales purulentos, secreciones, esputo y fluido vaginal	68
Análisis de la orina para el diagnóstico de Trichomonas vaginalis	68
Análisis de la secreción vaginal para el diagnóstico de Trichomonas vaginalis	69
Especiación de Taenia spp. (tinción de proglótides con el método de la tinta china)	70
Análisis del escólex de Taenia sp. para el diagnóstico de certeza de la especie	72
MÉTODOS DE COLORACIÓN PARA HELMINTOS	74
Coloración Carmin clorhídrico	74
Coloración de Bonilla, Naar y Beloy	75
Coloración hematoxilina férrica de Delafield	76
TÉCNICAS DE LABORATORIO EMPLEADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE PROTOZOOS TISULARES Y HEMÁTICOS	77
Examen en fresco, frotis de sangre periférica, extensión sanguínea o análisis de extensión sanguínea	77
Procedimiento para la tinción de Giemsa en frotis sanguíneo o extensión	80
Tinción de Field para extensión de sangre	81
Método de Leishman	82
Técnica de la Gota Gruesa	83
Tinción de Giemsa para Gota Gruesa	85
Tinción de Field para Gota Gruesa	85
Técnica de detección de antígenos parasitarios (proteína-2 rica en histidina hrp-2)	86
Sistema de QBC (Quantitative Buffy Coat System-Becton Dickinson)	87
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS O TRIPANOSOMIASIS AMERICANA.	87
Métodos directos:	88
Métodos indirectos:	89
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO	90
DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LEISHMANIASIS	92
1-Frotis	92
2-Cultivo	94

Estimación de la densidad parasitaria de amastigotes de material esplénico	97
Método de Knott. Concentración y coloración de microfilarias.....	98
RESUMEN.....	101
REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA.....	102

CAPÍTULO 1.

GENERALIDADES DEL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

CAPITULO 1.

GENERALIDADES DEL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Lic. Elisa Boucourt Rodríguez, MSc.

Dra. Alina Izquierdo Cirer, MSc.

QF. Luz Angélica Salazar Carranza, MSc.

INTRODUCCIÓN

Los métodos de diagnóstico parasitológicos descritos en el presente manual, fueron cuidadosamente escogidos sobre la base de la experiencia acumulada de los autores así como de la información actualizada existente en la literatura mundial, teniendo en cuenta costos, eficacia, eficiencia, existencia y facilidad de obtención de reactivos, reproducibilidad, facilidad de ejecución, flexibilidad para adaptarse a trabajo clínico y epidemiológico así como las correspondientes recomendaciones ofrecidas por organismos acreditados. La intención fundamental de este documento, es que sirva como material de consulta, tanto para los laboratorios de atención primaria de salud, como del nivel secundario y terciario, así como para los docentes y estudiantes que a diario necesitan en su labor académica y científica, contar con información veraz, de fácil acceso y especializada en el área del diagnóstico parasitológico (Aquino, et al., 2012).

El diagnóstico parasitológico tiene por finalidad relacionar la patología actual con la presencia del parásito, para ellos emplea diferentes acciones y procedimientos prácticos que requieren la optimización de parámetros con el propósito de alcanzar alta fiabilidad en las técnicas a desarrollar y certeza en los resultados. En este contexto, los métodos descritos son los básicos a los cuales se les han realizado pocas modificaciones a través de los últimos 50 años y aún siguen vigentes por su sencillez, calidad y eficiencia; otras técnicas son más recientes y deben emplearse en el trabajo de rutina de cualquier laboratorio clínico o especializado en el campo del diagnóstico parasitológico (Rosales, Bautista, 2020).

La aparición de nuevos métodos de diagnóstico de laboratorio, tales como pruebas moleculares e inmunoensayos, exigen de sólidos conocimientos epidemiológicos sobre las parasitosis por parte de los profesionales y técnicos que las interpretan en países tropicales. Constituye un imperativo de primer orden que el clínico u otro especialista a cargo en la asistencia médica, sea capaz de analizar la relevancia o no de esos resultados, lo cual exigirá una formación sólida sobre la especialidad de Parasitología. Es por ello que, en la actualidad, la identificación parasitológica continuará dependiendo de la capacidad y confiabilidad del personal de laboratorio en la identificación morfológica y la experticia que exhiba en su labor cotidiana (Campo, 2015; IIRT, 2018).

REGLA DE ORO PARA EL DIAGNÓSTICO EN PARASITOLOGÍA

La confirmación de parásitos o sus productos de excreción-secreción 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. Conocer la existencia de una exposición de riesgo, así como la zona geográfica donde el paciente podría haber adquirido la infección es fundamental para orientar la búsqueda de una posible parasitosis, conjuntamente con el auxilio de todos los datos clínicos recogidos por una adecuada anamnesis (IIRT, 2018; Rueda, 2020).

En general no existe una técnica que sea completamente eficaz para el diagnóstico de todas las parasitosis intestinales y la que se elija dependerá de cual sea el objetivo a diagnosticar. En ocasiones es tan o más importante la destreza del que realiza el diagnóstico que el tipo de técnica seleccionada. La identificación de las diferentes estructuras morfológicas, requiere de un buen entrenamiento por parte del profesional que ejecuta el diagnóstico. Valorar, identificar y demostrar el parásito para poder determinar la etiología del proceso infeccioso o enfermedad es la “*Regla de Oro*” para el diagnóstico en Parasitología (IIRT, 2018; Rueda, 2020).

FASES DEL PROCESO DE LABORATORIO

Preanalítica: es la etapa que requiere de mayor tiempo, solicitud, obtención, almacenamiento, transporte, recepción y la que está sujeta, por tanto, a mayor porcentaje de errores.



Imagen: cortesía de la Lic. Elisa Boucourt. Laboratorio de Microbiología y Parasitología. Universidad Técnica de Babahoyo.

Imagen 1. *Recepción de muestras en el laboratorio (muestras de heces)*

Analítica: esta etapa incluye la realización del procedimiento diagnóstico, la validación de las técnicas, calibración de equipos y ejecución de controles de calidad.



Fotografía: cortesía de la Lic. Elisa Boucourt. Laboratorio de Microbiología y Parasitología. Universidad Técnica de Babahoyo

Imagen 1. *Procesamiento de muestras*



Imagen: cortesía de la Lic. Elisa Boucourt. Laboratorio de Microbiología y Parasitología. Universidad Técnica de Babahoyo.

Imagen 2. *Procesamiento de muestras (Examen directo húmedo: frotis utilizando solución de lugol y solución salina al 0,85 %).*



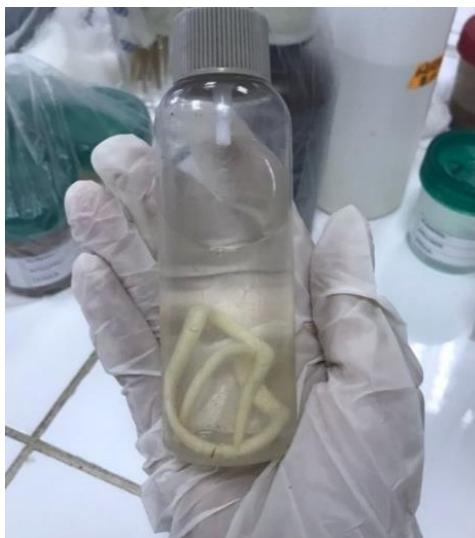
Fotografía: cortesía de Lic. Elisa Boucourt. Laboratorio de Microbiología y Parasitología.
Universidad Técnica de Babahoyo

Imagen 3. *Observación al microscopio óptico de un frotis húmedo de muestras de heces.*



Fotografía: cortesía de Lic. Elisa Boucourt. Laboratorio de Microbiología y Parasitología.
Universidad Técnica de Babahoyo

Imagen 4. *Observación macroscópica de fragmentos de parásito adulto recolectada por un paciente (proglótides de Taenia spp).*



Fotografía: cortesía de Lic. Elisa Boucourt. Laboratorio de Microbiología y Parasitología. Universidad Técnica de Babahoyo

Imagen 4. Observación macroscópica de parásito adulto obtenidos en las muestras de heces (*Ascaris lumbricoides*).

Posanalítica: esta fase permite realizar cálculos, interpretación de resultados, validación y emisión del informe (Ministerio de Salud Perú, Instituto Nacional de Salud, 2014).

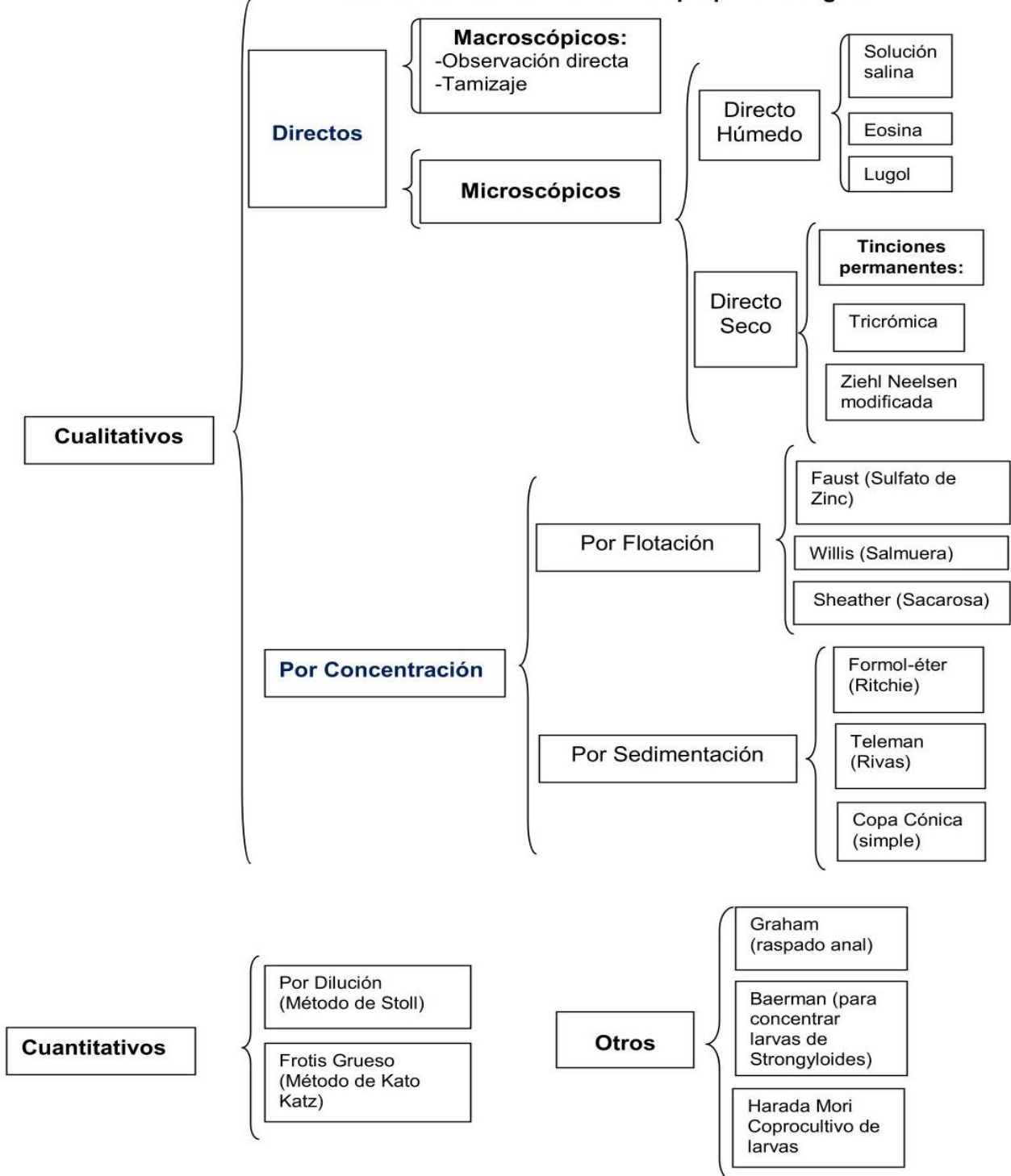
ASPECTOS FUNDAMENTALES A TENER EN CUENTA PARA SOLICITAR LA TOMA DE MUESTRAS Y LA REALIZACIÓN DE EXÁMENES PARASITOLÓGICOS.

- Ciclo de vida de los parásitos.
- Hábitat usual y ectópico en el hospedero
- Manifestaciones clínicas más específicas.
- Vías de transmisión (California Childcare Health Program, 2020).

Ejemplos de muestras a enviar al laboratorio para demostrar la presencia de parásitos

- Heces
- Sangre
- Orina
- Secreciones
- Espujo
- Excreciones
- Pus
- Otros líquidos
- LCR
- Aspirados o Biopsia de tejidos (Puerta-Jiménez, Vicente-Romero, 2015).

Clasificación de los Métodos Coproparasitológicos



Esquema elaborado por la Lic. Elisa Boucourt Rodríguez, MSc

Figura 1. Esquema de la Clasificación de los Métodos Coproparasitológicos.

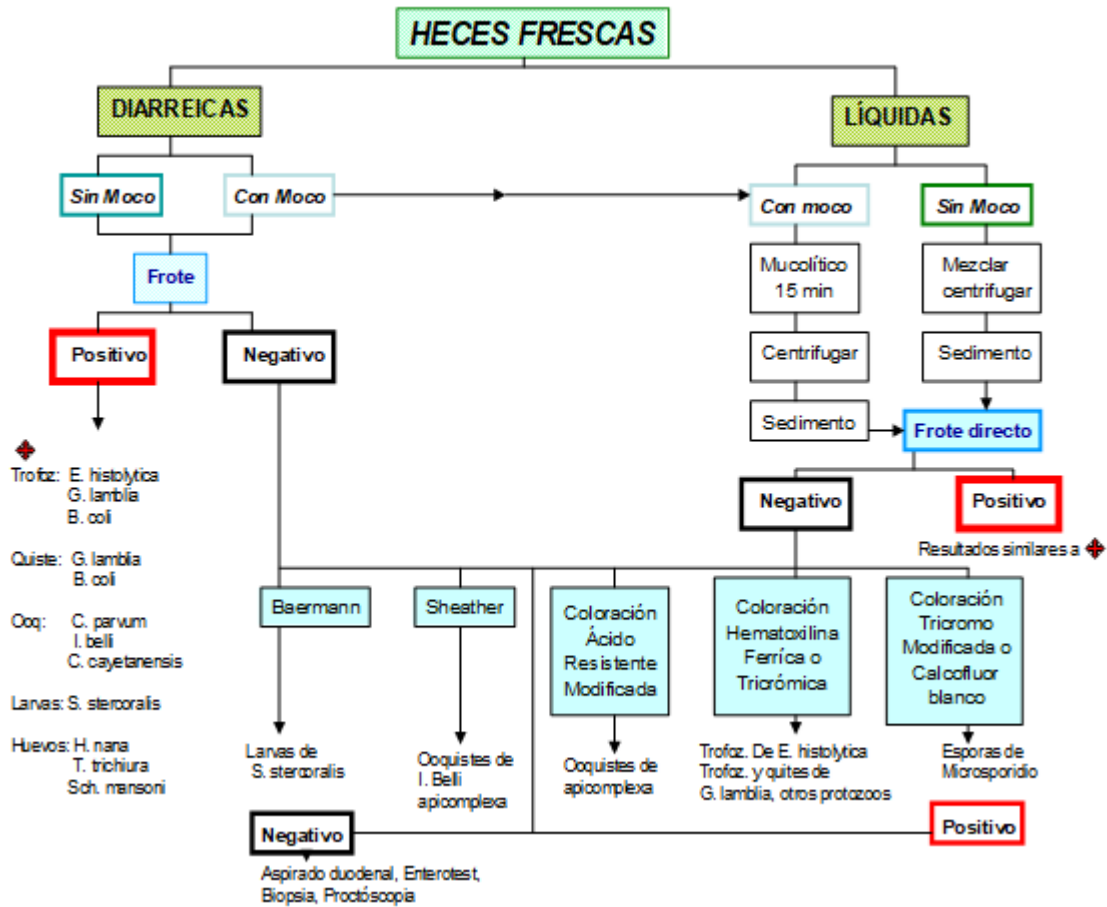


Figura 2. Organigrama del estudio macroscópico y microscópico de las heces emitidas por defecación espontánea (heces frescas)

RESUMEN

Las técnicas de diagnóstico coproparasitológico han sufrido pocas variaciones en los últimos 50 años, pero siguen siendo las de elección para el diagnóstico de las parasitosis intestinales, tanto por su bajo costo, como por su relativa sencillez. En general no existe una técnica que sea completamente eficaz para el diagnóstico de todas las parasitosis intestinales y la que se elija dependerá de cual sea el objetivo a diagnosticar. En ocasiones es tan o más importante la destreza del que realiza el diagnóstico que el tipo de técnica seleccionada, pero los métodos de concentración resultan de una gran utilidad (Aquino, et al., 2012).

El empleo del examen directo de heces y el método de concentración por sedimentación a través de la centrifugación, también llamado formol-éter, cuando se utilizan por separado o en conjunto, presentan ventajas frente a otros métodos parasitológicos, destacándose la rapidez en la generación de resultados y la sencillez en sus procedimientos. Sin embargo, elementos importantes como el déficit de estandarización en la preparación y el

procedimiento con las láminas, calidad de los reactivos y calibración de equipos así como la cantidad de las muestras a tomar, las dificultades en la lectura sistemática de las preparaciones, la escasez de tiempo para hacer una búsqueda exhaustiva de las formas parasitarias y las características biológicas propias de los parásitos intestinales, relacionadas con las etapas de invasión parasitaria y la excreción intermitente de las formas morfológicas empleadas para el diagnóstico, pueden provocar diferencias en los resultados referidos para una misma muestra, implicando variabilidad en el diagnóstico que puede interferir con la orientación de acciones en salud, tanto terapéuticas como de promoción y prevención (Campo, et al., 2015).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍAS

- Aquino, M.J., Vargas, G.B., López, B., Neri, E., Bernal, R. (2012). Comparación de dos nuevas técnicas de sedimentación y métodos convencionales para la recuperación de parásitos intestinales. *Rev Mex Patol Clin Med Lab.* 59 (4):233-242.
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=36833>.
- California Childcare Health Program [CCHP] (2020) Cómo evitar la propagación de enfermedades en la guardería o centro de cuidado infantil.
<https://www.healthychildren.org/Spanish/health-issues/conditions/prevention/Paginas/prevention-in-child-care-or-school.aspx>
- Campo, L. F., Botero, L.E., Gutiérrez, L.A., Cardona, J. A. (2015). Reproducibilidad del examen directo de heces y de la concentración formol-éter y validez del examen directo de heces para el diagnóstico de parásitos intestinales. *Archivos de Medicina* 11(4): 4 <http://hdl.handle.net/10495/20784>
- IIRT (Instituto de Investigaciones en Enfermedades Tropicales) (2018) Manual de Técnicas básicas para diagnóstico parasitológico. Sede Regional Orán. Argentina.
http://www.iiet.unsa.edu.ar/sites/default/files/Manual%20IIRT_0.pdf
- Ministerio de Salud Perú, Instituto Nacional de Salud. (2014). Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de los Parásitos Intestinales del hombre Serie de Normas Técnicas n° 37.
https://bvs.ins.gob.pe/insprint/SALUD_PUBLICA/NOR_TEC/2014/serie_normas_tecnicas_nro_37.pdf
- Puerta-Jiménez, I., Vicente-Romero M.R. (2015). Parasitología en el laboratorio. Guía básica de diagnóstico I. 3ro Ciencias. Área de Innovación y Desarrollo, SL. España.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=581324>
- Rosales, J.A., Bautista, K.M. (2020). Comparación de tres métodos de concentración de enteroparásitos en muestras fecales humanas. *Rev cubana Med Trop.* 72(2) e494
https://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602020000200008

Rueda, M.M., Rodríguez, C.A., Valladares, W., Sosa, W., Canales, M. (2020).
Contribución al servicio de la mejora de la salud infantil: Experiencias de campo
realizada durante ocho años por estudiantes y docentes de parasitología en
diferentes zonas rurales de Honduras. *Revista UNAH Sociedad*, 2(V): 84–95.
<https://www.lamjol.info/index.php/UNAHSOCIEDAD/citationstylelanguage/get/ieee?submissionId=10671>

CAPITULO 2.
DIAGNÓSTICO COPROPARASITOLÓGICO

CAPÍTULO 2.

DIAGNÓSTICO COPROPARASITOLÓGICO

Dra. Alina Izquierdo Cirer, MSc.

Lic. Elisa Boucourt Rodríguez, MSc.

Lic. Janeth Cruz Villegas, MSc.

INTRODUCCIÓN

Los exámenes coproparasitológicos constituyen un conjunto de técnicas diagnósticas de gran importancia para la identificación de la mayoría de las enteroparasitosis motivadas por protozoarios o helmintos. Se emplean también en el diagnóstico diferencial del síndrome diarreico crónico, en tanto permite identificar los parásitos presentes en el tracto gastrointestinal. Su eficacia y sensibilidad para determinar un diagnóstico de certeza, dependen de la correcta indicación y preparación de la muestra, los datos clínicos completos y de antecedentes de interés que sean brindados al laboratorio, así como de la eficacia por parte del personal que ejecuta tanto la técnica macroscópica como la directa microscópica directa y de enriquecimiento o concentración (flotación y sedimentación), estos últimos de gran relevancia pero se emplean más de rutina para la docencia, los estudios epidemiológicos y de investigación (Álvarez, et al., 2020).

A través de los años, el diagnóstico de las parasitosis intestinales se ha realizado por examen microscópico directo de la materia fecal del paciente, empleando el aislamiento y la identificación de las formas parasitarias que el paciente elimina, la cual, aunque en una gran proporción es específica, exhibe una escasa sensibilidad, cuando la carga parasitaria es baja en las heces del paciente y sólo facilita de forma más eficiente, el diagnóstico de la infección aguda; además necesitan de la obtención de al menos tres muestras seriadas de heces. Sin embargo, por su bajo costo es en los países en vías de desarrollo, el principal método de diagnóstico para enteroparasitosis (Álvarez, et al., 2020).

De esta manera, el examen directo constituye sin duda alguna, la prueba más empleada para la detección de patógenos intestinales en muestras de heces, pero con frecuencia, con la finalidad de incrementar la capacidad de detección de la técnica, se lleva a cabo la combinación con métodos de concentración de las muestras de materia fecal, como el método de formol-éter o Ritchie modificado que es un examen por concentración empleando la sedimentación por centrifugación (Rosales, Bautista, 2020).

Las técnicas de concentración no son las más idóneas para el diagnóstico de los nematodos intestinales, debido a que no se emplea una cantidad de heces, lo que no permite la cuantificación de los huevos por gramo de materia fecal ni, por lo tanto, el número de

parásitos adultos en el paciente. Es por esta causa, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) prescribe la técnica de Kato-Katz para el diagnóstico tanto cualitativo como cuantitativo de las geohelminiosis (Restrepo, et al., 2013).

Existen otras variadas técnicas de gran utilidad también en el diagnóstico parasitológico que utilizan diferentes muestras y no solo las heces, entre las que se destacan los exámenes que emplean tinciones, las pruebas de inmunoserodiagnóstico y las moleculares, pero no son utilizadas de rutina en muchos países debido al alto costo que implican, entre otros factores (IIRT, 2018).

REQUISITOS PARA LA RECOGIDA DE LA MUESTRA DE HECES

- Cuando las heces no se recogen de forma adecuada, los resultados no son confiables. Heces viejas y no preservadas no tienen valor diagnóstico, tampoco heces refrigeradas no son recomendadas para buscar larvas de helmintos como *Strongyloides stercoralis* que son tan difíciles de encontrar.
- Para buscar trofozoítos de protozoos se requiere que la muestra sea examinada dentro de una hora o menos después de evacuada ya que estas formas morfológicas son muy lábiles y se destruyen con facilidad.
- Es preferible la obtención de heces frescas recién emitidas y por defecación espontánea, tener cuidado no mezclar orina.
- Cuando hay moco y sangre debe incluirse esta porción, igual que parásitos adultos, segmentos de estróbila de cestodos, entre otros.
- Debe evitarse el uso de antidiarreicos, antibióticos o antiparasitarios antes del examen de heces; tampoco se acepta administración de laxantes aceitosos, bario, bismuto o supositorios antes de la recolección de la muestra.
- Es muy importante instruir convenientemente al paciente para la adecuada obtención de la muestra
- Se debe emplear frasco (vidrio o plástico) de boca ancha, limpio y con tapa de rosca.
- Las muestras deben venir bien identificadas con los datos del paciente (nombre completo, edad, sexo) de igual manera el encargado de su recepción en el laboratorio debe incluir en el libro de apuntes un resumen de los datos clínicos del paciente.
- Como la excreción de los quistes y huevos de los parásitos tiene un ritmo cambiante resulta apropiada la indicación de exámenes seriados (al menos tres) en días alternos, para garantizar el diagnóstico.
- Las muestras de heces deben ser transportadas inmediatamente al laboratorio después de recogidas, pero si van a estar más de 2 horas, se tienen que conservar en refrigeración a 4 °C.

- En caso de que se observen después de las 4 ó 6 horas de recogida, sería conveniente el uso de preservantes (Rueda, 2020).

Las muestras de heces pueden ser enviadas al laboratorio por el paciente muy bien identificada y recogida de las siguientes formas:

1. Muestra en fresco (emitidas de forma espontánea sin la utilización de laxantes):

Muestras recogidas en un frasco. Estas muestras deben ser analizadas antes de transcurrir una hora de haber sido colectadas (los trofozoítos de protozoarios por lo general mueren rápidamente)

2. Muestra con la utilización de preservantes:

- Solución de formaldehído al 10 % (1 parte de materia fecal y 3 partes de formaldehído).

Se utiliza para preservar huevos y quistes de parásitos. Las muestras se preservan por tiempo indefinido si se cierra herméticamente.

- Uso de MIF (mentiolate-yodo-formól)

Se preservan todas las formas de parásitos incluso las formas vegetativas de amebas. Las muestras se preservan por tiempo indefinido incluso ya coloreadas.

- Uso del PVA (alcohol polivinílico)

Se preservan muy bien todas las formas de parásitos, incluso las formas vegetativas de amebas, igual a los preservantes anteriores, permite que se conserven las estructuras parasitarias por tiempo indefinido. (Vázquez, et al., 2012)

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Los exámenes parasitológicos se pueden clasificar según diversos parámetros, y si se toma en cuenta el tipo y procedencia del producto biológico en:

a) Coproparasitoscópicos (CPS) mediante los que se diagnostican las parasitosis intestinales y cuyo producto biológico es la materia fecal.

b) Los de cavidades, en los que los productos biológicos son exudados.

c) Los tisulares, en los cuales los productos biológicos pueden ser una biopsia, el raspado de una úlcera, sangre, secreciones de lesiones.

Una vez que se establece el tipo de muestra a obtener (con mayor frecuencia, son las heces), se comienza el trabajo en el laboratorio, primero para ordenar, limpiar y desinfectar el área donde se procesarán los productos biológicos y luego para su observación a través del empleo del microscopio óptico binocular compuesto (Musto, 2013).



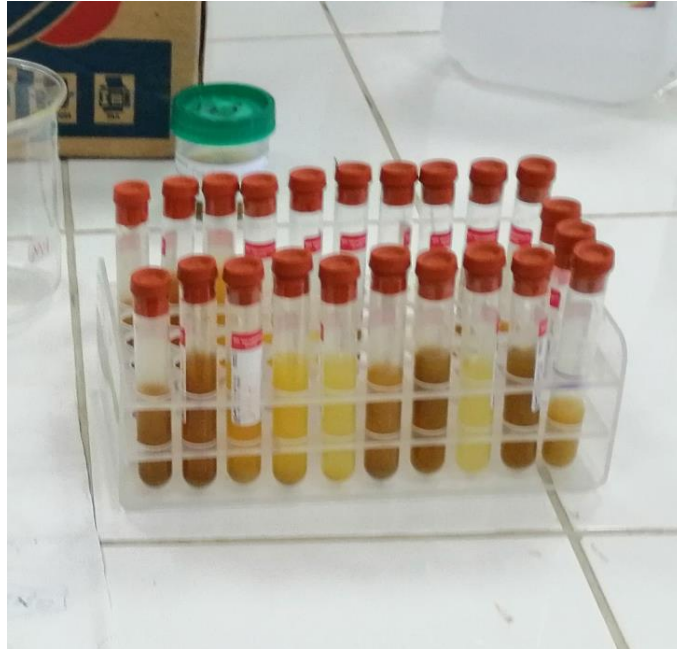
Fotografía: cortesía de Lic. Elisa Boucourt. Laboratorio de Microbiología y Parasitología.
Universidad Técnica de Babahoyo

Imagen 5. Organización de la mesa de trabajo para comenzar con el procesamiento de las muestras (heces).



Fotografía: cortesía de Lic. Elisa Boucourt. Laboratorio de Microbiología y Parasitología.
Universidad Técnica de Babahoyo

Imagen 6. Procesamiento de las muestras (tamizado de las heces).



Fotografía: cortesía de Lic. Elisa Boucourt. Laboratorio de Microbiología y Parasitología.
Universidad Técnica de Babahoyo

Imagen 7. Procesamiento de las muestras (centrifugado de las heces).

COPROGRAMA

Estudio más completo de la materia fecal, que incluye además del análisis microscópico, pruebas bioquímicas tales como:

- pH: gran valor en la enfermedad diarreica aguda en niños menores de 5 años. Se mide con papel indicador, normal: 7.0.
- No es válido en pacientes que estén tomando antibióticos orales.
- Azúcares reductores: gran valor en la enfermedad diarreica aguda en niños menores de 5 años. Son detectados con el reactivo de Benedict o con tabletas de Clinitest.
- Sangre oculta: uso de sustancias como la bencidina que reaccionan con los derivados de la hemoglobina.

El examen microscópico de las heces, comprende el estudio de restos alimenticios, células, cristales y microbiota bacteriana, además del examen parasitológico, para un personal que comienza su adiestramiento es algo difícil, ya que se encontrará por primera vez con elementos en la materia fecal que pueden causarle confusión a la hora del diagnóstico, pues pudieran confundirse con estructuras parasitarias (*pseudoparásitos*), en ocasiones no se le da valor a algunos de estos elementos, y que podrían ofrecer aspectos

importantes para la investigación (Fabián de Estrada, Otárola, Tarqui, 2014). Se citan algunos de los más comunes e importantes:

Restos alimenticios

Estos hallazgos varían en dependencia de la calidad y cantidad de los alimentos. Normalmente existe cierta proporción de alimentos no digeridos o parcialmente digeridos, lo cual depende de muchos aspectos.

Se pueden hallar gran variedad de estructuras de origen cárneo, graso o vegetal.

- a. **Carnes:** Normalmente sólo se observan fibras bien digeridas, de forma rectangular, de extremidades redondeadas y de color amarillo claro. Las no digeridas son rectangulares, de extremidades angulares y con estriación transversal y longitudinal; su presencia obedece a la excesiva ingestión de carnes o deficiencias en la digestión pancreática. Se colorean en rojo caoba por el yodo.
- b. **Tejidos conjuntivos:** Aparecen en forma de un retículo fino de fibras blancas, no estriadas y birrefringentes. Su presencia indica insuficiencia en la digestión gástrica debido a hipocloridia o aquilia.
- c. **Grasas:** Aparecen en tres formas:
 - **Grasa neutra:** Se observan como glóbulos redondos o irregulares, agujas fuertemente refringentes, ambos elementos son de color rojo granate.
 - **Ácidos grasos:** Agujas cristalinas grandes o pequeñas presentándose en masas tan espesas que rara vez se pueden determinar en forma aislada de los cristales, se observan de color anaranjado, mientras los cristales no se alteran.
 - **Jabones:** Aparecen como agujas cortas y gruesas, o más frecuentemente en forma de masas irregulares de color amarillo

Los ácidos grasos y los jabones son normales en las heces. Un exceso de ellos o la presencia de grasas neutras, indica un estado anormal relacionado con insuficiencia pancreática o deficiencia en el flujo de bilis al intestino. La existencia de jabones no debe ser atribuida a una insuficiencia digestiva, ya que la formación de estos se debe a la presencia en el intestino, de sales de calcio y magnesio que fijan los ácidos grasos y los transforma en jabones.

Residuos de alimentos vegetales o de animales:

Son muy variados y aparecen normalmente en las heces, carecen de significación patológica, pero hay que tenerlos en cuenta porque pueden confundirse con estructuras parasitarias.

- **Vasos o tráqueas:** Por haber consumido vísceras de animales. Se disponen en espiral.
- **Células vegetales:** Se observan de doble contorno.
- **Pelos vegetales:** Forma de hoja de sable con una cavidad central.
- **Células de almidón:** Se observan de gran tamaño, tabicadas en forma de esponja o panal; conteniendo a veces gránulos de almidón que se tiñen de azul con el lugol.
- **Células:** Pueden encontrarse algunas células epiteliales derivadas de la mucosa intestinal, por lo general se hallan muy alteradas y su reconocimiento es difícil.

Leucocitos y hematíes

Los primeros no se encuentran generalmente en las heces y se alteran rápidamente en el intestino, pero son abundantes cuando hay formación de pus (procesos inflamatorios y ulcerativos). Si se observan debe sospecharse de una evacuación rápida a partir de la lesión, o bien la localización de la misma en las últimas porciones del colon. Los glóbulos rojos se ven inalterados solamente cuando proceden del colon, recto o ano. Significan un estado ulcerativo o inflamación, aunque su presencia puede deberse también a la ruptura de vasos venosos extasiados (hemorroides).

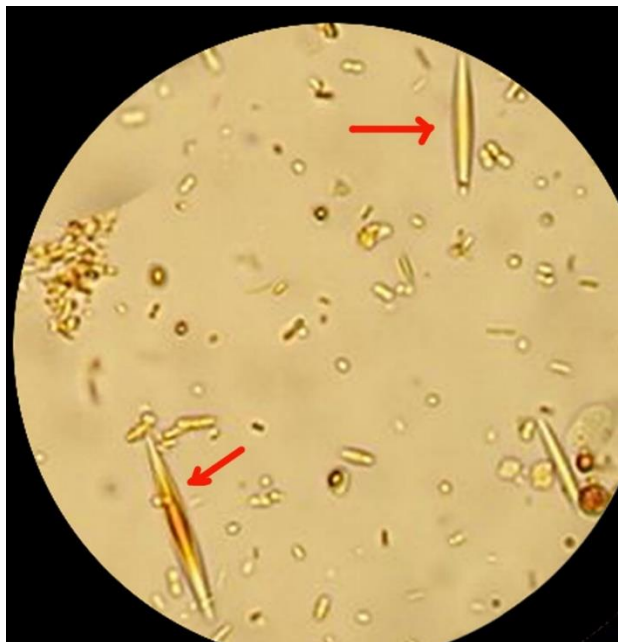
Cristales

Pocos tienen significación clínica, entre ellos se pueden citar los siguientes:

- ❖ **Cristales de Charcot – Leyden:** se encuentran en caso de parasitismo intestinal, también son un indicio de viejas hemorragias. Se observan de forma romboidal, con puntas muy agudizadas.
- ❖ **Cristales de hematoïdina y hematina:** Están asociadas a hemorragias intestinales. También se encuentran presentes después de una ingestión de alimentos ricos en sangre. Se observan de forma de tabla o de listones pequeños; otras veces toman la forma acicular. Son de color pardo y muy soluble en amoníaco y cloroformo.
- ❖ **Cristales de Bilirrubina:** Se observan tienen las mismas características de los cristales de Hematoïdina y hematina, pero son de color amarillo – dorado.
- ❖ **Cristales de Oxalato de calcio:** Su presencia depende de una alimentación rica en vegetales. Son insolubles en ácido acético. Si hay hiperclorhidia no aparecen porque el

exceso de ácido los disuelve; su presencia en las heces indica que el ácido clorhídrico del estómago no ha actuado sobre ellos. Se observan similar a un sobre de carta.

- ❖ **Cristales de fosfato amónico–magnésiano:** son los que con más frecuencia encontramos en las heces. No se tiñen por la bilis, ni aparecen en el meconio. Se observan de forma de hexaedro.
- ❖ **Cristales de Carbonato de calcio:** se encuentran cuando hay ingestión excesiva de leche.
- ❖ **Cristales de fosfato de magnesio:** aparecen en la fermentación amoniacal.



Fotografía: cortesía de Lic. Elisa Boucourt. Laboratorio de Microbiología y Parasitología. Universidad Técnica de Babahoyo

Imagen 8. Cristales de Charcot-Leyden en heces observados a través del microscopio óptico

Detección de grasas en heces. Técnica del Sudán III.

Preparación de la solución de Sudán III.

- Sudán III ----- 1 gramo
- Alcohol natural ----- 100 mL.

Procedimiento:

En una lámina portaobjeto se pone una gota de ácido acético al 30 %, en la misma se diluye una pequeña porción de heces y se seca al calor con la ayuda de un mechero. A esta preparación se le adiciona 1 ó 2 gotas de la solución de Sudán III, se homogeniza, a esta preparación se le coloca un cubreobjeto y se hace la observación en el microscopio óptico.

Resultados:

Grasa neutra: se observan como glóbulos redondos o irregulares, agujas fuertemente refringentes, ambos elementos son de color rojo granate.

Ácidos grasos: agujas grandes o pequeñas presentándose en masas tan espesas que rara vez se pueden determinar en forma aislada de los cristales, se observan de color naranja (Kaminsky, 2014).

TÉCNICAS DE LABORATORIO EMPLEADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS PARASITOSIS INTESTINALES

Para la realización del diagnóstico en el laboratorio de Parasitología, pueden utilizarse métodos directos, los cuales determinan o precisan la presencia del agente causal a partir de material biológico del paciente y métodos indirectos o especiales, que se basan en la interpretación de las reacciones del hospedero y dan un diagnóstico de probabilidad, como las de inmunoserodiagnóstico, moleculares, imagenológicas, de inmunohistoquímica, entre otras. se basan en la interpretación de las reacciones del hospedero y dan un diagnóstico de probabilidad (Puerta-Jiménez, Vicente-Romero, 2015).

Técnicas de Examen Coprológico Directo

Macroscópico:

Por observación visual, se analiza la consistencia, el color, la cantidad, la presencia de moco, sangre, fragmentos de parásitos o proglótides de tenias grandes. Se usa también el método del tamizaje y la observación a través del microscopio estereoscópico (Aquino, et al., 2012).

Microscópico:

Existen varias técnicas para la realización de este examen, entre ellos los métodos cualitativos (identifican alguna forma de vida parasitaria) y cuantitativos (permiten el conteo de huevos de helmintos y, por ende, el grado de infección). Todos necesitan de la experticia de un laboratorista o especialista entrenado. La muestra de materia fecal se coloca una pequeña cantidad en un portaobjetos. El portaobjetos se coloca bajo un microscopio óptico binocular compuesto, por su alto poder de resolución y las ventajas que ofrece para el

diagnóstico eficiente y luego se examina en busca de la presencia de parásitos (Aquino, et al., 2012; Girard de Kaminsky, 2014).

MÉTODOS CUALITATIVOS

Métodos de examen directo

El método directo húmedo y seco puede utilizar solución salina, eosina o lugol para su realización, permite observar además de los parásitos, leucocitos, cristales de Charcot-Leyden, restos alimenticios de origen vegetal o animal, levaduras y células de descamación, como se describió con anterioridad.

Se emplea con el objetivo de reconocer trofozoitos de protozoos y otros estadíos de diagnóstico de helmintos y protozoos y elementos que aparecen en situaciones anormales. Es el mejor método para detectar trofozoitos en una amebiasis invasora por *Entamoeba histolytica* y trofozoitos de *Trichomonas vaginalis* simple, emisión de pseudópodos.

Método de examen directo húmedo con eosina roja al 1 % o solución de lugol

Es la más antigua de todas las técnicas y es utilizada para el diagnóstico de todas las parasitosis intestinales, aunque puede ser especialmente útil para la observación de las formas móviles de trofozoitos (Aquino, et al 2012; Girard de Kaminsky, 2014).

Procedimiento y materiales a emplear para el examen directo

- Porta- objeto 7.5 x 2.5 cm. (3 x 2 pulgadas) limpio y seco
- Cubre-objeto 22 x 22 mm.
- Aplicadores de madera
- Solución de lugol, eosina o salina fisiológica (0.85 % cloruro de sodio)
- Frasco con desinfectantes (cloro o fenol) para descartar material.

En la preparación tratada con solución lugol, la sustancia cromatínica se destaca sobre el citoplasma pardo-amarillento, y es posible distinguir la estructura nuclear. Se emplea para colorear en forma temporal trofozoitos y quistes de protozoos. Inmoviliza las formas parasitarias incluyendo las larvas, pero es muy útil para precisar la morfología del núcleo y otras estructuras internas a diferencia de la solución de eosina, que permite ver la viabilidad de los parásitos, pero solo es útil para visualizar estructuras externas (Girard de Kaminsky, 2014).

Esta solución de lugol para uso parasitológico puede venir preparada comercialmente, pero en caso contrario se podrá elaborar de la siguiente forma:

Solución de lugol parasitológico.

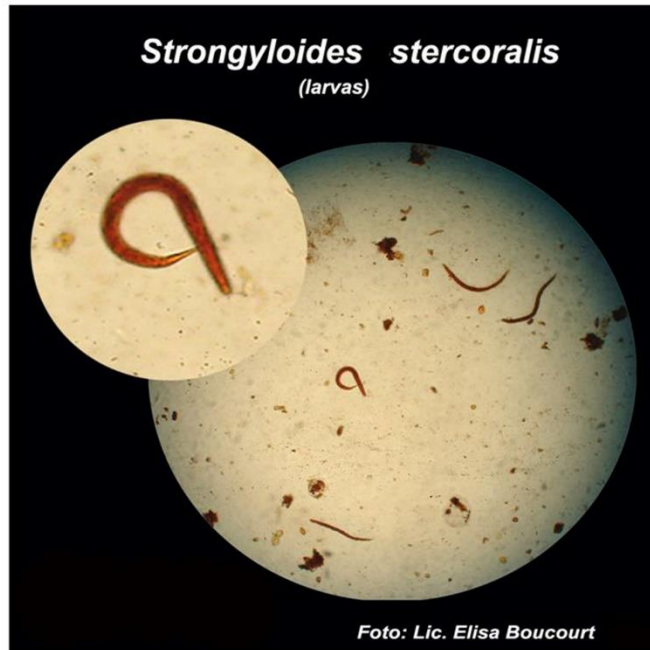
- Iodo cristaloides: 2 g.
- Ioduro de potasio: 4 g.
- Agua destilada: 100 ml.

La forma más empleada para el diagnóstico directo de todas las parasitosis intestinales es la siguiente:

1. Se coloca de un lado del portaobjetos una gota de solución de eosina y del otro lado una de lugol.
2. Con un aplicador, se coloca una alícuota de la muestra de heces (sobre todo aquellas que contienen moco o sangre) sobre cada gota colocada, homogeneizar y colocar lámina cubre-objeto sobre cada preparación.
3. Se observa al microscopio con lente ocular 10X. Primero con un objetivo 10X y después con 40X.
4. Se observa toda la lámina con ocular 10X para el diagnóstico de larvas y huevos de helmintos, se pasará después al objetivo 40X para identificar los trofozoitos y quistes. (Los trofozoitos y quistes de protozoos se destacarán como elementos nacarados translúcidos sobre el fondo rosado de eosina, que impregnará todos los elementos, excepto los protozoos cuando son viables).

Causas de error o resultados poco satisfactorios:

- Esperar más de una hora antes de buscar trofozoitos.
- Preparación muy gruesa o muy fina.
- Demasiada fibra, arenilla, burbujas.
- Demasiada iluminación o poca.
- Solución de lugol muy fuerte o muy diluida.
- No examinar la preparación en forma sistemática.
- Preparación reseca.
- Informe incompleto.
- El no encontrar trofozoitos en una muestra líquida, diarreica o con moco y sangre, que no es fresca, no tiene ningún significado.



Fotografía: cortesía de Lic. Elisa Boucourt. Laboratorio de Microbiología y Parasitología.
Universidad Técnica de Babahoyo

Imagen 9. Examen directo con lugol (muestra de heces). Larvas de *Strongyloides stercoralis* observadas a través del microscopio óptico con objetivo 10X.



Fotografía: cortesía de Lic. Elisa Boucourt. Laboratorio de Microbiología y Parasitología.
Universidad Técnica de Babahoyo

Imagen 10. Examen directo con lugol (muestra de heces). Huevo de *Ascaris lumbricoides* observado a través del microscopio óptico con objetivo 10X.

El método directo seco emplea tinciones permanentes o coloraciones especiales como: Zielh-Neelsen modificada, tricrómica y hematoxilina férrica (Restrepo, et al., 2013).

Método de coloración de Ziehl-Neelsen modificada (directo seco)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró en el año 2004, a *Cryptosporidium* spp. como una de las parasitosis desatendidas de la infancia, por lo que su identificación e informe son importantes (De la Parte, et al., 2005; Rueda, 2020).

Propósito

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

Opciones de muestra a examinar

-- Heces frescas o fijadas en formalina al 10 %, de pacientes con gastroenteritis, niños inmunonormales entre 0 a 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 también esputo, bilis, impronta de biopsia de mucosas.

Este procedimiento utiliza cuatro soluciones en pasos continuos de la tinción. Se emplea para el diagnóstico de certeza de los coccidios intestinales en especial: *Cryptosporidium parvum* y *Cyclospora cayetanensis* (IIRT, 2018).

Soluciones empleadas para la coloración: etanol, solución de fucsina fenicada, ácido sulfúrico al 2,5 % y solución de verde malaquita al 5 %.

Preparación de la solución de Ziehl Neelsen modificada

Solución A		Solución B	
Fucsina fenicada	150 gr	Solución A	10 ml
Alcohol (etanol L 95 %)	1000 ml	Agua fenicada al 5 %	90 ml

Procedimiento:

1. Se realizará una extensión de la materia fecal.
2. Se fijará en metanol el extendido durante 5 minutos y se secará al aire.
3. Se colocarán las láminas durante una hora en una solución de fucsina fenicada.
4. Se lavará con agua de la pila (grifo).

5. Se diferenciará por la inmersión de la lámina en solución de H₂SO₄ al 2 % durante 20 segundos con agitación constante de la lámina.
6. Se lavará con agua de pila (grifo).
7. Se coloreará con una solución de verde malaquita al 5 % durante 5 minutos.
8. Se lavará con agua de la pila (grifo).
9. Se añadirá aceite de inmersión y se le colocará un cubreobjetos.
10. Se examinará al microscopio con objetivo 40 X.

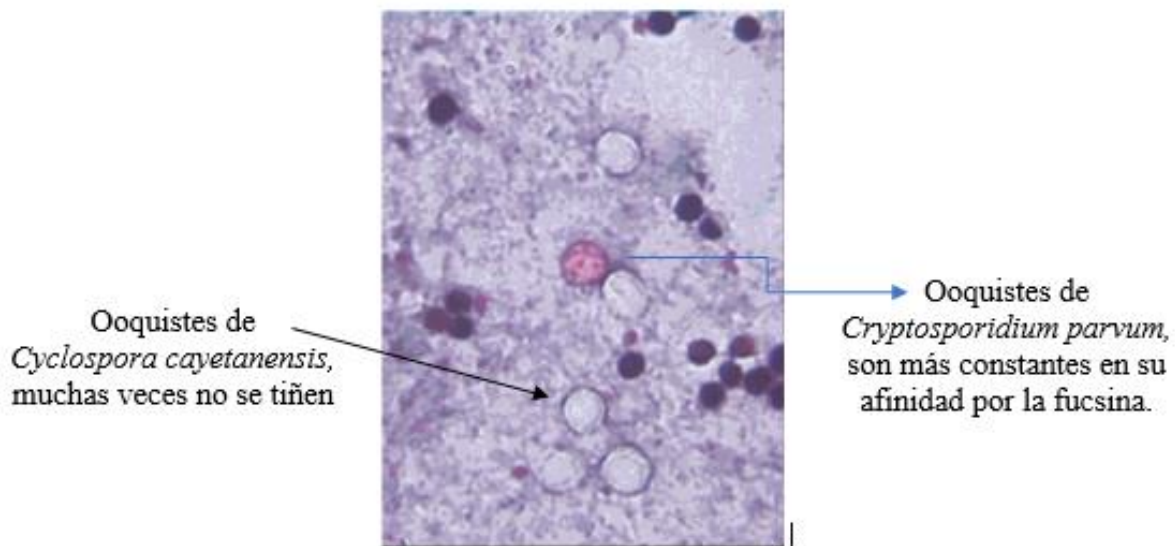


Imagen 11. Observación al microscopio óptico de una lámina coloreada con la tinción de Ziehl-Neelsen modificada (directo seco)

Método de la coloración tricromo modificada para esporas de Microsporidia

Propósito:

Se han descrito más de 1500 especies dentro de la familia Microsporidia, pero las especies que pueden ocasionar enfermedad en el humano son 14. Microsporidio es muy difícil de diagnosticar por su pequeño tamaño, muchas veces pasa desapercibido a los ojos del laboratorista. (IVAMI, 2019) Este tipo de coloración permite 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 el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) con diarrea crónica y sin otro hallazgo en las heces o pacientes portadores del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) positivos, sujetos desnutridos con diarrea crónica sin otros hallazgos parasitológicos o en

otros sujetos en quienes se sospeche la infección VIH/SIDA. Se han informado hallazgos de microsporidiasis intestinal en niños con diarrea (IIRT, 2018).

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.

Materiales

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Colorante chromotrope
- Coloración Gram
- Cristal violeta
- Yodo de Gram
- Pinza o estilete punta curva.
- Alcoholes 85% y 95% y xilol.
- Mechero de alcohol.
- Microscopio binocular.
- Placas petri 10 x 150 mm.

Procedimiento

- Preparar el set de placas petri 10 x 150 mm.
- Realizar un frotis fino en una lámina o laminilla y dejar secar.
- Fijar el frotis pasándolo 3 veces por una llama, un segundo de tiempo por vez.
- Agregar el colorante cristal violeta y esperar 1 minuto.
- Enjuagar en agua corriente y eliminar totalmente el agua.
- Adicionar el yodo de Gram por 30 segundos, remover el exceso con el decolorante y enjuagar con agua.

- Agregar el colorante chromotrope por 5 minutos de 50°C a 55°C.
- Pasar por el decolorante (alcohol 90% y ácido acético 1%) de 1 a 3 segundos.
- Pasar por alcohol 95% y por alcohol étílico absoluto por 1 minuto.
- Pasar un minuto por xilol buscando que la coloración sea adecuada para visualizar el parásito.
- Realizar el montaje y observar al microscopio.

Observación

- Observar al microscopio a 10X y 40X. Para observar al microscopio a 100X, cubrir con aceite de inmersión. Se observan las esporas de *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, que aparecen de un color rosado o rojo tenue o fucsia sobre el fondo verde o azul.

Ventajas

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

Desventajas

Es indispensable tener láminas control positivas; requiere de colorantes y de alcohol puros que aumentan el costo, algunos autores indican que es necesario confirmar el diagnóstico con microscopía electrónica o por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), requiere de personal adiestrado en la técnica y muy calificado para observar la preparación e identificar los organismos. Puede haber falsos negativos, en ocasiones en que la excreción de esporas es baja (IIRT, 2018).

Método azul de metileno –Tricromo

Propósito:

Tiene como propósito 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 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 (IIRT, 2018).

Muestra:

Heces frescas o fijadas.

Materiales:

- Portaobjetos de 7.5 X 2.5 cm.
- Cubreobjetos
- Aplicadores
- Lápiz de diamante para identificar
- Frascos coplin para coloración
- Alcohol ácido
- Etanol 95 %
- Etanol 100 %
- Xilol
- Aceite de inmersión.

Preparación de colorantes: azul de metileno

- Azul de metileno en polvo ----- 0.3 gramos
- Etanol 95 % ----- 30 mL.
- Hidróxido de potasio (KOH)----- 0.05 gramos
- Agua destilada ----- 500 mL

Mezclar hidróxido de potasio con el agua destilada, así obtendremos una solución de hidróxido de potasio al 0.01 %. Disolver el azul de metileno en el etanol, agregar el KOH al 0.01 % y mezclar bien. Guardar en frasco oscuro, rotulado, a temperatura ambiente. Esta preparación dura semanas.

Tricromo:

- Cromotropo 2R ----- 6.0 gramos
- Azul de metileno ----- 0.3 gramos
- Ácido fosfotungstónico ----- 0.7 gramos
- Ácido acético glacial ----- 3.0 mL

Mezclar los primeros tres ingredientes en un frasco de vidrio de 250 mL. de capacidad. Agregar el ácido acético glacial y dejar en reposo 30 min. Agregar 100 mL de agua destilada, mezclando con una varilla de vidrio para disolver los cristales. Guardar en frasco oscuro protegido de luz intensa (IIRT, 2018).

Alcohol ácido

- Ácido acético glacial ----- 4.5 mL
- Etanol 90 % ----- 995.5 mL.

Mezclar bien y guardar en un frasco bien rotulado.

Procedimiento:

- Preparar un extendido muy fino de una muestra de heces previamente fijada en formalina salina al 10 % (proporción 1:3). Dejar secar.
- Fijar en metanol absoluto durante 3 minutos.
- Colorear con azul de metileno 3 minutos. Enjuagar en agua corriente.
- Colorear con tricromo por 10 minutos.
- Enjuagar en alcohol ácido 5 segundos.
- Enjuagar en etanol al 95 % 1 minutos
- Deshidratar en alcohol al 95 % y al 100 %, 1 min. cada uno.
- Deshidratar en xilol o su equivalente por 10 minutos.
- Cubrir con permount, dejar secar y examinar bajo objetivo de inmersión.

Características de la coloración:

Las esporas de microsporidias aparecen como cuerpos ovoides, refráctiles, de color púrpura-rosado brillante. Puede verse en algunas una faja oscura cruzando la espora en diagonal.

- *Enterocytozoon bienewsi* mide 1,5 x 1,0 um
- *Encephalitozoon intestinalis* mide 2,2 x 1,2 um.
- Las bacterias y levaduras se tiñen de azul.

Método de la 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.

Método que proporciona confianza para la identificación de estadíos de *Dientamoeba fragilis*. Aunque la identificación de infecciones por *Entamoeba histolytica/dispar* necesita de pruebas moleculares, bioquímicas e inmunológicas, este método es útil en países en desarrollo para la confirmación de trofozoítos hematófagos de heces disintéricas, de exudados, líquidos, esputo, aspirados, raspado de úlcera de piel (IIRT, 2018).

Ventajas y Desventajas

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

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

Es costoso, 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 dos horas) y exige un personal de laboratorio con conocimientos profundos 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.

Hay tres momentos de gran importancia en la ejecución de este método:

1. Fijación
2. Diferenciación
3. Deshidratación.

Los resultados dependerán en última instancia, de que se haya hecho una precoz y adecuada recolección y fijación de la muestra. No se debe perder tiempo examinando una muestra mal fijada y peor teñida.

Muestra para laboratorio

- Heces frescas recolectadas en un frasco (vidrio, plástico, cartón) limpio, seco, con tapa de rosca, 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.

Procedimiento

- Fijar una muestra de heces o de moco con sangre recién obtenida en el fijador en relación 10:1 (10 mL de fijador para 1 g ó 1 mL de heces).
- Las heces deben estar totalmente suspendidas en el fijador, para lo cual se mezcla con un aplicador. Antes de proceder con la coloración la muestra debe permanecer 6 horas como mínimo en el fijador.
- El examinar láminas mal fijadas y peor teñidas es una pérdida de tiempo.
- Identificar tubos y láminas con la muestra a procesar.
- Agitar el frasco conteniendo la muestra fijada y verter 1 mL a un tubo de centrífuga.
- 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.
- Llenar el tubo con agua destilada y centrifugar 2 min a 2,000 rpm (revoluciones por minuto).
- Descartar el sobrenadante. Este paso puede repetirse otra vez para eliminar fijador en exceso.
- Agregar al sedimento un volumen igual de albúmina de Mayer, mezclar y extender finamente 1-2 gotas de esto sobre un porta-objetos rotulado. También puede colocar sobre el porta-objetos 1-2 gotas de sedimento de heces, agregar 1-2 gotas de albúmina de Mayer, mezclar y extender finamente.
- Permitir que la preparación se seque unos minutos, dependiendo de la temperatura ambiente. Si no lo seca suficiente, el extendido se desprende; si lo deja secar demasiado, los protozoos se deforman. Introducir en las siguientes soluciones por el tiempo indicado:
 - Alcohol 50 % 5 min
 - Alcohol 70 % yodado 2- 5 min
 - Alcohol 70 % 2-5 min
 - Alcohol 50 % 3 - 5 min
- Lavar en agua corriente 3-10 min
- Solución mordente sulfato férrico amónico 10 minutos) Lavar en agua corriente 3 min

- Hematoxilina acuosa 10 minutos) Lavar en agua corriente 2 minutos
- Ácido pícrico saturado, diferenciador 10-15 minutos
- Lavar en agua corriente 15-30 minutos (Deshidratar por una batería de alcoholes en incremento 70 %, 95 %, y dos cambios en 100 % 2 min minutos en cada uno) Xilol 2 minutos.
- Colocar 1-2 gotas de permount, cubrir con cubre-objetos, dejar secar y observar con objetivo de inmersión.

Colorante de hematoxilina. Solución madre.

- Cristales de hematoxilina ----- 10 gramos
- Alcohol etílico de 95 % ----- 100 mL

Mezclar y dejar madurar varias semanas (entre 5- 6) en un frasco con tapón de algodón, a la luz, a temperatura ambiente. Para trabajar: agregar 0,5 mL de esta solución a 95 mL de agua destilada.

Ácido Pícrico:

- Ácido pícrico en cristales ----- 2 gramos
- Agua destilada ----- 100 mL

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

Alcohol al 70 %:

- Alcohol etílico puro ----- 70 mL
- Agua destilada ----- 30 mL

Mezclar y guardar en frasco rotulado y bien tapado.

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

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 gramos o 1 mL de heces). Las 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.
- Agite el frasco conteniendo la muestra fijada y verter 1 mL a un tubo de centrifuga.
- Si hubiere partículas muy gruesas, en este momento puede filtrarse por un embudo con gasa en 2 dobleces. Descartar la gasa y poner el embudo en solución desinfectante.
- Llenar el tubo con agua destilada y centrifugar 2 minutos a 2000 rpm.
- Descartar el sobrenadante. Este paso puede repetirse otra vez para eliminar el fijador en exceso.
- Agregar al sedimento un volumen igual de albúmina de Mayer, mezclar y extender finamente 1–2 gotas de esto sobre un portaobjetos rotulado.
- También puede colocar sobre portaobjetos 1-2 gotas de sedimento de heces, agregar 1–2 gotas de albúmina de Mayer, mezclar y extender finamente.
- Permitir que la preparación se seque unos minutos, dependiendo de la temperatura ambiente. So no lo seca suficiente, el extendido se desprende; si lo deja secar demasiado, los protozoos se deforman.
- Introducir en las siguientes soluciones por el tiempo indicado:

- Alcohol al 50 %	5 min
- Alcohol al 70 % yodado	2-5min
- Alcohol al 70 %	2-5min
- Alcohol al 50 %	3-5min
- Lavar en agua corriente	3–10 min
- Solución mordente sulfato férrico amónico	10 min
- Lavar en agua corriente	3 min
- Hematoxilina acuosa	10 min
- Lavar en agua corriente	2 min.

- Ácido pícrico saturado 10–15 min
- Lavar en agua corriente 15 – 30 min.

Control de la calidad

Preparar extendidos finos de heces que contengan estadíos de protozoos de determinada especie previamente identificada o de cultivos de protozoos; una coloración bien hecha depende de una fijación correcta y destaca claramente las características del núcleo y las inclusiones citoplásmicas.

Guardar toda muestra de heces y toda lámina positiva, debidamente identificada, para referencia y control. El personal que examina las láminas debe tener conocimientos actualizados y sólidos sobre morfología diferencial de protozoos. El laboratorio debe contar con material de consulta y referencia: fotografías, microfotografías, atlas, libros de texto (IIRT, 2018).

Problemas y su corrección:

- Para mantener las soluciones lo más limpias posibles, escurrir la lámina tocando brevemente un papel absorbente o una gasa con el extremo inferior de la misma antes de pasar a otra solución.
- Presencia de numerosos cristales amarillos u oscuros indica que el alcohol yodado no removió los cristales y que requiere más tiempo en dicha solución.
- Evitar la evaporación de los alcoholes manteniendo los frascos bien tapados.
- Si el xilol se pone lechoso al introducir una lámina, esto indica que la lámina todavía contiene agua. Los pasos anteriores no han deshidratado correctamente.
- Debe cambiar por lo menos el alcohol del paso anterior y el xilol y secar bien los frascos coplín antes de verter el nuevo.
- El extendido no debe dejarse secar en ningún momento durante la coloración.
- Los extendidos pueden permanecer toda la noche en cualquier cambio de alcohol al 70 % o xilol. Para los otros cambios mantener el tiempo indicado.

MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN.

Facilitan la observación de parásitos, estos pueden ser:

- Por flotación (técnica de Faust con sulfato de zinc), técnica de Willis con solución saturada de cloruro de sodio y técnica de Stheather o sacarosa, idónea para el estudio de las coccidias).

- Por sedimentación simple (copa cónica) o sedimentación por centrifugación (técnica de Ritchie o formol-éter). También aquí se encuentra la técnica de Teleman-Rivas.

MÉTODOS POR FLOTACIÓN.

Técnica de Willis (modificada por Basnuevo)

Propósito:

Es un método cualitativo, por concentración, por flotación. Este método fue creado por Willis en 1921 y es especialmente útil para los huevos de *Ancylostomídeos*. El método original usa sólo sal, pero en Cuba fue introducida hace más de 50 años una modificación que emplea azúcar y formol, y disminuye la cantidad de Cloruro de Sodio, y es en esa forma que se utiliza actualmente. Constituye un método de enriquecimiento de huevos de uso común, a través de un medio con una densidad de 1200, lo que permite concentrar los huevos de los helmintos más frecuentes (*Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides* y *Necator americanus*) (Vázquez, et al., 2012).

Se debe preparar la solución de alta densidad a base de sal, azúcar y una pequeña cantidad de formol.

Solución de alta densidad (1200) en las siguientes proporciones:

Cloruro de sodio	180 g.
Azúcar	500 g.
Formol al 40%	20 ml
Agua corriente	1200 ml.

- En un vasito plástico o de cristal de no más de 30 ml de capacidad, preferentemente cilíndrico o cónico con el extremo inferior más estrecho, se vierte hasta el borde sin que rebose, de 10 a 15 ml de la solución anterior y en ella se disuelven aproximadamente 2 gramos de las heces que se investigan. Esta debe hacerse con un aplicador desechable de madera o plástico, se deben extraer las grandes partículas no disueltas que resulten de la solución de las heces.
- Se coloca un portaobjetos sobre el vasito de manera que el líquido contacte con la superficie del portaobjetos y se mantiene así de 15 a 20 minutos.
- Pasado ese tiempo, se toma el portaobjetos con un movimiento de volteo rápido de manera que el líquido no se escurra de la lámina y se lleva al microscopio para su observación.

- Observar con ocular 10X y objetivo 10X, recorriendo toda la lámina con ese aumento, antes de que la preparación comience a secarse.

Ventaja:

Es especialmente útil para los huevos de *Ancylostomídeos* y de *Ascaris lumbricoides* en segundo lugar. Requiere de pocos recursos. Es muy fácil de realizar y consume poco tiempo.

Desventaja:

No concentra bien la mayoría de los huevos pesados como por ejemplo los de *Fasciola hepatica*. No es útil para protozoos.



Fotografía: cortesía de la Lic. Elisa Boucourt

Imagen 12. *Huevos de ancylostomídeos, obtenidos con la utilización de la Técnica de Willis*

Técnica de Faust o por 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 tapa, limpio, sin contaminantes (agua del inodoro, orina, tierra).

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.
- 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 es muy frágil.

Materiales:

- Hidrómetro para medir gravedad específica, rango 1000-2000.
- 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).
- Cubre-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

1. Identificar la muestra con el vaso y el tubo de ensayo a trabajar.
2. 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.
3. Filtrar a través de gasa humedecida a otro tubo de ensayo. Centrifugar a 1500- 2000 rpm por 2 minutos. Descartar el sobrenadante.
4. 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.
5. Centrifugar a 2000 por 2 minutos. Los tubos deben tener posición vertical en la centrífuga, no inclinada.

6. Sin sacar el tubo de la centrifuga, remover varias asadas de la película superficial y colocarlas sobre un porta-objetos, cubrir con un cubre-objetos. Esterilizar el asa por flameo.
7. Examinar sistemáticamente la preparación.
8. 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.
9. 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.
10. Puede ejecutarse este método cuando se reciben heces fijadas, para lo cual la solución de sulfato de zinc debe tener una densidad de 1.20. Para trabajar la muestra, mezclar bien las heces fijadas, filtrar si necesario y continuar con el procedimiento como se ha descrito.

Causas de error o resultados poco 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 difi culta 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 lumbricoides*.
- 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 (IIRT, 2018; Girard de Kaminsky, 2014).

Técnica de Flotación por Sheather

Propósito

Método efectivo y barato utilizado para separar, concentrar y recobrar ooquistes de *Cystoisospora 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 como la medición de ooquistes,

esporulación en el laboratorio, separación de esporozoítos y observación a través del microscopio fluorescente (IIRT, 2018; Girard de Kaminsky, 2014).

El hallazgo de ooquistes de *Cystoisospora belli* ha cobrado importancia desde el año 1983 en que se encontró el microorganismo en tres 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 inmunocompetentes, aumenta por día la tesis de su presencia en pacientes inmunodeprimidos, tanto VIH positivos como ya en la etapa de enfermo

El hallazgo de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en niños menores de cinco años, fundamentalmente desnutridos o con otra enfermedad predisponente, debe ser interpretado por el clínico y el resultado debe entregarse de forma inmediata. El hallazgo de *Cystoisospora belli* requiere informe inmediato al médico (IIRT, 2018; Girard de Kaminsky, 2014).

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 (IIRT, 2018; Girard de Kaminsky, 2014).

Materiales

- Vasitos de plástico para preparar suspensión de heces
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- Cubre-objetos 22 x 22 mm
- 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

1. Identificar los tubos de ensayo con la muestra a examinar.
2. Hacer una suspensión de una pequeña porción de las heces (aproximadamente 1 mL o 1 g) en un vasito plástico o tubo con la ayuda de un aplicador.
3. 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.
4. Equilibrar el tubo en balanza de dos platos.
5. Centrifugar a 1500 rpm por 2 minutos. Destapar. Decantar el sobrenadante.
6. Añadir un poco de solución fenolada azucarada al sedimento y agitar vigorosamente con un aplicador.
7. Completar con más solución hasta 2 cm bajo el borde del tubo sin dejar de agitar. Tapar con parafilm o tapón de hule.
8. Equilibrar el tubo en balanza de dos platos.
9. Centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos.
10. 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).
11. Flamear el asa en el mechero.
12. 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.
- b) Mezclar las heces con la pipeta Pasteur y aspirar una cantidad.
- c) Mezclar las heces, verter 2-3 ml en un tubo de ensayo rotulado, centrifugar, descartar el sobrenadante al frasco con la muestra original de heces o en un recipiente con desinfectante y continuar trabajando con el sedimento.

Heces con moco:

- a) Tomar una porción del moco y examinar al microscopio como frote directo.
- b) Utilizar un mucolítico (10 gotas de hidróxido de potasio (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.
- c) Una vez disuelto, agregar agua destilada, mezclar, centrifugar, decantar y continuar la técnica utilizando el sedimento.

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 parvum*, buscar los ooquistes con objetivo de inmersión. Deberá asegurarse de la identificación continuando con una coloración ácido resistente modificada.

- 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 *Cystoisospora belli* pueden tomar un color rosa pálido en su interior. Habrá que diferenciar entre levaduras, *Blastocystis hominis*, otras estructuras. Se deberá ensayar el método en el laboratorio hasta perfeccionar la técnica antes de implementarlo (IIRT, 2018; Girard de Kaminsky, 2014).

MÉTODO POR SEDIMENTACIÓN

Método de la Copa Cónica

Propósito:

Este método sirve especialmente para huevos pesados de trematodos como los de *Fasciola hepática* (California Childcare Health Program, 2020; IIRT, 2018).

1. Se toma una muestra de 5 gramos de heces, y se mezcla con 200 ml de agua. Opcionalmente se pueden colocar 5 ml de colorante (verde malaquita) y agregar 5 ml de solución de detergente y se agita con un aplicador.
2. Se filtra la suspensión y se recoge en una copa cónica graduada entre 250 y 500 ml.

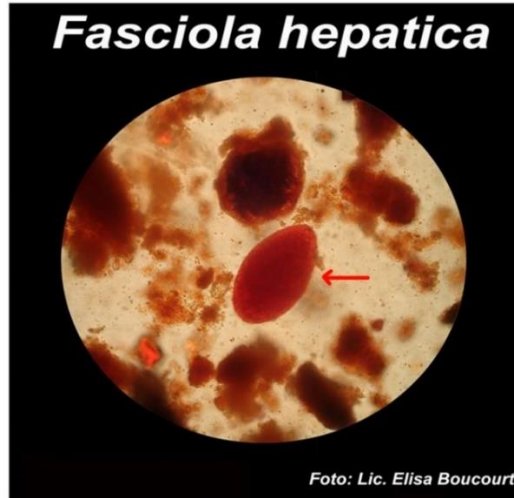
3. Se deja reposar 1 hora, se decanta el sobrenadante y se le agrega agua cuidadosamente de nuevo mezclando con el aplicador. Se deja reposar otra hora más.
4. Puede repetirse el lavado hasta que el líquido sobrenadante salga claro, aunque generalmente con dos veces es suficiente.
5. Se decanta cuidadosamente de nuevo el sobrenadante.
6. Con la pipeta Pasteur con bulbo, o con una pipeta capilar larga provista de un bulbo de caucho, se toma de la capa superior del sedimento la muestra que se coloca en un portaobjetos y se pone un cubreobjetos.
7. Se toman otras muestras de la capa media e inferior del sedimento.

Solución Colorante		Solución Detergente	
Verde malaquita	1g	Detergente	5 g
Agua destilada	100 mL	Agua destilada	100 mL



Fotografía: cortesía de Lic. Boucourt.

Imagen 13. *Copa cónica (muestra de heces).*



Fotografía: cortesía de Lic. Boucourt.

Imagen 14. Examen directo con lugol (muestra de heces). Huevo de *Fasciola hepatica* observado a través del microscopio óptico con objetivo 40X.

Técnica de Ritchie (concentración de formol-éter/etil acetato).

Propósito:

Utilizada fundamentalmente para concentrar quistes de protozoos y huevos de helmintos.

Ventajas

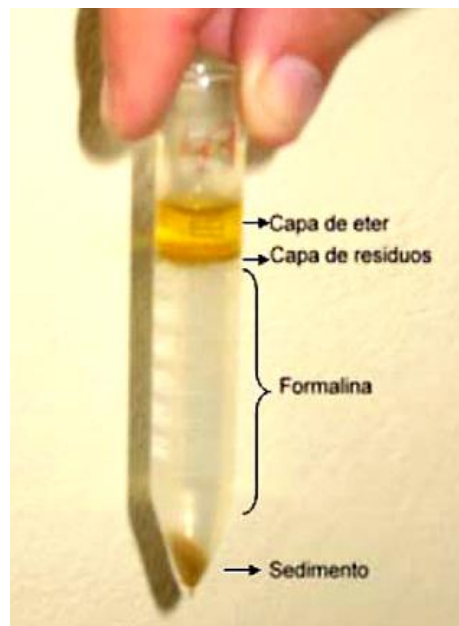
Puede utilizarse con heces frescas o heces fijadas previamente en formalina o en Mertiolate-Iodo-Formalina (MIF); los quistes de protozoos no se deforman; puede demorarse en examinar el sedimento más que en métodos por flotación; es adecuado tanto para huevos de nemátodos como de céstodos y tremátodos.

Desventajas

Los huevos infértiles de *Ascaris lumbricoides* y en ocasiones quistes de *Giardia lamblia* 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. No es adecuada para la observación de trofozoitos que que estos por lo general se destruyen por el centrifugado.

1. Si la materia fecal es dura se agrega solución salina y se mezcla hasta que quede líquida en cantidad aproximada de 10 ml.
2. Se pasará por una gasa doble y húmeda, una cantidad aproximada de 10 ml de la materia fecal líquida a un tubo de centrifuga de 15 ml.
3. Se centrifugará a 1500-2000 r.p.m. por dos minutos, y se decantará el sobrenadante.

4. Se diluirá el sedimento en solución salina, se centrifugará como antes y se decantará. Este paso se puede repetir tantas veces sea necesario hasta que el sobrenadante salga claro.
5. Se agregará al sedimento, 10 ml de formol al 10 %, y se mezclará bien, reposar por cinco minutos.
6. Se agregará 3 ml de éter o de acetato de etilo, se tapaná el tubo con un tapón de goma y se agitará fuertemente durante treinta segundos. Se destapaná cuidadosamente.
7. Se centrifugará a 1500 r.p.m. por cinco minutos más. Se formarán cuatro capas distribuidas así:
 - a) Éter en la superficie, anillo con restos de materiales fecales, capa de formol.
 - b) Capa de sedimento pequeño que contiene los huevos, quistes y otros elementos.
 - c) Con un palillo se aflojará el anillo con restos de materia fecal de las paredes del tubo, para decantarlo cuidadosamente con las tres capas superiores. Se podrá limpiar con un algodón las paredes del tubo para evitar que el sedimento se contamine con los restos del anillo de residuos.
 - d) Se mezclará el sedimento con la pequeña cantidad de líquido que baje por las paredes del tubo y se harán preparaciones en fresco y con lugol para ver al microscopio (Campo, 2015).



Fotografía: cortesía de la Dra. Alina Izquierdo.

Imagen 15. Técnica de Ritchie o de formol-éter/etil acetato (muestra de heces).

MÉTODOS CUANTITATIVOS

- Método de Stoll (por dilución)
- Método de Kato-Katz (por frotis grueso)

Método de Kato (variación Katz), en 41,7mg de heces

Propósito:

Su principio básico consiste en aclarar con glicerina un frote grueso de heces no diluidas. El método de Kato, originalmente introducido por japoneses para hacer encuestas epidemiológicas de la infección causada por *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* y *Schistosoma japonicum*, 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 (California Childcare Health Program, 2020; IIRT, 2018).

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 colorante 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.

Nota: 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 por 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.
- Templete de plástico del tamaño seleccionado, en este caso de 6 mm de diámetro por 1.5 mm de grosor (reusable, lavado y desinfectado).
- 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

1. Extender el papel periódico, manila o de estraza sobre la mesa de trabajo.
2. Identificar el porta-objetos con la muestra a examinar. Colocar sobre éste el templete de plástico.
3. Con la espátula o paleta de madera tomar una cantidad de heces y colocarla sobre una superficie plana (tapadera plana del frasco, papel periódico).
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. 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.
8. Dar 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. Para huevos de *Ancilostomídeos*, se recomienda examinar la preparación apenas aclare un poco (5- 15 min según temperatura y humedad) antes que se vuelvan invisibles
9. Observar al microscopio óptico con objetivo de 10X. Contar sistemáticamente y en forma individual todos los huevos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, o *Ancilostomídeos* en toda la preparación.
10. Multiplicar el resultado por 24 e informar: No. de huevos/gramo de heces. Descartar material usado en desinfectante. Los huevos de *Taenia* se confirmarán si se observan los ganchos de la oncósfera con objetivo 40X.

Procedimiento

1. Las heces se filtran con la malla sobre un papel de deshecho.
2. Con las heces coladas se rellena el orificio de la plaquita plástica colocada previamente sobre un portaobjetos.
3. Después de retirar la plaquita plástica quedará sobre el portaobjeto una porción de las heces que tomará la forma y volumen del molde previamente usado.
4. Se coloca el acetato embebido (previamente en la solución de glicerina-verde malaquita, no menos de 24 horas) sobre las heces que se moldearon en el orificio de la plaquita
5. El frotis se disemina comprimiéndolo contra una superficie sólida y lisa hasta que alcance una forma de moneda (IIRT, 2018).

La técnica de Kato-Katz es la de elección para el diagnóstico de las geohelmintiasis o infecciones por nematodos transmitidos por contacto con el suelo, establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual ha aprobado y estandarizado el método de Kato, variación Katz para la realización de encuestas y para monitoreo y evaluación periódicos de los resultados de control, 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.

Cuando se realiza de forma adecuada, el método de Kato, variación Katz es apropiado para las cuatro especies de geohelminths; alteraciones u omisiones pueden conducir a falsos

negativos, según lo refieren importantes especialistas. (IIRT, 2018; Girard de Kaminsky, 2014).

Técnica de concentración Amido Schwartz. (tinción de taranto).

Propósito:

El propósito de esta técnica es identificar huevos, larvas de helmintos y quistes de protozoarios (en el menor volumen la mayor cantidad de huevos y larvas presentes).

Materiales:

- Frasco de toma de muestra de materia fecal
- Gasa cuádruple
- Embudo
- Centrífuga
- Tubo de centrífuga de plástico de 15 ml
- Palillos de plástico
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Colorante Amido Schwartz
- Varilla de madera o de vidrio

Procedimiento

1. Es recomendable, emplear una técnica de concentración, preferiblemente por centrifugación o simple sedimentación, con la cual el operador se encuentre más habituado y por ende capacitado.
2. En el mismo frasco de toma de muestra, mezclar cantidades iguales de materia fecal fresca y agua del grifo, homogeneizarla hasta obtener una consistencia líquida. En caso de recibir heces con conservante, las larvas se encontrarán muertas, dificultando su identificación y clasificación. Además, el uso de conservante impide la utilización de la muestra para técnicas como Baermann o Harada Mori.
3. Filtrar aproximadamente 5 ml del líquido a través de gasa cuádruple colocada en un embudo, depositando el líquido en un tubo de centrífuga de 15 ml plástico resistente al calor, para su posterior reutilización.
4. Centrifugar a 3000 r.p.m durante 5 minutos, descartar el líquido sobrenadante.
5. Agitar violentamente el sedimento que quedó depositado en el fondo del tubo hasta homogeneizarlo con el líquido excedente.
6. Colocar con palillos de plásticos sobre un porta-objeto una gota del sedimento y una gota de tinción Amido Schwartz.

Nota: para preparar la tinción pesar 30 microgramos de colorante negro de Amido más 10 ml de agua destilada, mezclar con varilla y calentar a baño maría para disolver los cristales y evitar la precipitación (evitar hervor) por 2 a 5 minutos. El preparado debe ser sometido a nuevos baño María si se observan cristales (cada 2 a 3 semanas). Si se ve tono rojizo al microscopio es indicador de precipitación.

- Mezclar colorante y muestra con varilla de madera vidrio o plástico y cubrir con cubre-objeto.
- Observar al microscopio a 10X y 40X para identificar larvas, huevos y quistes de protozoarios.

CULTIVOS PARASITOLÓGICOS

Se utiliza poco en el diagnóstico de parasitosis intestinales (medio de Boeck para *Entamoeba histolytica/dispar*, método con arena o carbón vegetal o con papel de filtro-Harada Mori para el aislamiento e identificación de larvas de *Strongyloides stercoralis* y *Ancilostomídeos*).

Son útiles para realizar preparaciones permanentes y almacenar o remitir las muestras a laboratorios especializados; con ellas se obtienen detalles morfológicos más exactos, permitiendo diagnosticar mejor las especies.

MÉTODOS DE DESARROLLO PARA HELMINTOS

Técnica de placa de agar

Propósito:

Favorecer el desarrollo de las larvas (estadio filariforme) de helmintos (*Strongyloides stercoralis* y de *Ancylostomídeos*) para poder realizar la diferenciación taxonómica.

Materiales:

- Placa de ágar de 10 cm de diámetro.
- Agar nutritivo (Brittania, DIFCO o similar).

Procedimiento para preparar el medio de cultivo

1. Preparar placa de agar nutritivo en la concentración que indica el fabricante.
2. Pesar polvo y colocar en un Erlenmeyer.
3. Agregar la cantidad correspondiente de agua destilada y mezclar con varilla de vidrio.
4. Autoclavar por 20 minutos a 1,5 atmósferas.

5. Distribuir en placa de Petri a un espesor de 0,5 cm.
6. Dejar solidificar a temperatura ambiente.
7. Conservar en heladera hasta el momento de uso.

Método de cultivo:

1. Tomar 1 gr de material fecal fresca (sin uso de conservante) y colocar sobre el centro de la placa.
2. Tapar la placa.
3. Incubar a 37 °C por 48 horas. (se debe poner un vaso de agua en la estufa para favorecer con un ambiente húmedo. Se debe realizar una primera lectura a las 24 horas)
4. Observar en lupa estereoscópica o microscopio 4X para identificar larvas migrantes y huellas serpinginosas.

En caso de observar larvas:

1. Retirar la porción del agar que contiene el material fecal.
2. Lavar con 3 o 4 ml de agua destilada a temperatura ambiente y recoger con pipeta Pasteur en un tubo de centrífuga.
3. Centrifugar a 3000 rpm x 5 minutos
4. Descartar el sobrenadante.
5. Usando una pipeta de Pasteur, se debe tomar una gota del sedimento en el fondo del tubo y colocarla para examinar bajo el microscopio a 10X y en caso de observar larvas, las mismas se identifican taxonómicamente a 40X (tener cuidado de no re-suspender el sedimento antes de tomar la muestra).

También se puede observar directamente utilizando el microscopio invertido para ver la presencia o ausencia de larvas, luego se coloca entre porta y cubre para hacer la diferenciación taxonómica (IIRT, 2018; Girard de Kaminsky, 2014).

Método de Harada-Mori.

Propósito:

Técnica que permite el desarrollo de huevos a estadios larvales de los nemátodos permitiendo su diferenciación morfológica. Es útil, principalmente, para la obtención de larvas rhabditiformes y filariformes de anquilostomídeos y strongiloideos.

Materiales.

- Tubos 13 x 100, 16 x 150 o 16 x 180 mm.
- Papel filtro.
- Agua corriente estéril.
- Pinza curva con aplicador.
- Tapón de goma o corcho.
- Parafilm o cinta adhesiva.
- Solución fisiológica
- Alcohol 30 % y Formalina 5 %.

Procedimiento

1. Preparación del tubo:
 - Agregar al tubo 1 ó 2 mL de agua destilada o solución salina.
 - Cortar una tira de papel filtro de 12-15 x 1,5-2 cm dependiendo del diámetro y tamaño del tubo
 - Hacer una muesca en el extremo inferior del papel
2. Extendido de la muestra:
 - Con el aplicador, extender la muestra de heces (0,5 a 1 g) sobre la superficie del papel, dejando libre los extremos.
 - Colocar cuidadosamente el papel filtro dentro del tubo, evitando el contacto de las heces con el líquido
 - - Tapar el tubo y rotular con los datos del paciente.
 - Incubar a 27 °C – 37 °C por 4 a 10 días.

Observación.

- Durante la incubación, con ayuda de una lupa o con el microscopio (estereoscopio), se puede observar el desarrollo de larvas en el medio líquido.
- Para estudiar las larvas se elimina el papel filtro, se toma una gota del líquido del fondo del tubo, se coloca en una lámina portaobjeto o lámina excavada y se observa al microscopio.
- La diferenciación morfológica se hará siguiendo la clave.
- Las larvas pueden conservarse fijándolas en: alcohol al 25 % o 30 %, o de lo contrario en formalina al 5 %.

Nota: las larvas de *Strongyloides stercoralis* se podrán encontrar a partir del segundo día, por el contrario, las de *Ancilostomídeos* pueden demorar 7 días, al cabo de los cuales ambas están en estadio filariforme que permite su identificación taxonómica.

- Destapar los tubos, descartar el papel de filtro y colocar el líquido en un tubo de centrífuga.
- Centrifugar 1000 rpm x 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Usando una pipeta de Pasteur, tome una gota del sedimento en el fondo del tubo y colóquela para examinar bajo el microscopio a 10x y en caso de observar larvas, agregar una gota de lugol para inmovilizarlas, las mismas se identifican taxonómicamente a 40x; hay que tener cuidado de no resuspender el sedimento antes de tomar la muestra (IIRT, 2018; Girard de Kaminsky, 2014).

	<i>Ancilostomídeos</i>	<i>Strongyloides stercoralis</i>
Larva filariforme:	-miden 500 x 14-20 um, con vaina -extremo caudal puntiagudo -esófago ocupa un tercio de la longitud corporal, sin engrosamiento.	-mide 500 x 14-20 um, sin vaina -extremo caudal bifurcado o romo, -esófago ocupa la mitad de la longitud corporal, sin engrosamiento.
Larva rabditiforme:	-miden 100-150 x 15-17 um, -cavidad bucal larga (15 um) -esófago ocupa un tercio de la longitud corporal con dos engrosamientos -primordio genital pequeño (7 um) -poro anal posterior a 80 um.	-mide 200-300 x 15-18 um -cavidad bucal corta (4 um) -esófago ocupa un tercio de la longitud corporal con dos engrosamientos -primordio genital grande (22 um) -poro anal a 50 um del extremo posterior.

Figura: cortesía de la Dra. Alina Izquierdo.

Figura 3. Características diferenciales de las larvas de helmintos

Además de los helmintos, algunos protozoos intestinales del hombre pueden ser cultivados en medios artificiales. Estos cultivos pueden servir como complemento de otros métodos diagnósticos, con fines académicos, para garantizar organismos en mayor cantidad para fines investigativos y para preparar los antígenos. Los protozoos cuyo cultivo han demostrado ser útiles para su identificación son *Entamoeba histolytica/dispar*, *Giardia lamblia* y *Balantidium coli* (Álvarez, et al., 2020; Puerta-Jiménez, Vicente-Romero, 2015).

MEDIOS DE CULTIVO PARA PROTOZOOS

Los medios de cultivo para protozoos más usados son: medio Pavlova, medio Diamond y medio de Tanabe y Chiba modificado para *Entamoeba histolytica/dispar*.

Medio Pavlova

Constituyentes

- Fosfato ácido de sodio 12 H₂O----- 95 g
- Fosfato de potasio---- 1,15 g
- Cloruro de sodio----- 20 g
- Extracto de levadura----- 4 g
- Agua destilada----- 2750 mL
- Adicionar: 37,5 mL de suero de caballo, inactivado a 56 °C por 30 minutos, 2,75 g de almidón de arroz estéril, 1000 UI/mL de penicilina G sódica y 50-100 ug/mL de estreptomicina.

Medio Diamond

Constituyentes.

- Trypticase BBL----- 2 g
- Extracto de levadura DIFCO---- 1 g
- Maltosa 0,50 g Clorhidrato de L-cisteína---- 0,10 g
- Acido ascórbico 0,02 g Agar---- 0,05 g
- Agua destilada----- 1000 mL

Procedimiento.

1. Ajustar el pH con hidróxido de sodio 1N a 6,8 – 7,0, distribuir en cada tubo 9 mL, autoclavar a 120 °C por 15 minutos y almacenar a 4 °C hasta su uso (máximo un mes).
2. Agregar a cada tubo en el momento de la siembra, 1 mL de suero sanguíneo estéril, penicilina G potásica 1000 UI/mL y sulfato de estreptomicina 1 mg/mL.
3. Llevar el registro en una ficha

Medio de Tanabe y Chiba modificado para Entamoeba histolytica/dispar.

Constituyentes.

- Agar 2 g
- Asparagine 2 g
- Solución Ringer 100 mL

Procedimiento

1. Juntar los constituyentes y disolver en baño maría.
2. Repartir 3 mL en tubos de 15 x 150 mm, autoclavar a 100° C por 30 minutos y dejar solidificar en plano inclinado.
3. Agregar a cada tubo 0,5 a 1 mL de solución Ringer al que se le ha añadido previamente suero de caballo 1 %. Solución Ringer Cloruro de sodio 0,90 g
4. Cloruro de potasio 0,42 g
5. Bicloruro de mercurio 0,034 g
6. Bicarbonato de sodio 0,01/0,038 g Glucosa 0,10 o 0,26 g
7. Agua destilada 100 mL Autoclavar a 15 libras de presión por 15 minutos y almacenar a 4 °C hasta el momento de su uso.

Agar carbón.

Constituyentes.

- Agar 2 g
- Carbón 0,50 mg
- Agua destilada 100 mL

Procedimiento.

1. Homogeneizar o licuar y repartir en tubos de 13 x 100 mm o placas Petri 10 x 150 mm, inocular la muestra y seguir el mismo procedimiento anterior (Podría utilizar el microcultivo usando el agar en lámina portaobjeto).

RESUMEN

El examen directo de las heces en Parasitología, permite la observación de los microorganismos al microscopio, en vivo, sin emplear ninguna tinción previa. Es muy útil

cuando existe necesidad de visualizar, ya sea por métodos macroscópicos o microscópicos, alguna característica del organismo vivo, como el movimiento de algunos parásitos como los protozoos (por la emisión de **pseudópodos** como en el caso de *Entamoeba histolytica/dispar*, flagelos como en *Giardia lamblia* o cilios como en *Balantidium coli*), así mismo facilita el análisis de la morfología de los protozoos.

Los exámenes coproparasitológicos, en especial las técnicas de concentración como la de formol-éter (Ritchie) también permiten diagnosticar patologías facilitando su prevención y/o detección precoz como sucede en el caso de las enteroparasitosis, así mismo constituyen el método idóneo para la promoción del diagnóstico diferencial entre diversas patologías infecciosas, lo cual ofrece una opción de gran ayuda para la prescripción de la terapéutica específica. De forma similar, facilitan la evaluación de un proceso infeccioso en evolución, contribuyendo a seleccionar la terapia más precisa, así como se emplean con mucha eficacia, en la estimación de una acción, latencia o recurrencia de una parasitosis ya sea intestinal como tisular (Campo, 2015).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, M.J., Belhassen, M., Flores, M.D., Pérez de Ayala, A., Sulleiro, E. (2020). 69. Diagnóstico de parasitosis importadas en España. Álvarez-Martinez M J (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
<https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento69.pdf>
- Aquino, M.J., Vargas, G.B., López, B., Neri, E., Bernal, R. (2012). Comparación de dos nuevas técnicas de sedimentación y métodos convencionales para la recuperación de parásitos intestinales. *Revista Mexicana de Patología Clínica Mededica Lab*, 59(4), 233-242. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=36833>.
- California Childcare Health Program [CCHP] (2020) Cómo evitar la propagación de enfermedades en la guardería o centro de cuidado infantil.
<https://www.healthychildren.org/Spanish/health-issues/conditions/prevention/Paginas/prevention-in-child-care-or-school.aspx>
- Campo, L.F., Botero, L.E., Gutiérrez, L.A., Cardona, J.A. (2015). Reproducibilidad del examen directo de heces y de la concentración formol-éter y validez del examen directo de heces para el diagnóstico de parásitos intestinales. *Archivos de Medicina*, 11(4), 4 <http://hdl.handle.net/10495/20784>

- De la Parte, M.A., Bruzual, E., Brito, A., Hurtado, M.P. (2005). *Cryptosporidium* spp. y Criptosporidiosis. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*, 25 (1), 06-14.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000100003&lng=es&tlng=es
- Fabián de Estrada, M., Otárola, J., Tarqui, K. (2014). Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. Serie de Normas Técnicas 37. 2da. Ed. Ministerio de Salud e Instituto Nacional de Salud Perú. <https://repositorio.ins.gob.pe/handle/INS/1147>
- Girard de Kaminsky, R. (2014). Manual de Parasitología. Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas. 3ra. Ed. OMS-OPS.
<http://www.bvs.hn/Honduras/Parasitologia/ManualParasitologia/pdf/ManualParasitologia3.pdf>
- IIRT [Instituto de Investigaciones en Enfermedades Tropicales] (2018) Manual de Técnicas básicas para diagnóstico parasitológico. Sede Regional Orán. Argentina.
http://www.iiet.unsa.edu.ar/sites/default/files/Manual%20IIRT_0.pdf
- IVAMI [Instituto Valenciano de Microbiología] (2019) *Microsporidium*-*Microsporidia* (*Encephalitozoon* spp., *Enterocytozoon bieneusi* y otros géneros): Diagnóstico molecular; Identificación de especies (PCR y secuenciación).
<https://www.ivami.com/es/microbiologia-clinica/6252>
- Musto, A.I. (Coord) (2013). Manual de Microbiología y Parasitología. 2^{da} ed. Universidad Nacional Arturo Jauretche. Argentina. <https://unaj.edu.ar/wp-content/uploads/2018/06/Manual-de-Microbiologia-y-Parasitologia-2013.pdf>
- Puerta-Jiménez, I., Vicente-Romero M.R. (2015). Parasitología en el laboratorio. Guía básica de diagnóstico I. 3^{ro} Ciencias. Área de Innovación y Desarrollo, SL. España.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=581324>
- Restrepo, I.C., Mazo, L.P., Salazar, M.L., Montoya, M.N., Botero, J.H. (2013). Evaluación de tres técnicas coproparasitoscópicas para el diagnóstico de geohelminths intestinales. *Iatreia*, 26(1), 15-24.
<http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v26n1/v26n1a02.pdf>
- Rosales, J.A., Bautista, K.M. (2020). Comparación de tres métodos de concentración de enteroparásitos en muestras fecales humanas. *Rev cubana Med Trop*, 72(2), e494.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602020000200008
- Rueda, M.M., Rodríguez, C.A, Valladares, W.C., Sosa, W.H., Canales, M. (2020). Contribución al servicio de la mejora de la salud infantil: Experiencias de campo realizada durante ocho años por estudiantes y docentes de parasitología en

diferentes zonas rurales de Honduras. *Revista UNAH Sociedad*, 2(V), 84–95.
<https://doi.org/10.5377/rus.v2iV.10671>

Vázquez, J. I., Cedeño, M. C., Collazo, M.; Jiménez, M. S., Quintero, L.J. (2012). Folleto de protozoología y técnicas parasitológicas. *Rev Elect de las Ciencias Médicas en Cienfuegos*, 10(2). <http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/2019>

CAPITULO 3.

PROCEDIMIENTOS ESPECIALES Y DIAGNÓSTICO INDIRECTO EN PARASITOLOGÍA

CAPITULO 3.

PROCEDIMIENTOS ESPECIALES Y DIAGNÓSTICO INDIRECTO EN PARASITOLOGÍA

Dra. Alina Izquierdo Cirer, MSc.

Lic. Elisa Boucourt Rodríguez, MSc.

Lic. Melvin Fabricio Jiménez Manzaba.

Q.F. Stalin Martínez Mora, MSc.

INTRODUCCIÓN

Mediante los procedimientos especiales y las técnicas de diagnóstico indirecto, se puede realizar la detección de otros componentes parasitarios tales como antígenos, anticuerpos, ácidos nucleicos, células, enzimas entre otras moléculas que contienen los parásitos, que son capaces de excretarlas o de desencadenar su presencia como en el caso de las inmunoglobulinas (respuesta del hospedero) y los linfocitos T CD 4 y T CD 8, ambos de gran importancia en la inmunidad celular que permite combatir fundamentalmente la infección por protozoos intestinales y tisulares.

De esta forma se agrupan en: técnicas inmunológicas directas (permiten la detección de antígenos como aglutinación de látex) e indirectas, que facilitan la detección de los anticuerpos (como la técnica de precipitación en gel de agar, la técnica de aglutinación directa y en partículas, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta, quimioluminiscencia), las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnicas de inmunocitoquímicas, métodos imagenológicos, entre otros de gran importancia también (Fernández, 2020)

Las técnicas serológicas para detectar antígenos o anticuerpos, desde el punto de vista analítico, viabilizan poder determinar la sensibilidad (capacidad del método diagnóstico para detectar las menores concentraciones posibles de los anticuerpos (o antígenos) buscados, así como la especificidad, la cual expresa la capacidad de ese método para diferenciar los anticuerpos específicos (o antígenos) buscados de otros presentes en la muestra analizada.

Mientras que, desde el punto de vista clínico, permiten medir la sensibilidad expresada en la capacidad que posee para diagnosticar casos positivos en el conjunto de personas estudiadas, así como la especificidad que se traduce en la capacidad de determinar resultados verdaderos.

De esta forma y teniendo en cuenta la finalidad de los exámenes que se realicen, se clasifican en las técnicas de screening, que se emplean para el estudio de grandes poblaciones y las técnicas confirmatorias, de gran utilidad para confirmar un diagnóstico específico (Fernández, 2020; IIRT, 2018).

MÉTODO ESPECIAL DE DIAGNÓSTICO

Método de Graham o Método de la cinta adhesiva transparente

Principio:

Hembras de *Enterobius 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.

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 defeque, durante la noche o inmediatamente al levantarse por la mañana (*E. vermicularis*) o en cualquier momento (*Taenia*) antes del examen. Este método debe su nombre a Graham quien introduce la cinta de celofán adhesiva para el diagnóstico de *Enterobius vermicularis*. Comúnmente se observan los huevos del parásito, pero en ocasiones pueden observarse hembras grávidas de *Enterobius* con el útero repleto de huevos (Girard de Kaminsky, 2014, IIRT, 2018).

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

- 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.

- Al momento de tomar la muestra, levantar la cinta suavemente del portaobjetos, tomándola por la parte etiquetada.
- 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.
- Se le dan instrucciones al paciente para que no se bañe ni defeque para evitar el arrastre mecánico de los huevos de *E. vermicularis*. 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. Inclinar la persona a examinar de manera que quede expuesta la región anal. Presionar la cinta adhesiva contra dicha región, hacia la izquierda y la derecha, teniendo cuidado de cubrir toda el área entre la porción seca y la húmeda.
- Se toma un depresor y en un extremo se coloca la cinta adhesiva transparente con la parte adherente hacia fuera, sujetándolo fuertemente entre el pulgar y el índice.
- Volver a colocar la cinta sobre el porta-objetos y descartar el baja-lenguas.
- La muestra puede transportarse o guardarse protegida, hasta el momento del examen.
- 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.
- El xilol (puede ser tolueno) aclara la preparación, elimina las burbujas de aire y hace más visibles los huevos. Examinar inmediatamente al microscopio.
- Pegar la cinta sobre el portaobjetos, poner el nombre que identifique a la persona en el sobre que envuelve la lámina.
- Mirarla al microscopio con el lente ocular 10X, cambiando a 40X en caso de duda.

Técnica de Baermann modificada con cultivo de heces

Propósito:

Este método se emplea especialmente para la concentración de larvas de nematodos (método de elección para larvas de *Strongyloides stercoralis*) y puede servir para concentrar otros parásitos como los trofozoitos de *Balantidium coli*. Se basa en las propiedades del higrotropismo y termotropismo positivo. Es decir que las larvas de helmintos y trofozoitos de protozoos que tengan estas propiedades migrarán hasta la parte inferior del embudo donde estará el agua a una temperatura más alta (Girard de Kaminsky, 2014, IIRT, 2018).

Muestra:

Heces frescas (no conservadas). No deben ser refrigeradas, ya que esto inmoviliza las larvas y evita la migración de las mismas al agua.

Materiales:

Preparación de un aparato de *Baermann* (figura 4): se toma un embudo de vidrio con 250 mL de capacidad, en el tallo se le coloca un pequeño tubo de goma o manguera, el cual se mantiene aprisionado con unas pinzas. En la parte ancha del embudo se colocará una tela de alambre cubierta por una gasa con cuatro dobleces o tela de sábana. El embudo se mantiene en posición vertical dentro de un anillo de metal, el cual quedará sujeto a un soporte universal.

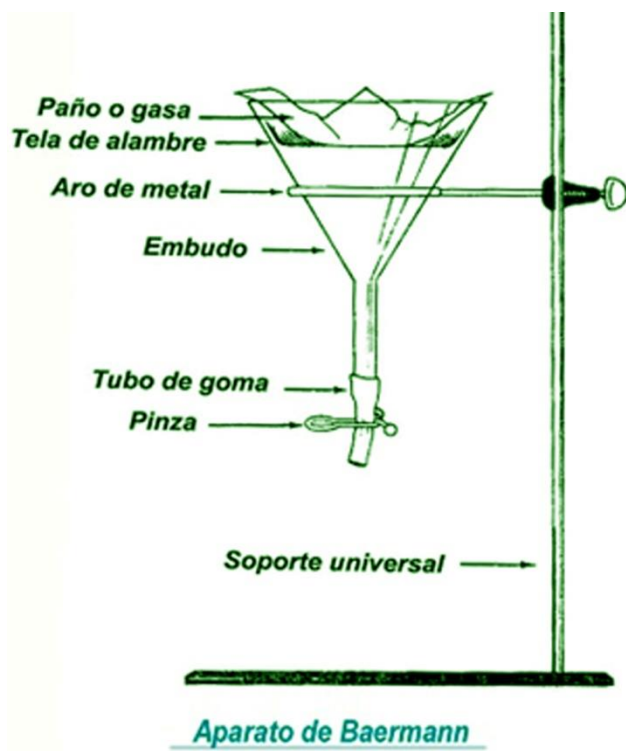


Imagen elaborada por la Lic. Elisa Boucourt.

Figura 4. Esquema del aparato de Baermann

- Depresores de madera
- Pipetas Pasteur con bulbo de goma
- Agua corriente a una temperatura de 37 a 39 °C
- Láminas portaobjeto (7,5 x 2.5 cm) y cubreobjeto (22 x 22 mm)
- Frascos con desinfectante para descartar material.

Procedimiento:

1. Se coloca el embudo sobre el soporte, con las pinzas cerradas y sobre la parte ancha del embudo se pone la tela de alambre sobre la cual se colocarán algunas bandas de gasas o tela de sábana. El tallo del embudo recibirá un trozo de caucho provisto de una pinza
2. Se colocan de 8 a 10 gramos de heces sobre la gasa.
3. Se llenará el embudo con agua, a 37-39 °C de manera que las heces queden en contacto con el agua a través de la gasa.
4. Dejar en reposo durante una hora, tiempo en el cual las larvas en las heces pasarán al agua tibia, acumulándose en el tubo de goma.
5. Abrir las pinzas y recibir el agua en el vaso para precipitarlo o en los tubos.
6. Tomar una gota del sedimento y colocarla sobre un portaobjetos, cubrir con una laminilla cubreobjetos y observar al microscopio. La muestra de agua puede ser sometida a una centrifugación de un minuto a 1500 r.p.m.
7. Aspirar el sedimento con una pipeta de Pasteur.
8. Colocar una gota en un portaobjetos, agregar una gota de lugol y cubrir con una laminilla cubreobjetos.
9. Observar al microscopio con objetivo 10 X, pasar a 40 X si hiciera falta observar algunos detalles a más aumento.

Materiales

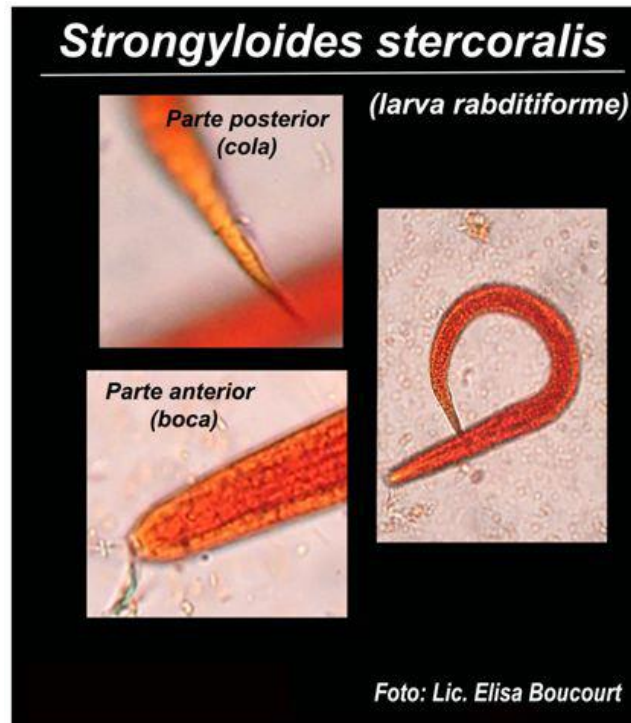
- Carbón animal o vegetal (granulado o en polvo)
- Placa de Petri
- Hojas de papel Tissue (Kimwipes Kkimtech; Kimberley-Clark)
- Colador de té con malla de alambre
- Manguera de silicona
- Tubo de 50ml.
- Pipeta de Pasteur
- Centrífuga
- Embudos
- Clamps
- Soporte para embudos
- Pinzas para clamppear

Procedimiento

1. Colocar entre 5 a 10 grs de muestra luego de realizar las otras técnicas.
2. Mezclar materia fecal fresca con carbón hasta obtener una mezcla de consistencia similar al barro (suficientemente húmeda y sólida como para adherirse al palillo mezclador).
3. Esta mezcla colocarla en una placa de Petri con un fondo de papel tisue húmedo, y luego cubrirla con otra piasa de papel tisue, tapar la placa e incubarla toda la noche en estufa a 28 °C.
4. Preparar el aparato de Baermann, que consite en un embudo con una manguera flexible, de modo que, al momento de usarla, se pueda clampearse del otro extremo. Colocar agua caliente (35 a 40 °C) en el sistema de Baermann en el embudo con la manguera clampeada.
5. Colocar un colador sobre el embudo y sobre el mismo colocar la mezcla hasta que quede en contacto con el agua, sin cubrir la materia fecal para no alterarla.
6. Cuanto más caliente el agua, más móviles son las larvas (37 a 40 °C es lo más caliente que toleran). Algunas larvas de nematodos son termotáxicas y se mueven hacia el agua caliente en el embudo (la superficie se enfría más rápido que el medio del embudo).
7. Nota: En vista que se buscan larvas vivas, cualquier cosa que se haga con la materia fecal que pueda matar las larvas debería ser evitado (no dejar que se seque, no poner en formol, no congelar y conservar en la nevera menos de 24 horas ya que puede comprometer la motilidad de las larvas).
8. Cuando la larva se coloca en agua, comenzaran a moverse de manera randómica y a ciertos intervalos de tiempo algunos de ellos van a migrar a través del papel y caerán en el agua. Dado que no pueden nadar, se hundan hacia el fondo y se acumulan allí.
9. Dejar reposar por una hora.
10. Cuanto más se espere, más larvas van a caer al fondo. No dejar pasar mucho tiempo ya que la materia fecal comenzará a desintegrarse y pasar a través del papel, acumulándose junto a las larvas lo que no es conveniente.
11. Abrir la pinza que presiona la manguera.
12. Escurrir el líquido en un tubo de 50 mL
13. Centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos
14. Descartar el sobrenadante.

Se emplea una pipeta de Pasteur, tomar una gota del sedimento en el fondo del tubo y colócala para examinar bajo el microscopio a 4X y en caso de observar larvas, las mismas

se identifican taxonómicamente a 40X, se debe tener cuidado de no resuspender el sedimento antes de tomar la muestra (Ministerio de Salud Perú y Instituto Nacional de Salud, 2014).



Fotografía: cortesía de la Lic. Elisa Boucourt

Imagen 15. *Larvas de Strongyloides stercoralis recuperadas de muestras de heces, utilizando el aparato de Baermann.*

Estudio del contenido duodenal (cuerda encapsulada, cápsula de beal o enterotest)

La "cuerda encapsulada", está constituida por un un cordel de poliéster trenzado de 1,40 metros de largo, enrollado dentro de una cápsula de gelatina que tiene en su interior un hilo de algodón absorbente, dotada de un peso de plomo revestido de resina acrílica para apresurar el descenso. La cuerda sale del interior de la cápsula a través de un agujero en el extremo opuesto al ubicado por el lastre. Las cápsulas son esterilizadas con óxido de etileno (Ministerio de Salud Perú y Instituto Nacional de Salud, 2014).

Propósito:

Es muy útil para la obtención de parásitos que se encuentran en el duodeno.

Materiales.

- Cuerda encapsulada.

- Guantes.
- Vaso de bebida.
- Papel pH.
- Placas petri o lunas de reloj.
- Láminas portaobjetos.
- Láminas de vidrio cavadas.
- Laminillas cubreobjetos.
- Microscopio binocular.

Procedimiento

- Al paciente en ayunas (tres horas por lo menos) se le debe hacer deglutir la cápsula con agua. El extremo de la cuerda debe ser fijado a la mejilla del paciente con cinta adhesiva, pudiendo tomar sólo líquidos claros.
- Al día siguiente se le debe retirar la cuerda por la boca, mediante una tracción rápida pero suave, manteniendo el paciente el cuello hiperextendido.
- Usualmente, 60 a 90 centímetros distales de la cuerda deben haber sido impregnados de bilis y mucus, material que se debe emplear para la observación al microscopio óptico, previa tinción con Ziehl-Nielsen.

Estudio del contenido duodenal (intubación duodenal para obtener aspirados, secreciones o jugo duodenal)

Los parásitos intestinales que tienen por hábitat el duodeno, pueden encontrarse en muestras biliares, obtenidas ya sea por sonda duodenal o por el método de la cuerda encapsulada (Enterotest). Los parásitos intestinales que tienen por hábitat el intestino grueso o delgado, también pueden obtenerse a partir de endoscopías gastrointestinales, proctoscopías o colonoscopías.

Propósito:

La obtención del contenido duodenal es útil en la búsqueda de *Giardia lamblia*, *Cystoisospora belli*, larvas de *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma duodenale* o *Necator americanus* y *Fasciola hepatica*, cuyos adultos se localizan en las vías biliares. El material coleccionado por la sonda duodenal, se deposita en un tubo de centrifuga. Una pequeña porción se deposita en una lámina excavada o portaobjeto. (Girard de Kaminsky, 2014; Musto, 2013).

Examen microscópico

Las gotas de bilis o contenido duodenal depositadas en las láminas excavadas o portaobjetos se observan directamente al estereomicroscopio y/o microscopio y luego con tinción de lugol.

Al resto del contenido duodenal obtenido con sonda se le agrega una solución de hidróxido de sodio 2 %, se trasvasa a un tubo de 13 x 100 ó 15 x 150 dependiendo de la cantidad, se mezcla tapando el tubo y, por agitación se liberan las formas parasitarias del mucus duodenal.

Dejar reposar de 30 a 45 minutos, eliminar el sobrenadante y observar el sedimento directamente o con tinción de lugol.

Observación

La obtención de material por biopsia a través de endoscopia gastrointestinal y la realización del frotis correspondiente que se tiñe con la coloración de Giemsa, es útil en la búsqueda de coccidios intestinales, trofozoitos de *Giardia lamblia* y huevos de *Strongyloides stercoralis*, en tanto que las proctoscopías y colonoscopías sirven para la búsqueda de *Entamoeba histolytica/dispar*.

Examen de biopsias de las paredes del sistema digestivo

Propósito:

Las biopsias son útiles para la búsqueda de parásitos, especialmente las obtenidas del antro pilórico, duodeno y recto mediante endoscopías.

Los parásitos diagnosticados frecuentemente en biopsias del antro-pilórico y del duodeno son *Strongyloides stercoralis* y *Giardia lamblia*, menos frecuente es la observación de coccidios intestinales como *Cryptosporidium parvum* y *Cyclospora cayetanensis*.

Las biopsias de ulceraciones del intestino grueso muestran *Entamoeba histolytica/dispar* o *Balantidium coli*. Las piezas operatorias que son objeto de examen histológico pueden demostrar la presencia de parásitos intestinales, por ejemplo, *Enterobius vermicularis* adultos en la luz del apéndice o *Ascaris lumbricoides* en una obstrucción mecánica de intestino, vías biliares o conducto pancreático.

La búsqueda de parásitos intestinales en cortes histológicos obtenidos por biopsia o necropsia no requiere, en general, de técnicas de coloración especiales.

La coloración de hematoxilina-eosina es útil, aunque generalmente no es posible reconocer la morfología del parásito, pues el corte microscópico afecta su integridad.

Las piezas anatómicas pueden conservarse en formol al 10% para ser usadas como piezas de museo o muestras de referencia (Girard de Kaminsky, 2014; Musto, 2013).

Estudio de materiales purulentos, secreciones, esputo y fluido vaginal

Propósito:

Los helmintos que realizan el ciclo de vida pulmonar, suelen ocasionar sintomatología pulmonar, pudiendo encontrarse en una muestra de esputo. Las larvas de *S. stercoralis* son las más frecuentemente observadas en esputo y las heces. Por la posibilidad de encontrar estos elementos parasitarios en el esputo, es necesario conocer los principales métodos diagnósticos (Girard de Kaminsky, 2014).

Materiales

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Vaso cónico o de vidrio de 150 a 200 mL.
- Coladera o rejilla metálica.
- Pipetas Pasteur.
- Solución de hidróxido de sodio 2 % al 4 %.
- Gasa.
- Microscopio óptico.

Obtención de la muestra

- Se obtiene por expectoración en un frasco limpio de boca ancha.

Procedimiento

- Emplear el método de Baermann, reemplazando la muestra de heces por la de esputo.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur, obtener el sedimento, colocar en una luna de reloj o placa Petri y observar al estereoscopio o microscopio.

Observación

- Observar las larvas en movimiento de *Strongyloides stercoralis*.

Análisis de la orina para el diagnóstico de Trichomonas vaginalis

Procedimiento

- Con un hisopo estéril se toma una muestra de la uretra.

- También se puede realizar un análisis de orina tanto a hombres como a mujeres, para lo cual se deberá recoger una muestra de orina limpia, siguiendo las siguientes indicaciones:
- Limpiar la región genital con una toallita que el profesional de la salud entregue.
- Los hombres deben limpiarse la punta del pene.
- Las mujeres deben separar los labios vaginales y limpiarse de adelante hacia atrás.
- Primero se deberá orinar en el inodoro. Luego, colocar el recipiente recolector debajo del chorro de orina.
- Recoger al menos 1 o 2 onzas de orina en el recipiente, que deberá estar marcado para indicar la cantidad.
- Terminar de orinar en el inodoro.
- Entregar el recipiente con la muestra siguiendo las instrucciones del profesional de la salud.

Análisis de la secreción vaginal para el diagnóstico de Trichomonas vaginalis

Propósito:

Muy útil para el diagnóstico de tricomoniasis en mujeres.

Muestra:

Secreción vaginal tomada con un hisopo estéril.

Procedimiento:

puede confirmarse al observar al microscopio

-Se obtiene la muestra de secreción vaginal con un hisopo estéril en la paciente del sexo femenino.

- La secreción se deposita en un tubo cónico de cristal y se espera a que sedimente naturalmente o en cambio se puede proceder a su centrifugación.

-Se procede a eliminar el sobrenadante y se deposita una pequeña porción de esa muestra con la ayuda de una pipeta, en una lámina portaobjeto.

-Posteriormente se le agrega una gota de solución salina, la cual permitirá observar nítidamente en el microscopio óptico binocular compuesto, la presencia y el movimiento de los trofozoitos de *Trichomonas vaginalis*.

Nota: Si el parásito se puede observar bajo el microscopio óptico, no se necesitan más pruebas para la confirmación del diagnóstico. Si esta prueba no es concluyente, se pueden utilizar pruebas llamadas pruebas rápidas de antígeno y amplificación de ácidos nucleicos.

Especiación de *Taenia* spp. (tinción de proglótidos con el método de la tinta china)

Propósito:

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

Muestra:

- 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

- Brindar 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 *Taenia 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 (Girard de Kaminsky, 2014; Izquierdo, Boucourt, Jiménez, 2020).

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.
- La coloración con carmín es un método de identificación permanente, pero demora varios días y requiere personal más calificado.

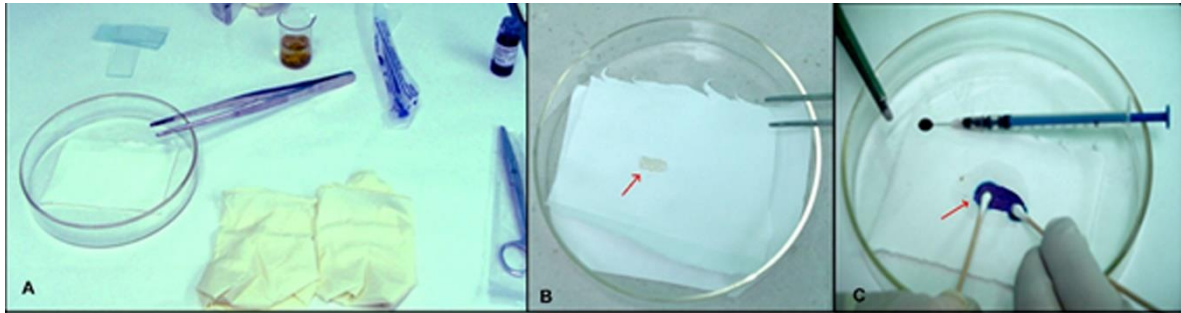
Materiales

- 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

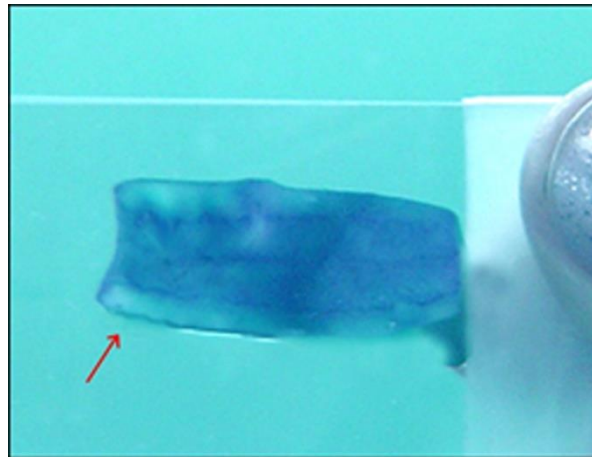
Procedimiento

- Si el o los proglótidos están sucios con heces, colocarlos con ayuda de aplicadores en una caja de Petri y lavar por agitación suave con agua destilada.
- Colocar un proglótido sobre 3-4 dobleces de papel absorbente y secarlo por ambos lados.
- Aspirar algunas gotas de tinta china en la jeringa de tuberculina.
- Inyectar el proglótido afianzado sobre el papel absorbente, introduciendo la aguja en la rama uterina central del proglótido como si fuera inyección subcutánea.
- Secar con otro papel el exceso de tinta y humedad y colocar el proglótido entre dos porta-objetos.
- Ejercer presión para apretar el proglótido al mismo tiempo que otra persona sella alrededor de la preparación con cinta adhesiva.
- Contar las ramas uterinas coloreadas con la tinta china con una lente de aumento. Nota: para *T. solium*: menos de 13 ramas uterinas, para *T. saginata*: más de 13 ramas uterinas.
- Cuando hay duda en situaciones de cuenta intermedia solicitar más proglótidos sin fijar o el parásito que se expulsará con tratamiento específico, recolectado directamente en una bolsa plástica o en un frasco grande limpio y seco.
- Cuando los proglótidos se reciben fijados, se colorean con carmín, que es una coloración permanente.
- Descartar todo material utilizado en frasco con desinfectante o en agua hirviendo.
- Desinfectar la mesa de trabajo.
- Lavarse bien las manos.



Fotografía: cortesía de la Lic. Elisa Boucourt y la Dra. Alina izquierdo

Imagen 17. Pasos para la realización del método de la tinta china.



Fotografía: cortesía de la Lic. Elisa Boucourt y la Dra. Alina izquierdo

Imagen 18. Montaje del proglótide para contar las ramas uterinas.

Análisis del escólex de Taenia sp. para el diagnóstico de certeza de la especie

Propósito:

Su propósito es poder determinar a través del estudio del escólex la diferenciación de especies de tenias.

Para cisticercos en general, es suficiente colocar el cisticerco, sin el líquido contenido en la vesícula, entre dos porta-objetos y ejercer presión suave, luego observar al microscopio estereoscópico u óptico a menor aumento (X 25 ó 45).

Cuando se prefiere una preparación más permanente y no se cuenta con un laboratorio de patología, o en investigación de campo se utilizan otros métodos como el que se detalla a continuación.

Preparación del medio de Berlese para examen del scolex de Taenia spp.

- Goma arábiga 4,0 g
- Agua destilada 4,0 mL
- Glicerina 2,5 ml.
- Hidrato de cloral 35 g
- 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

- Remover con cuidado el quiste del tejido.
- Abrir el quiste con un bisturí sobre una caja de Petri y exponer el cuello del protoescolex.
- Colocar éste entre dos porta-objetos y comprimir apretando suavemente.
- Transferir de esta manera a una solución de ácido clorhídrico al 1 % durante unos minutos para disolver los corpúsculos calcáreos.
- Sumergir en una solución de alcohol al 70 % con glicerina al 20 %, colocar sobre una plancha caliente (40 °C a 50 °C) para que el alcohol se evapore. El tejido se vuelve transparente.
- 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.

Nota: 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). De igual manera la presencia solo de 4 ventosas confirmaría la identificación de *Taenia saginata*.

MÉTODOS DE COLORACIÓN PARA HELMINTOS

Coloración Carmín clorhídrico

Utilidad

- Coloración de estructuras internas de especímenes adultos o segmentos de éste. Se usa de preferencia para el estudio de céstodes y tremátodes, ya que los nemátodes suelen deformarse con el montaje. La muestra debe ser lo más fresca posible.

Materiales

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Pinza de punta fina.
- Cytoseal o bálsamo de Canadá.
- Alcohol 70 %, 85 %, 95 % y absoluto.
- Creosota de la Haya o xilol.
- Colorante Carmín
- Acido clorhídrico.
- Agua destilada.
- Pabilo.
- Placas petri conteniendo colorante, decolorante, alcoholes de 70 %, 85 %, 95 % y absoluto.

Procedimiento.

- Los proglótidos de céstodes y los adultos de tremátodes son lavados y aplanados, colocándolos entre dos láminas, sujetándolos con pabilo o usando pesas sumergiéndolos en formol al 10 %.
- En caso de estar fijados en formol 10 %, se lavan con agua corriente durante 10 a 30 minutos y luego se realiza el aplanamiento del vermex o gusano.
- Colocar el gusano en alcohol 70 % durante 10 a 20 minutos.
- Pasar por el colorante Carmín durante 5 a 10 minutos.

- Pasar por alcohol ácido controlando la coloración al estereoscopio.
- Deshidratar el espécimen pasando por alcohol 85 %, 95 % y absoluto, durante 10 minutos en cada uno.
- Pasar por la creosota o xilol, controlando al estereoscopio o microscopio la coloración apropiada.
- Secar el exceso de creosota con papel filtro y realizar el montaje con bálsamo de Canadá.

Observación.

- La observación y estudio de la morfología del ejemplar se realiza macroscópicamente e incluso sólo usando el estereomicroscopio.

Coloración de Bonilla, Naar y Beloy

Utilidad

- Las larvas de los nemátodes absorben el colorante, permitiendo diferenciar sus estructuras internas.

Materiales

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Alcohol 25 %, 30 %, 70 %, 85 % y 95 %.
- Solución roja de Congo
- Solución de salicilato de metilo
- Láminas excavadas.
- Bálsamo de Canadá o cytoseal.
- Pipeta Pasteur.
- Placas Petri 60 x 90 mm conteniendo los alcoholes.

Procedimiento

- Preparar un set de placas Petri 60 x 90 mm conteniendo los reactivos correspondientes y colocar las larvas en alcohol 25 % - 30 % con unas gotas de solución de rojo de Congo por 20 a 30 minutos.
- Controlar por la observación microscópica el color de las larvas.
- Deshidratar la muestra, pasándola por alcohol 70 %, 85 %, 95 % y absoluto, de 20 a 30 minutos en cada uno.

- Colocar en solución de salicilato de metilo durante 3 minutos.
- Colocar los especímenes en cytoseal, bálsamo de Canadá o Permout y observar al microscopio.
- Los especímenes y sus estructuras internas se tiñen de color rojo (Girard de Kaminsky, 2014; IIRT, 2018).

Coloración hematoxilina férrica de Delafield

Utilidad

- Se usa en casos de céstodes y tremátodes. Permiten colorear estructuras internas de especímenes adultos o fragmentadas del mismo.

Materiales

- Láminas portaobjetos y laminillas cubreobjetos.
- Alcohol de 25 %, 30 %, 70 %, 85 % y 95 %.
- Hematoxilina férrica.
- Bálsamo de Canadá o cytoseal.
- Pipeta Pasteur.
- Placas Petri 150 x 100 mm conteniendo los alcoholes.

Procedimiento

- Preparar un set de placas Petri 60 x 90 mm o 100 x 150 mm conteniendo los reactivos correspondientes, dependiendo de los especímenes a colorear.
- Los tremátodes y céstodes fijados con formol 10 % se lavan en agua corriente.
- Diluir el colorante stock de 8 a 10 gotas en agua destilada y colocar los especímenes (35 mL por placa) por 12 horas.
- Lavar con agua corriente y pasar por agua (segundos), dependiendo del espécimen.
- Pasar por alcohol 50 %, 30 % y 10 % por 10 minutos en cada uno y pasar por agua corriente el tiempo necesario para sacar el exceso de colorante.
- Deshidratar en alcohol 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 95 % y 100 % cada uno, por 10 minutos.
- Pasar dos veces por xilol, montar con bálsamo de Canadá y observar al microscopio. La observación de los especímenes se realiza en forma microscópica o con el uso del microscopio estereoscópico (Girard de Kaminsky, 2014; IIRT, 2018).

TÉCNICAS DE LABORATORIO EMPLEADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE PROTOZOOS TISULARES Y HEMÁTICOS

Existen parásitos que se localizan en los tejidos y en la sangre; para su diagnóstico de laboratorio se realizan estudios de orina, suero, expectoración, líquido cefalorraquídeo, entre otras muestras. (INDRE, 2018; Girard de Kaminsky, 2014).

Entre las técnicas se destacan las siguientes:

- Examen en fresco, frotis de sangre periférica, extendido o análisis de extensión sanguínea: gota de sangre entre láminas, permite observar la fase sanguínea del parásito al microscopio con lente de fase. Se puede emplear la coloración de Giemsa, de Field o de Wright). Muy útil para destacar morfología e identificar las especies de *Plasmodium* sp.
- Gota gruesa (muy útil en parasitemias bajas), permite estudiar gran volumen de sangre.
- Técnica de detección de antígenos parasitarios (proteína-2 rica en histidina HRP-2) de *Plasmodium* sp.
- Cultivos para aislamiento de *Leishmania* sp. y *Trypanosoma* sp (Novy, Mc Neal y Nicolle).
- Concentración y coloración de microfilarias: método de Knott.
- Biopsia de tejidos, raspado de úlcera perineal y cutánea.
- Lavado bronquial

Examen en fresco, frotis de sangre periférica, extensión sanguínea o análisis de extensión sanguínea.

Aunque algunos analizadores automatizados preparan y tiñen los frotis de sangre de acuerdo con los criterios establecidos, en muchos lugares se sigue utilizando la preparación manual del frotis por no contar con esta tecnología.



Fotografía tomada: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (2018)
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/487411/LVL_Paludismo_4T.pdf

Imagen 19. Pasos para la toma de muestra de sangre para la realización de frotis.

El extendido consiste en una extensión fina de sangre sobre un portaobjetos (una sola capa de células). En ella, los parásitos (*Plasmodium*) se observan en el interior de los hematíes.

El diagnóstico del paludismo requiere de la implementación y funcionamiento adecuado de un sistema de aseguramiento de la calidad que permite asegurar resultados confiables, lo que implica la aplicación de procedimientos estandarizados en toda la red de diagnóstico. En Ecuador estos procedimientos son supervisados por el Laboratorio de Referencia Nacional de la Red Pública Integral de Salud, que se ocupa igualmente de mantener el control de la calidad del diagnóstico parasitológico de malaria, el mismo se encuentra en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez con sede en la ciudad de Guayaquil (Ministerio de Salud Pública de Ecuador, 2019)

El objetivo de la tinción de frotis de sangre periférica es identificar las células y reconocer con facilidad la morfología a través del microscopio. La tinción de Wright o de Wright-

Giemsa es la utilizada con mayor frecuencia para los frotis de sangre periférica, de médula ósea y también para la realización de la Gota Gruesa. Estas tinciones contienen eosina y azul de metileno. (Turrientes y López, 2001).

Es necesario un portaobjetos bien teñido para la interpretación exacta de la morfología celular. Los mejores resultados de la tinción se obtienen cuando los portaobjetos se preparan en el transcurso de las dos a tres horas posteriores a la recolección de la sangre. Los portaobjetos deben estar completamente secos antes de la tinción.

La preparación y tinción de alta calidad un frotis de sangre de alta calidad, es una técnica importante para cualquier laboratorio de diagnóstico. Los frotis se utilizan para evaluar los glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas (trombocitos). Además, los frotis de sangre también se utilizan para detectar parásitos de la sangre tales como *Babesia* sp., *Anaplasma* sp. y *Trypanosoma* sp. (Enlace Hispanoamericano de Salud, 2012)

Materiales:

- Portaobjetos limpios, preferentemente con un extremo blanco rugoso para el etiquetado (escribir el nombre y fecha de la muestra), deben ser limpiados nuevamente antes de ser utilizados para el frotis.
- Una micropipeta o tubo capilar para colocar una gota de sangre en el portaobjetos.
- Soluciones de tinción.

Procedimiento

La sangre utilizada para preparar los frotis, es recolectada en un tubo que contiene el anticoagulante EDTA (tubos con tapón de color púrpura). El frotis no necesita ser preparado inmediatamente, pero debe ser realizado en el mismo día que se recoge la muestra de sangre. La sangre debe mantenerse refrigerada, preferiblemente a 5 °C, hasta que se envíe al laboratorio.

- Un profesional de la salud debe tomar una muestra de sangre de una vena de un brazo con una aguja estéril pequeña.
- Insertar la aguja, extraer una pequeña cantidad de sangre que coloca en un tubo de ensayo o frasquito.
- Mezclar con cuidado (sin agitar) la muestra de sangre contenida en el tubo antes de preparar el frotis, teniendo en cuenta que la sangre mal mezclada puede dar lugar a una distribución anormal de las células.
- Colocar una pequeña gota de sangre (de unos 20 ul ó 1 - 2 mm de diámetro) sobre extremo de un portaobjetos limpio. El frotis no debe ser demasiado grueso.

- Usar una pequeña cantidad de sangre para que en el extremo del frotis se forme un borde parecido a la punta de una pluma ligeramente redondeado en el extremo más fino (cola). Una gota muy grande forma un extendido muy largo o muy grueso.
- Utilizar un segundo portaobjetos para distribuir la gota de sangre y extenderla sobre la superficie: se debe mantener el segundo portaobjetos en un ángulo de 30 - 45° sobre la gota de sangre y mover un poco hacia atrás hasta tocar la gotita de sangre, dejando que la sangre se extienda a todo el ancho del portaobjetos.
- Empujar con rapidez y suavemente hacia adelante, hasta el extremo opuesto para crear el frotis, extendiendo la gotita en forma constante y uniforme para formar una película fina de sangre bien distribuida sin agujeros ni surcos.
- Mover el portaobjetos con la mano hacia uno y otro lado durante varios segundos para secar rápidamente el frotis al aire inmediatamente después de la preparación del frotis de sangre.
- Etiquetar el portaobjetos con un lápiz de grafito en lugar de un lapicero o pluma. (INDRE, 2018; Girard de Kaminsky, 2014).



Imagen 20. Frotis. Forma correcta del extendido de la sangre sobre un portaobjetos

Procedimiento para la tinción de Giemsa en frotis sanguíneo o extensión

Materiales:

- Mechero de gas/alcohol o Metanol, agua y Giemsa.

- Antes de teñir hay que fijar la extensión con calor o con metanol durante, como máximo, 1 minuto.
- Inclinar levemente el portaobjetos para que caiga el metanol.
- Cubrir la extensión con Giemsa al 10 % durante 30 minutos.
- Pasado este tiempo, se lava la preparación sumergiéndola en una cubeta con agua del grifo agitándola fuertemente durante 3 segundos.

Procedimientos:

- Fijar con metanol durante 5 minutos.
- Teñir con colorante de Giemsa al 10 % durante 10 minutos.
- Lavar en agua tamponada a pH 7,2.
- Si se utiliza el colorante de May-Grünwald-Giemsa se fija con metanol, se tiñe con el colorante May-Grünwald diluido en un volumen igual de agua tamponada durante 5 minutos y después se procede con el colorante de Giemsa como se ha referido.

Tinción de Field para extensión de sangre

Procedimientos:

Son fundamentales los volúmenes a utilizar.

- Antes de teñir hay que fijar la extensión con calor o con metanol durante, como máximo, un minuto.
- Decantar el metanol sin lavar.
- Cubrir el portaobjetos con 1 volumen (aproximadamente 1mL) de Field B diluido a 1/5, en agua destilada o del grifo a ser posible tamponada a pH 7,2.
- Inmediatamente se cubre el portaobjetos con el mismo volumen (aproximadamente 1mL) de Field A, se homogenizan bien los dos colorantes y se deja durante 1-2 minutos.
- Pasado este tiempo, se lava la preparación sumergiéndola en una cubeta con agua del grifo agitándola fuertemente durante tres segundos para quitar el exceso de colorante y los artefactos que hayan podido quedarse adheridos a la muestra.

Observación en el Microscopio de la Extensión de Sangre

Es necesario examinar numerosos campos microscópicos antes de realizar el diagnóstico, por lo general un mínimo de 100 a 150 campos o unos 10 minutos por cada preparación.

Identificación de malaria:

- Morfología de los parásitos que, además, nos permitirá determinar el estadio del ciclo vital en el que se encuentran (trofozoíto, esquizonte).
- Tamaño de los hematíes parasitados (en relación a los no parasitados).
- Presencia de punteado, granulaciones y pigmento malárico en el interior de los hematíes.

La detección de estos parásitos debe acompañarse de un recuento semicuantitativo de los mismos (parasitemia), en el que se informa el número de hematíes parasitados por cada 100 glóbulos rojos (% parasitemia = promedio hematíes parasitados por campo/promedio de hematíes totales por campo) X 100.

Además, se puede emplear para teñir los frotis de sangre la técnica con un fijador de alcohol, una tinción roja (eosinófilos), una tinción azul (basófilos) que se realiza siguiendo los siguientes pasos:

- Sumergir el frotis de sangre dentro de en cada una de estas soluciones 5 a 10 veces.
- Enjuagar el portaobjetos con agua.
- Sumergir primero en el alcohol fijador.
- Sumergir en la tinción roja.
- Sumergir en la tinción azul.

El frotis de sangre se emplea con frecuencia y efectividad para diagnosticar problemas de la sangre, en especial la presencia de parásitos hemáticos como *Plasmodium* sp., *Trypanosoma* sp., *Leishmania* sp.

El examen del frotis de sangre periférica es un proceso que se realiza en varios pasos,

- Barrido de lectura del portaobjetos con el objetivo 10X o de bajo aumento (aumento total = 100). Este paso es necesario para evaluar la calidad global de la preparación, como la distribución anormal de los eritrocitos, lo que sugiere la presencia de rouleaux (eritrocitos en “pilas de monedas”) o autoaglutinación y la presencia de números desproporcionados de células nucleadas grandes, como monocitos o neutrólos, en los bordes del frotis. Si esto último sucede, debe prepararse otro frotis.
- Examen con objetivo 10X el cual permite la detección rápida de células anormales grandes, como blastos, linfocitos reactivos y parásitos. (INDRE, 2018; Girard de Kaminsky, 2014).

Método de Leishman

El método de Leishman incluye metanol por lo que sólo puede utilizarse para el frotis.

Procedimiento

- Teñir con el colorante de Leishman durante dos minutos.
- Añadir sobre el frotis el doble de volumen de agua tamponada y dejar teñir durante 5-7 minutos.
- Lavar en agua tamponada durante 2 minutos. La tinción con naranja de acridina descrita por Kawamoto se utiliza para el frotis, ya que precisa una fijación previa con metanol antes de teñir y observar en un microscopio de fluorescencia. La sensibilidad es del 77-96 % y la especificidad del 81-98 %.

Técnica de la Gota Gruesa

Propósito:

Consiste en la visualización microscópica de una gruesa capa de sangre que se teñirá pero que no se fija previamente.

Materiales

- Lanceta.
- Algodón.
- Alcohol 70°
- Portaobjetos.

Procedimiento

Para el diagnóstico de malaria, las muestras de sangre deben extraerse cuando el paciente presenta fiebre (de otro modo será más difícil lograr un diagnóstico correcto).

Las muestras de sangre pueden obtenerse a través de una vena y recogerse en un tubo con anticoagulante EDTA, o simplemente pinchando un dedo con una lanceta como se describe a continuación. En este caso la preparación de la muestra se debe realizar inmediatamente tras la toma.

- Tomar la mano izquierda del paciente con la palma de la mano hacia arriba y limpiar la yema del tercer dedo con un algodón empapado en alcohol al 70%. Si se trata de un niño, puede hacerse la toma en el talón.
- Secar el dedo con un algodón limpio y seco mientras se sostiene de forma enérgica.
- Con una lanceta estéril pinchar la yema del dedo de forma rápida. La primera gota de sangre que salga debe secarse con un algodón limpio y seco.

- Obtener una nueva gota de sangre presionando ligeramente el dedo y depositarla sobre un portaobjetos limpio y libre de grasa.
- Una vez en el portaobjetos, la manera de proceder será diferente según la preparación seleccionada como se indica en el siguiente punto.

Preparación de la muestra

- La Gota Gruesa es hasta 20 veces más densa que la extensión (varias capas de células sanguíneas depositadas sobre un portaobjetos) y por ello, más sensible. Los parásitos se observan libres, extracelulares ya que los hematíes se rompen durante el procesamiento.

Son muchas las tinciones que se aplican para el diagnóstico del paludismo, desde las convencionales de Giemsa, May-Grünwald-Giemsa, Field y Leishman hasta las fluorescentes con naranja de acridina o el sistema QBC. La tinción de Giemsa. es la técnica diagnóstica de referencia, tiene buena sensibilidad (92-98%) y especificidad (85-99%).

La necesidad de emplear agua tamponada a pH 7,2 (tanto en la dilución del colorante como en los lavados) se debe a que, con otro pH, puede verse alterada la morfología del parásito, impidiendo la observación de las granulaciones de Schüffner, tan importantes para la diferenciación de la especie (López, et al., 2020; Ministerio de Salud Pública de Ecuador, 2019)

La tinción de Field (colorantes A y B de Field) sirve tanto para la gota gruesa como para el frotis. Debido a su rapidez y sencillez, es la preferida por los laboratorios de los hospitales tropicales que analizan gran número de muestras. Sin embargo, no siempre permite observar el punteado de Schüffner presente en *Plasmodium vivax* y *Plasmodium ovale*.

Procedimientos para la realización de la Gota Gruesa

- Dispensar una gota de sangre sobre un portaobjetos limpio y extenderla ligeramente sobre la superficie del mismo para que no quede excesivamente gruesa (lo suficiente para que pueda leerse a su través la letra impresa de un periódico).
- Realizar movimientos circulares sobre la gota utilizando la esquina de otro portaobjetos para desfibrinar la gota de sangre como muestra la imagen.
- Dejar secar completamente a temperatura ambiente. En situaciones de urgencia puede acelerarse el secado por agitación o calor suave, pero evitando que la preparación quede fijada por el exceso de calor.
- Una vez preparada la gota, puede teñirse mediante tinción de Giemsa o Field.

Tinción de Giemsa para Gota Gruesa

Materiales

- Agua y Giemsa.
- Teñir la preparación cubriéndola con Giemsa al 10 % (diluir el colorante 1/10 en agua) durante 20 minutos.
- Pasado este tiempo, lavar la preparación agitándola delicadamente en el interior de una cubeta con agua.
- Dejar secar la preparación en posición vertical y, una vez seca, observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100X).

Tinción de Field para Gota Gruesa

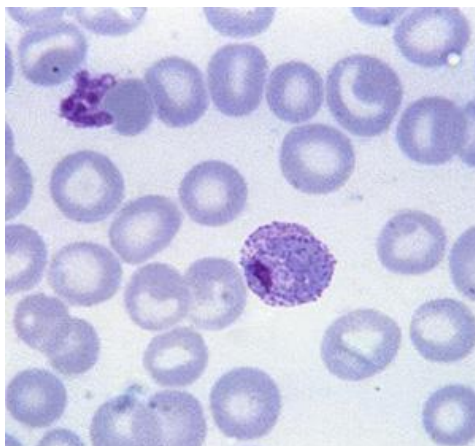
Materiales:

- Agua y dos colorantes (Field A de color azul y Field B de color naranja, dispuestos cada uno de ellos en una cubeta o recipiente de tinción).
- Sumergir la preparación en la cubeta con Field A durante 3 segundos.
- Lavar la preparación introduciéndola en una cubeta con agua del grifo durante 3 segundos, suavemente y sin agitar.
- Sumergir la preparación en la cubeta con Field B (sin diluir) durante 3 segundos.
- Lavar la preparación en una cubeta con agua del grifo durante 3 segundos.
- Dejar secar la preparación en posición vertical y, una vez seca, observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100X).

Observación en el microscopio de la Gota Gruesa

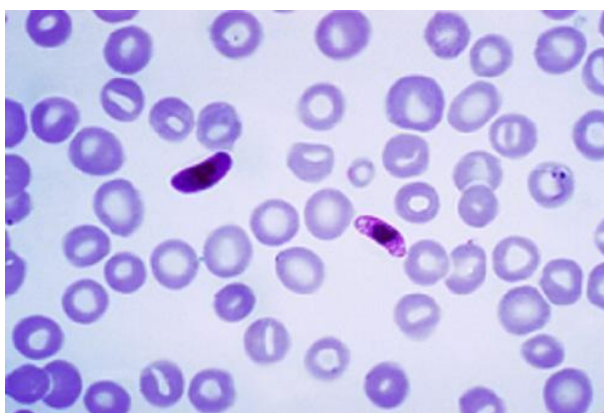
Las formas parasitarias deben distinguirse de los restos de hematíes, leucocitos y de los artefactos que hayan podido producirse durante el procedimiento. Se observarán tres componentes del parásito:

- Citoplasma (teñido de azul).
- Cromatina (teñida de rojo o violeta).
- Gránulos de pigmento malárico (teñido de marrón, negro o amarillo).



Fotografía tomada del CDC <https://www.cdc.gov>

Imagen 21. Imagen del *Plasmodium vivax*



Fotografía tomada del CDC <https://www.cdc.gov>

Imagen 21. Imagen del *Plasmodium falciparum*

Técnica de detección de antígenos parasitarios (proteína-2 rica en histidina hrp-2)

Son pruebas muy fáciles de realizar, rápidas, sensibles y no precisan microscopio. Los sistemas comerciales (dipstick, "jabonera") son estables a temperatura ambiente, lo que permite el transporte en el trópico, y constituyen una importante ayuda para el diagnóstico del paludismo en los laboratorios con poca experiencia en la microscopía.

De ninguna forma sustituyen al frotis y la gota gruesa, ya que tienen falsos negativos y no son cuantitativos, Así, pueden pasar por alto casos de malaria, retrasando el diagnóstico. Además, al no distinguir el grado de parasitemia, muy relacionado con la gravedad, impiden al clínico la adopción de las medidas terapéuticas oportunas, con la consiguiente morbilidad y mortalidad que ello entraña.

También posee valor a modo de autodiagnóstico, para el propio viajero a zonas de baja endemia y con estancias prolongadas, que decide no hacer profilaxis antipalúdica y que sufre

un ataque febril durante su estancia, pero en este sentido ha demostrado no tener los resultados esperados debido a la dificultad de interpretación por los viajeros, especialmente en los casos de moderada o baja parasitemia (Enlace Hispanoamericano de Salud, 2012).

Sistema de OBC (Quantitative Buffy Coat System-Becton Dickinson)

Se basa en la concentración por gradiente de densidad de los eritrocitos parasitados mediante la centrifugación de un capilar impregnado de heparina y naranja de acridina, al que se añade un flotador. Se necesita, por tanto, capilares y una centrífuga especiales, así como un acoplador de microscopio y un sistema de epifluorescencia con lente especial, lo que encarece la técnica sin aportar mucho al frotis y gota gruesa (sensibilidad del 88-98 % y especificidad del 58-90 %). A veces es difícil el reconocimiento del parásito, no permite diferenciar las distintas especies y tiene el inconveniente de trabajar con sangre fresca (Enlace Hispanoamericano de Salud, 2012).

Se secreta por *P. falciparum* a la sangre, lo que permite su detección mediante la captura antigénica con anticuerpos específicos y técnicas de inmunocromatografía. Con posterioridad se han desarrollado otros métodos que detectan tanto el antígeno HRP-2 de *Plasmodium falciparum* como el antígeno panmalárico que se expresa en las fases sanguíneas de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* y, probablemente, también de *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*. Tienen una sensibilidad general del 90-92 % y una especificidad del 96-98%. Para *Plasmodium vivax* son inferiores, del 75 % y 95% respectivamente (Ministerio de Salud Pública de Ecuador, 2019).

Son técnicas ideales para los laboratorios con poca experiencia en el diagnóstico microscópico y siempre que se requiera un diagnóstico rápido, pero presentan desventajas que les impide reemplazar al frotis y la gota gruesa: no detectan parasitemias bajas (INDRE, 2018)

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS O TRIPANOSOMIASIS AMERICANA.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una infección parasitaria causada por el protozoo tisular *Trypanosoma cruzi*.

La importancia del diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas se basa en el porcentaje (5 %) solamente de individuos infectados, que presentan síntomas y signos característicos de esta infección parasitaria tisular de gran importancia en América Latina, por tanto, es imprescindible contar con recursos complementarios al diagnóstico clínico que permita llegar a la detección precoz de la tripanosomiasis (CDC, 2020; Girard de Kaminsky, 2014).

Métodos directos:

Se emplean preferentemente en la investigación de la enfermedad de Chagas (EC) aguda, debido a la alta parasitemia característica de esta fase.

- Examen a fresco. Es un método de fácil realización, muy sensible y de bajo costo, en situaciones donde la parasitemia es elevada (fase aguda). Para realización del examen, se obtiene una gota de sangre del paciente (por ejemplo, a través de punción digital), depositándola en la lámina la cual se cubre con una laminilla. Luego se lleva al microscopio en busca de formas tripomastigotas.
- Gota gruesa: se colocan dos o tres gotas de sangre sobre una lámina, reuniéndolas para confeccionar una única mancha circular de un cm de diámetro. Después que se seca la sangre, se introduce la lámina en agua destilada, con el objetivo de que tenga lugar la hemólisis y así se torne más transparente; luego se realiza la coloración por con el colorante Giemsa y se observa al microscopio, con objetivo de 100X, con aceite de inmersión para detectar la presencia del protozoo tisular.
- Extensión Sanguínea: se debe colocar una pequeña porción de sangre sobre una lámina (completamente desengrasada), próxima a una de sus extremidades, luego se apoya otra lámina sobre la primera, en un ángulo de 45° y se extiende la gota a lo largo de la lámina de modo de moverla del punto inicial. Después se seca la lámina, se fija y se colorea por el método de la tinción de Giemsa.
- Método de Deane y Kishner: se basa en el hecho de que la lisis de eritrocitos puede ocurrir más rápidamente que la de los tripomastigotas sanguíneas. A un ml de sangre se añade 9 mL de agua destilada, se pone inmediatamente después en un ml de solución de cloruro de sodio (NaCl) al 17 %, para mantener la osmolaridad del medio y de esta forma poder mantener los tripanosomas intactos. Se centrifuga a 2000 rpm por 15 minutos y por último se lleva el sedimento obtenido para realizar el examen microscópico, observando con el objetivo de 100X y aceite de inmersión.
- Método de Silícones: se debe colocar la sangre sobre aceite de silicone de densidad 1075, el cual actúa como un filtro, posteriormente se centrifuga y los glóbulos rojos de mayor peso, se depositan en el fondo, mientras que los parásitos, los leucocitos y las plaquetas quedan en el sobrenadante y es observado al microscopio óptico binocular compuesto.
- Método de la triple centrifugación de Martin-Leubouef-Rouboud: se debe depositar 10 mL de sangre venosa en un tubo de ensayo conteniendo un mL de solución a 20 % de citrato sódico. Luego se centrifuga por tres veces, la primera a 1800 rpm/7min., la segunda a 2000 rpm/1 min.; utilizando el sobrenadante de la anterior y a 2000 rpm/20 min con el residuo de la segunda centrifugación, de este último

centrifugado, se retira el sobrenadante, analizándose el sedimento al microscopio óptico binocular compuesto.

- **Método de Strout:** se debe obtener 5mL de sangre, se deja en reposo a temperatura ambiente, para que tenga lugar la coagulación y retracción espontánea del coágulo, luego se centrifuga el suero obtenido a 160 rpm/5 min para la separación de los eritrocitos aún en suspensión e inmediatamente se realiza una nueva centrifugación a 350 rpm/10 min., para lograr la obtención del sedimento, el cual deber ser observado en el microscopio óptico binocular compuesto. Este método tiene alta sensibilidad, pudiendo alcanzar el 95 % de éxito en la fase aguda.
- **Punción por biopsia de nódulos linfáticos:** por su gran afinidad a las células del sistema retículo-histiocitario, *Trypanosoma cruzi* desde el inicio de la infección puede ser encontrado en los nódulos linfáticos, parasitando macrófagos, dispersos en el exudado inflamatorio (especialmente en casos de adenitis satélite y el chagoma de inoculación) (CDC, 2020; Girard de Kaminsky, 2014).

Métodos indirectos:

Se emplean tanto en la fase aguda como en la fase crónica, pero como son ensayos concebidos para encontrar parásitos, su sensibilidad en la fase crónica no es muy alta (OPS, 2019).

- **Inoculación en animales sensibles:** es un método preferentemente utilizado en el aislamiento de parásitos, teniendo algunas restricciones para su diagnóstico de rutina como se expresan a continuación:
 - El desarrollo de los parásitos en el animal dependerá de las características de *T. cruzi*.
 - El mantenimiento de animales para la investigación es compleja, laboriosa y requiere de la aplicación de principios éticos para el trabajo con animales.
 - El tiempo prolongado para obtención de resultados (entre 7 y 20 días).
 - No obstante, la inoculación en animales, aún resulta útil para el diagnóstico en algunos centros de pesquise.
- **Xenodiagnóstico:** lo fundamental de este método es la simulación en el laboratorio de condiciones naturales para que ocurra el ciclo evolutivo de *T. cruzi* en los insectos que transmiten la enfermedad de Chagas (familia *Reduviidae*), hasta entonces exento de infección. Se deben emplear cuatro cajas con 10 ninfas de tercer grado (alimentadas durante toda la vida en aves, para garantizar la "virginidad", cubierta solamente por una cepa delgada de tul. De esta forma, se aplica esta fase en el antebrazo del paciente por 30 min., y después de este período, se guardan las cajas en condiciones adecuadas (local oscuro a 27 °C), para que se pueda desarrollar adecuadamente el insecto. La lectura se

realiza por la observación del contenido intestinal del insecto, 30 y 60 días después de la aplicación.

- La sensibilidad aceptada para el xenodiagnóstico es alrededor de 100 % para la fase aguda y hasta 50 % de positividad para la fase crónica, para pacientes conocidos como chagásicos.
- Hemocultivo: esta técnica diagnóstica, requiere menos infraestructura que el xenodiagnóstico. Se basa en los siguientes procedimientos:
 - Colección de 30 mL de sangre del paciente a ser investigado, con el empleo de anticoagulante como la heparina o la EDTA.
 - Se centrifuga la sangre a 300 rpm/10 min., a temperatura ambiente.
 - Se deja en reposo por una hora (también a temperatura ambiente).
 - Se separa el plasma del sedimento (fundamentalmente eritrocitos), se centrifuga la primera vez a 900 rpm/30 min., con una temperatura de 4 °C.
 - Se centrifuga y se lava el sedimento de eritrocitos y se divide en seis tubos.Se incuba los tubos a 27 °C, se procede a realizar una suave homogeneización bisemanal
 - Se realizan lecturas posteriormente y a los 120 días, se debe recoger una gota del medio de cultivo, se pone sobre una lámina de vidrio limpia y después se cubre con laminilla. Se observa al microscopio y se examina toda la lámina en busca de parásitos (OPS, 2019; Pearson, 2020).

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

El inmunodiagnóstico, permite la detección de anticuerpos generados en el transcurso de la evolución de la infección. Teniendo en cuenta los mecanismos inmunológicos de esta enfermedad, dichas técnicas son de gran importancia para el diagnóstico de la etapa crónica. Las que se emplean con mayor frecuencia son:

- Reacción de Fijación del Complemento (RFC): tiene como principio el agotamiento del complemento existente en una determinada porción de suero, por inmunocomplejos formados por reacción inmunológica previa, teniendo en cuenta que en la sangre de individuos chagásicos existen anticuerpos ant *T. cruzi*, capaces de ligarse a un antígeno adicionado al medio (derivado del parásito). Este complejo antígeno-anticuerpo es ligado por el complemento (en la región-Fc. de la Inmunoglobulina), agotando este complejo del medio de la reacción. La sensibilidad varía de 84,5 % hasta 100 %, en cuanto a la relación de especificidad. pueden ocurrir reacciones positivas para enfermos con leishmaniosis cutánea americana.

Se coloca una muestra de eritrocitos sensibilizados en una placa tipo Kline y enseguida se debe añadir en el suero a ser investigado, así queda homogenizada la muestra resultante. Se aguardan 10 minutos y enseguida se procede a la lectura. Por corto tiempo de la reacción, la facilidad de la técnica y los bajos costos, la hemaglutinación es ideal para la regulación en bancos de sangre e investigaciones epidemiológicas. Su único inconveniente es la necesidad de la preparación de los eritrocitos sensibilizados, casi que diariamente. La sensibilidad varía de 50 % (fase aguda) hasta 100 % (fase crónica) (Montes, 2018; Salinas, Medina de la Garza, 2014).

- *Reacción de Inmunofluorescencia:* es una de las técnicas más sensibles, se puede utilizar tanto en la fase aguda, como en la crónica. Se puede subdividir la inmunofluorescencia en directa e indirecta, siendo esta última la más utilizada en la detección de la enfermedad de Chagas. La técnica se resume en la marcación de un anticuerpo anti-inmunoglobulina, con la sustancia fluorescente, siendo este anticuerpo anti-anticuerpo capaz de ligarlo a un complejo antígeno *T. cruzi*-anticuerpo del paciente chagásico, la fluorescencia aparece, cuando es llevado al microscopio adecuado (equipado con luz ultravioleta). La sensibilidad varía de 93 % hasta valores próximos a 100 %. La especificidad es del orden de 99,7 % pudiendo, en raros casos, ocurrir reacciones de falsos positivos para leishmaniosis.
- *Reacciones inmunoenzimáticas (ELISA):* estos test se basan en el uso de anticuerpos anti-anticuerpos. En cambio, al contrario de las sustancias fluorescentes, los anticuerpos empleados serán marcados con enzimas. En el ensayo conocido por ELISA (Enzyme linked Inmunosorbent Assay), la reacción se hace en tubos o placa de material plástico con excavaciones, en las cuales la superficie interna es cubierta por antígenos de tripanosomas, luego, se le debe adicionar el suero a ser investigado, se incuba el sistema por dos horas a temperatura ambiente. Enseguida se lava y se adiciona el anticuerpo anti-anticuerpo enzimáticamente marcado (fosfatasa alcalina o peroxidasa), incubando nuevamente por tres horas a temperatura ambiente. Se lava de nuevo, se incluye el respectivo substrato para la actuación enzimática, y una vez más se incuba a temperatura ambiente a 30 minutos hasta una hora, tiempo al final del cual se adiciona NaOH 3N, para la interrupción de la reacción enzimática. Se debe leer en espectrofotómetro a 440 nm o 400 nm (para substratos de fosfatasa alcalina). Por su fácil ejecución, y por su bajo costo, es indicado para la investigación de esta enfermedad infecciosa parasitaria en gran escala. Estudios apuntan una sensibilidad de 98,0 %.
- *Agglutinación de látex (directa):* desarrollada en 1971, teniendo origen similar a la hemaglutinación, pero utilizando partículas de látex adsorbidas con antígeno, a la inversa de eritrocitos sensibilizados. La técnica es la misma de la hemaglutinación,

siendo la lectura realizada más rápida (5-7 minutos). Tanto para la fase aguda, como para la fase crónica, la positividad es aproximadamente en la escala de 94,0 %.

- ***Test de Flocculación Rápida:*** En este ensayo, se utilizan tripanosomas fijados por formol, posteriormente rotos por el ultrason y liofilizados. Para realizar el examen, se debe añadir sobre una lámina de vidrio una gota de reactivo ya descrito arriba y una gota del suero-problema, agítese por ocho minutos. Al final se puede realizar la lectura. La sensibilidad de este método es similar a los ensayos descritos anteriormente (Montes, 2018; Román, et al., 2013).

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LEISHMANIASIS

Propósito:

Constituye un diagnóstico de certeza donde se evidencia la presencia directa de amastigotes de *Leishmania* spp. en diferentes materiales humanos, según la patología específica, como aspirado de médula ósea para leishmaniasis visceral y raspado de lesión para leishmaniasis cutánea. Se pueden utilizar varios métodos, como frotis, cultivo y biopsia.

I-Frotis

Es un método rápido, de bajo costo, alta sensibilidad y específico. Es el de elección para el diagnóstico confirmatorio de leishmaniasis cutánea. Su análisis se hace por coloración y observación microscópica.

Muestra.

Se extrae a partir de una incisión del borde de la lesión (lesión cutánea ulcerada), del centro de una lesión (lesión cutánea no ulcerada), aspirado de médula ósea o de otros órganos (hepático, ganglionar y en raras ocasiones esplénico) en el caso de leishmaniasis visceral, obtenido de pacientes o de material post-mortem.

En este último tipo de leishmaniasis, la toma de muestra es un método invasivo que sólo puede ser realizado por médicos, el cual requiere de un equipo especial, experiencia y condiciones de nivel hospitalario.

En el caso de una leishmaniasis mucocutánea, el frotis no es muy utilizado porque la sensibilidad diagnóstica se reduce, causado por el número reducido de parásitos en las lesiones mucosas y la obtención de la muestra, conlleva a la obtención de una biopsia por un especialista bajo condiciones adecuadas de asepsia.

La solución de Giemsa, se prepara de igual forma que para el diagnóstico de malaria y la solución de amortiguadora con pH = 7.0-7.2, se elabora de igual manera que para el diagnóstico de paludismo (Montes, 2018; Román, et al., 2013).

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 Povdone (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

La obtención de la muestra para frotis requiere el uso de guantes.

- 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) y con los bordes más indurados.
- De ser necesario tomar muestra de varias lesiones.
- Limpiar el área elegida con algodón o gasa y etanol al 70 %.
- Dejar secar.
- 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.
- 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.
- Cuando se refiere a una médula ósea, el médico extiende el aspirado en varios porta-objetos, como si fuera extendido fino para paludismo.
- Si se trata de un fragmento de tejido-biopsia, el médico debe realizar 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.
- Realizar la coloración.

- Fijar la muestra depositando metanol puro directamente sobre el preparado colocando la lámina verticalmente.
- Dejar secar.
- Realizar la coloración con la solución de Giemsa (igual que para el diagnóstico de paludismo).
- Si fuera una muestra de medula ósea preparar solución de trabajo de Giemsa 1:50 y colorear durante una hora.
- Enjuagar suavemente.
- Dejar secar y observar al microscopio con aceite de inmersión.
- 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 de la presencia de protozoos tisulares

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 se basa en poseer un citoplasma vacuolado levemente azul, un núcleo y un cinetoplasto, ambos de color púrpura (Montes, 2018; Román, et al., 2013).

La visualización de ambos elementos es la clave en la diferenciación con otros organismos, como levaduras.

2-Cultivo

Para realizar un cultivo, previamente se deben 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 frotis, ya que facilita la reproducción de los promastigotes de *Leishmania* spp, permite la caracterización del parásito aislado y puede emplearse en la preparación de antígeno.
- Posee gran valor en el diagnóstico de la leishmaniasis muco-cutánea y en la leishmaniasis visceral, especialmente si hay poca cantidad de parásitos.

Desventajas.

- Es un método más complejo de preparar y examinar, también es más costoso.

- El crecimiento de los promastigotes varía mucho; algunas especies como *L. braziliensis* no crecen bien.
- En ocasiones se contamina.
- Requiere de personal de laboratorio más especializado para su realización.
- Necesita esperar varios días y hacer uno o varios pases 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 variados números de medios de cultivos para *Leishmania* spp., pero el medio clásico de Novy, Nicolle y Mc. Neal (NNN) es el más empleado.

Preparación de medios de cultivo

- Autoclave
- Mechero
- Incubadora a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- 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.
- Se debe colocar los ingredientes en un Erlenmeyer e introducir en el 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.
- 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, se debe 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.

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

Otras muestras

El medio de cultivo también se puede inocular con otro material obtenido del paciente como sangre, médula ósea y 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 debe realizar la maceración de tejidos en un mortero estéril, luego se le agregan los antibióticos (solución Penicilina/Estreptomina) para evitar crecimiento bacteriano. El tejido así preparado se distribuye en dos tubos de medio que se guardan a 26° C ± 2°C en una gradilla, debidamente rotulados (Musto, 2013).

Examen del cultivo

- El líquido en el fondo del tubo de cultivo debe revisarse una o dos veces por semana a partir del cuarto día, en un microscopio invertido, que es más rápido y se evita la contaminación. Si no se contara con dicho equipo, se tomará una gota de la fase líquida con pipeta Pasteur estéril (bajo mechero encendido).
- Se debe 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 realizarse 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.

Estimación de la densidad parasitaria de amastigotes de material esplénico

- Permite aumentar la sensibilidad de la detección de los amastigotes de *Leishmania* spp. presentes en bazo, así como indica la cantidad de parásitos presente.
- Ofrece una medida objetiva de la velocidad de la respuesta al tratamiento.
- Distingue entre los pacientes de respuesta lenta y los que no responden

La aspiración debe ser practicada por un médico, previo cálculo del tiempo de protrombina (que no debe superar en más de cinco 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 emplean los mismos reactivos y los procedimientos que para preparar, colorear y examinar un frotis de sangre.
- La densidad parasitaria se informa por grados, utilizando un ocular de 10X y un objetivo de inmersión 100X.
- El laboratorio debe guiarse para informar sobre la densidad de amastigotes, por el Grado de Densidad Parasitaria Media:

Grado de Densidad Parasitaria Media	Número de parásitos observados por campo microscópico
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.

Método de Knott. Concentración y coloración de microfilarias.

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 (Ash and Orihel, 1987; Izquierdo, et al., 2019).

Muestras

Sangre recolectada por punción venosa y colocada en:

- Un tubo con citrato como anticoagulante para analizarla después;
- 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
- Buffer (o solución amortiguadora) alcalino-
- Solución madre Na₂HP04 (fosfato de sodio dibásico) 9,5 g.
- Agua destilada 1,000 MI.
- 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.
- Colorante de hematoxílina de Delafield.
- Cristales de hematoxilina 4 g.
- Alcohol etílico al 95 % 125 mL.
- Solución saturada de sulfato de aluminio y amonio [AlNH₄ (SO₄) 2.12H₂ O] 400 mL.
- Glicerina pura 100 mL.
- Solución acuosa al 0,1 % de ácido clorhídrico líquido.
- Amonio líquido gotas. Disolver los cristales de hematoxilina en 25 mL de alcohol etílico al 95 %.
- Añadir esto a 400 mL de solución saturada de sulfato de aluminio y amonio.
- Colocar en frasco con tapón de algodón y exponer a la luz y aire por 3-5 días.
- Filtrar y añadir 100 mL de glicerina y 100 mL de alcohol etílico al 95%.
- Tapar y dejar reposar a la luz varios días.
- Filtrar y guardar en frasco bien tapado y rotulado.
- Anticoagulante de citrato al 2%.
- Citrato de sodio---- 2 g.
- Solución salina 0,85 %----- 98 mL.
- Mezclar bien.
- Tomar 1 mL por cada 5 mL de sangre.

Materiales

- Pipetas Pasteur bulbo de goma para pipetas.
- Porta-objetos de 7,5 x 2,5 cm (3 x 1 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 centrifuga, 15 mL de capacidad, o tubos de 13 x 100 mm de fondo redondo.

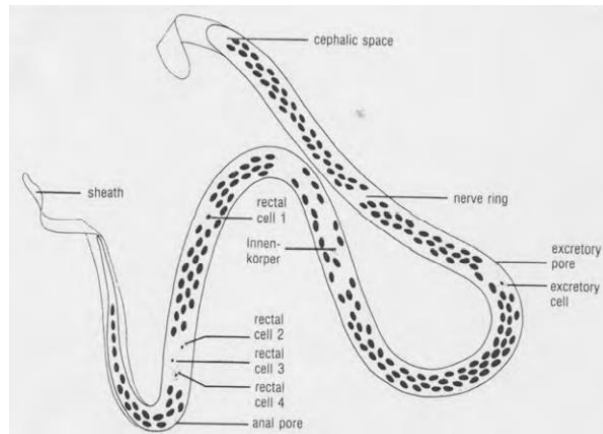
Procedimiento:

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

- Obtener 1 mL de sangre por punción venosa, o 1 mL de la sangre con anticoagulante y mezclar en el tubo rotulado con 10 mL de formalina al 2 % para iniciar hemolisis. Mezclar muy bien. Centrifugar a 1,500 rpm por 2 minutos.
- Decantar el sobrenadante cuidando de no agitar el sedimento en el fondo del tubo.
- Con una pipeta Pasteur tomar una muestra del sedimento, colocar una porción sobre un porta-objetos, cubrir y examinar al microscopio con objetivo 10X.
- Con la otra porción del sedimento, hacer un extendido fino en lámina previamente identificada y dejar secar completamente a temperatura ambiente.
- Colorear con 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).
- Fijar el extendido fino ya seco en metanol durante 30 segundos y dejar secar.
- Introducir en frasco con colorante de Giemsa, esperar el tiempo, indicado según la dilución preparada.
- Lavar la preparación en agua buferada o agua corriente, dejar secar y examinar al microscopio óptico.

Reacción:

El cuerpo de la microfilaria, la célula excretora y las células se tiñen de azul purpúreo; el poro excretor y el poro anal se verán rosados o rojos. La vaina de *Wuchereria bancrofti* se verá rosado suave o a veces no se vera. La vaina de *Brugia malayi* tendrá un color rosado brillante; la de *Loa loa* no se tiñe con Giemsa Ash and Orihel, 1987; Izquierdo, Boucourt, Jiménez, 2020).



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

Figura 5. Estructura y células a reconocer de una microfilaria para la identificación de especies.

RESUMEN

Los métodos indirectos de diagnóstico parasitológico permiten establecer un diagnóstico de probabilidad y se basan en la interpretación de las reacciones del hospedero, como en el caso del citodiagnóstico, los exámenes de biometría hemática como el hemograma con diferencial (permite detectar eosinofilia), la cual se presenta de forma frecuente en las parasitosis intestinales), el histodiagnóstico que permite medir una reacción granulomatosa por hipersensibilidad tipo IV, cambios metaplásicos e inflamación en los tejidos así como las pruebas imagenológicas como el Rx de tórax o abdomen, el ultrasonido, la tomografía axial computarizada (TAC), la resonancia magnética nuclear, entre otras no menos importantes.

Es muy relevante destacar el papel que desempeña técnicas que emplean la sangre como muestra fundamental para la realización del diagnóstico parasitológico, tales como la gota gruesa y el extendido, así como los métodos de inmunoserodiagnóstico que ocupan un lugar cimero, tanto para la identificación de antígenos, como para la detección de anticuerpos, en tanto permiten medir la respuesta inmune “in vivo” e “in vitro”. En este sentido, las últimas se clasifican en dos grandes grupos: las utilizadas para medir inmunidad celular y las empleadas para medir inmunidad humoral, las cuales son muy específicas. En estas reacciones se busca establecer una cantidad o concentración relativa de los antígenos o los anticuerpos. Habitualmente se trata de determinar título de anticuerpo en suero (mínima cantidad del mismo que reacciona en forma positiva frente a una prueba serológica dada). Las técnicas cualitativas buscan identificar antígenos-anticuerpos conociendo uno de ellos.

Dentro de todo esto, los métodos indirectos o de evidencia primarios, son aquellos que cuando la reacción antígeno-anticuerpo se produce, es necesario efectuar cambios físicos del complejo incorporando otras sustancias, son ellas: neutralización, fijación del complemento,

ELISA (ensayo inmunoenzimático ligado a enzima), Radioinmunoanálisis (RIA) e Inmunofluorescencia (IF).

Los métodos directos o de evidencia secundaria, la interacción del antígeno con el anticuerpo se pone de manifiesto porque esta reacción por sí misma produce cambios en el estado físico del complejo antígeno-anticuerpo.

-Reacción de Precipitación: tipos en medios sólidos (inmunodifusión simple o radial, inmunodifusión doble, inmunoelectroforesis y contrainmunolectroforesis

-Reacción de Aglutinación

Dentro de los métodos para medir la inmunidad celular (técnicas “in vivo”), se incluye la intradermorreacción es una de las más significativas; pueden ser de lectura rápida, (miden la hipersensibilidad inmediata) o de lectura retardada (miden hipersensibilidad tardía), la reacción aparece luego de inyectar en la dermis un antígeno contra el cual el individuo está sensibilizado. Mientras que las técnicas “in vitro” son realizadas para evaluar poblaciones linfocitarias a través de la identificación de linfocitos T, identificación de linfocitos B, las técnicas para evaluar actividad de linfocitos (cultivo mixto de linfocitos y test de transformación linfoblástica.

Por todo lo anteriormente explicado, es imprescindible que el médico de asistencia esté informado de cuáles técnicas diagnósticas realiza su laboratorio de forma sistemática, y cuales sólo cuando se solicitan de forma específica. Existe una gran variedad de tipos de análisis de laboratorio para diagnosticar las enfermedades parasitarias y su selección dependerá de los signos y los síntomas del paciente. En este manual se recoge el procesamiento de muestras de diversa índole, así como las distintas técnicas que se pueden desarrollar a partir de disímiles muestras, todo lo cual dependerá en última instancia del sitio de infección.

Los laboratorios de Parasitología de los países en vías de desarrollo continúan dependiendo en gran medida del examen microscópico de las muestras, método de limitada sensibilidad y muy dependiente de la experiencia del microscopista, pero cada día se impone más el empleo de técnicas de gran especificidad y calidad como las de biología molecular, destacándose la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA

Ash, L., Orihel, T. (1987) Parasites, a guide to laboratory procedures and identification. American Society of Clinical Pathologists.

CDC [Centros para la Prevención y Control de Enfermedades] (2020). Parásitos: tripanosomiasis americana (también conocida como enfermedad de Chagas).

Recursos para profesionales de la salud.

https://www.cdc.gov/parasites/chagas/health_professionals/index.html

Enlace Hispanoamericano de Salud (2012). Procesamiento de muestras sanguíneas para diagnóstico de malaria. Proyecto AECID “Nuevos procedimientos para el diagnóstico de enfermedades olvidadas utilizando tele-microscopía de bajo coste”.
https://www.academia.edu/35400911/DIAGN%C3%93STICO_DE_MALARIA_PROCESAMIENTO_DE_MUESTRAS_SANGU%C3%8DNEAS_PARA_DIAGN%C3%93STICO_DE_MALARIA

Fernández, M. [Coord] (2020) Técnicas de inmunodiagnóstico. *Arán*
<https://ediciones.grupoaran.com/upload/books/muestras/libros/LIBTSLAB07.pdf>.

Girard de Kaminsky, R. (2014). Manual de Parasitología. Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas. 3ra. Ed. OMS-OPS.
<http://www.bvs.hn/Honduras/Parasitologia/ManualParasitologia/pdf/ManualParasitologia3.pdf>

IIRT [Instituto de Investigaciones en Enfermedades Tropicales] (2018) Manual de Técnicas básicas para diagnóstico parasitológico. Sede Regional Orán. Argentina.
http://www.iiet.unsa.edu.ar/sites/default/files/Manual%20IIRT_0.pdf

INDRE [Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”] (2018) Lineamientos para la vigilancia por laboratorio del paludismo. México: Secretaría de Salud.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/487411/LVL_Paludismo_4T.pdf

Izquierdo, A., Boucourt, E., Jiménez, M. (2020) Identificación de *Taenia saginata* en una escolar de 9 años. *Journal of Science and Research: Revista Ciencia e Investigación*, 5(1), 925-935 <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7723211>

Izquierdo, A., Boucourt, E., Jiménez, M., Carrera, M. (2019) Clinical-epidemiological update: human infection by *Dirofilaria immitis* and other zoonotic filarias. *Journal of Science and Research: Revista Ciencia e Investigación*, 4(3).
<https://doi.org/10.5281/zenodo.3279512>

López, M.C., Knudson, A., Ortiz, C., Salazar, M.J. (2020) Enfoque clínico y de pruebas diagnósticas en parasitología. *Makina* Editorial.

Ministerio de Salud Perú y Instituto Nacional de Salud. (2014). Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de los Parásitos Intestinales del hombre Serie de Normas Técnicas n° 37.
https://bvs.ins.gob.pe/insprint/SALUD_PUBLICA/NOR_TEC/2014/serie_normas_tecnicas_nro_37.pdf

- Ministerio de Salud Pública de Ecuador (2019) Sistema de Aseguramiento de la Calidad del Diagnóstico Parasitológico de Malaria. Manual. Quito: Dirección Nacional de Normatización. <http://salud.gob.ec>
- Montes, N. (2018) Técnicas de inmunodiagnóstico. *Síntesis*.
<https://www.sintesis.com/data/indices/9788491711452.pdf>
- Musto, A. [cood.] (2013). Manual de Microbiología y Parasitología. 2da ed. Universidad Nacional Arturo Jauretche, Argentina. <https://www.unaj.edu.ar/wp-content/uploads/2018/06/Manual-de-Microbiologia-y-Parasitologia-2013.pdf>
- OPS [Organización Panamericana de la Salud] (2019) Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas.
https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/49653/9789275320433_spa.pdf
- Pearson, R. (2020) Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). *Manual MSD*.
<https://www.msmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/protozoos-extraintestinales/enfermedad-de-chagas>
- Román, E., Valencia, R., Fernández, J., Gallardo, V. (2013). Contribution of the microbiology laboratory to epidemiologic surveillance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(7), 387-388. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-aportaciones-del-laboratorio-microbiologia-vigilancia-13050535>
- Salinas, M.C., Medina de la Garza, C. E. (2014) Capítulo 41: Técnicas inmunológicas para el estudio de antígenos parasitarios. En Becerril, M.A. Parasitología médica, 4e. McGraw-Hill/Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Sanchén, A., Rodríguez, I., Torres, L., Cordero, M. (2010). Caracterización epidemiológica y microbiológica de las meningoencefalitis bacterianas. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 14(3) http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552010000300013&lng=es&tlng=es.
- Turrientes, M^a.C. y López, R. (2001). Aspectos prácticos del diagnóstico de laboratorio y profilaxis de la malaria Unidad de Medicina Tropical y Parasitología Clínica. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. Control Calidad SEIMC
<https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/malaria.pdf>