

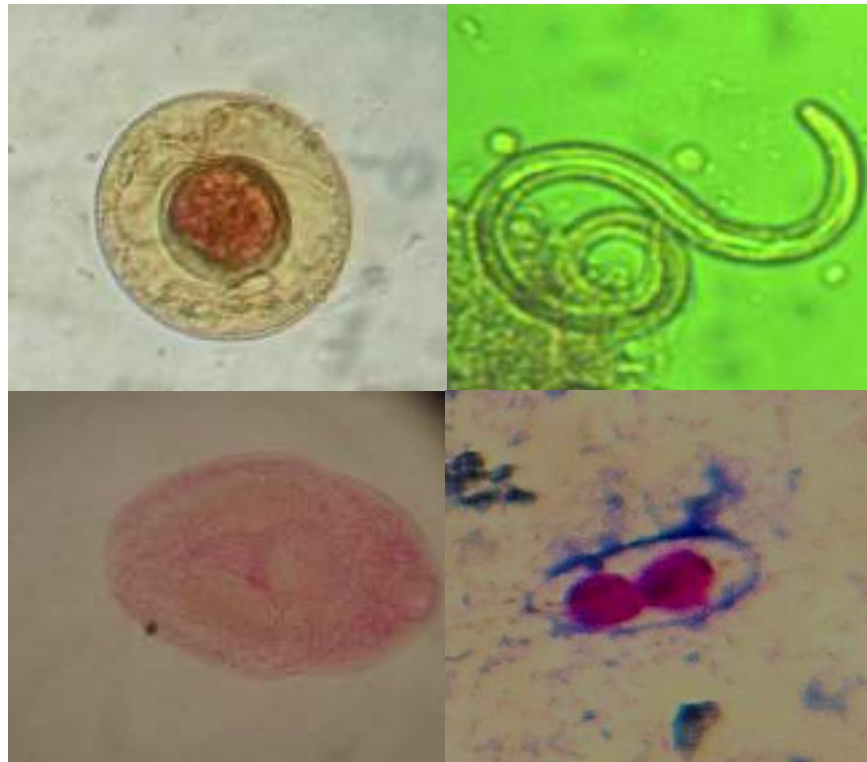


PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LOS PARÁSITOS INTESTINALES DEL HOMBRE



Serie de Normas Técnicas 37

Lima - 2014

MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ

MINISTRA

Midori Musme de Habich Rospigliosi

VICEMINISTRO

Aníbal Velásquez Valdivia

VICEMINISTRA DE PRESTACIONES Y ASEGURAMIENTO EN SALUD

María Giusti Hundskopf

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

ALTA DIRECCIÓN

Jefe institucional

Carlos Ernesto Bustamante Donayre

Subjefe institucional

Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas

ÓRGANOS DE LINEA

Centro Nacional de Alimentación y Nutrición

Directora general

María Virginia Castillo Jara

Centro Nacional de Control de calidad

Director general

Rubén Gaspar Tabuchi Matsumoto

Centro Nacional de productos Biológicos

Director general

Alberto Valle Vera

Centro Nacional de Salud Intercultural

Director general

Oswaldo Salaverry García

Centro Nacional de Saludo Ocupacional y Protección del Ambiente Para la Salud

Directora general

María del Carmen Gastañaga Ruiz

Centro Nacional de Salud Pública

Director general

Sergio Recuenco Cabrera

ÓRGANOS DE ASESORAMIENTO

Oficina General de Asesoría Técnica

Director general (e)

Pedro Valencia Vásquez

Oficina General de Asesoría Jurídica

Directora general

Marita Mercado Zavaleta

Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica

Director general

Hans Demetrio Vásquez Soplopuco

ÓRGANOS DE APOYO

Oficina General de Administración

Director general

Oswaldo Mostacero León

Oficina General de Información y Sistemas

Director general

José Luis Segovia Juárez

COMITÉ EDITOR

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

PRESIDENTE

Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas

MIEMBROS

Zuño Burstein Alva

Hugo Arroyo Hernández

José Luis Segovia Juárez

Hans Demetrio Vásquez Soplopuco

Olinda Graciela Rengifo García

Daniel Cárdenas Rojas

Lely Solari Zerpa

Rosa Amelia Mendoza Yanavilca

Lucio Pepe Huamán Espino

Oswaldo Salaverry García

Miguel Ángel Grande Ortiz

Juan Cossio Brazzan

Secretaría Técnica

Bertha Huarez Sosa



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LOS PARÁSITOS INTESTINALES DEL HOMBRE

ELABORADO POR:

María Beltrán Fabián de Estrada
Jannet Otárola Mayhua
Kathia Tarqui Terrones

Catalogación hecha por el Centro de Documentación e Información del INS

Beltrán Fabián de Estrada, María

Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre /
elaborado por María Beltrán Fabián de Estrada ; Jannet Otárola Mayhua ; Kathia Tarqui Terrones --
Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2014.

96 p : il., graf., tab., 21 x 29.5 cm – (Serie de Normas Técnicas; 37)

1. PARASITOSIS INTESTINALES /diagnóstico 2. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO
/normas 3. PERÚ

I. Otárola Mayhua, Jannet

II. Tarqui Terrones, Kathia

II. Perú. Ministerio de Salud

IV. Instituto Nacional de Salud (Perú)

ISBN 978-612-310-040-7

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N.º 2014-13312

2da. edición (septiembre, 2014)

Tiraje 1000 ejemplares

©Ministerio de Salud, 2014

Av. Salaverry cuadra 8 s/n, Jesús María, Lima, Perú

Tel.: (511) 315-6600

Página web: www.minsa.gob.pe

©Instituto Nacional de Salud, 2014

Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú

Tel.: (511) 4781111

Correo electrónico: postmaster@ins.gob.pe

Página Web: www.ins.gob.pe

La versión electrónica de este documento se encuentra disponible en forma gratuita en www.ins.gob.pe

Se autoriza su reproducción total o parcial siempre y cuando se cite la fuente.

CONTENIDO

Introducción	V
Sección 1. Generalidades	1
1.1 Objetivo	1
1.2 Campo de aplicación	1
1.3 Responsabilidades	1
1.4 Documentos de referencia	1
1.5 Definiciones y abreviaturas	2
Sección 2. Medidas de bioseguridad	4
2.1 Responsabilidades	4
2.2 Campo de aplicación	4
Sección 3. Obtención de muestras	5
3.1 Condiciones generales	5
3.2 Muestra para el examen parasitológico	6
Sección 4. Envío y transporte de muestras	7
4.1 Objetivo	7
4.2 Condiciones especiales	7
4.3 Procedimiento	8
4.4 Rechazo de una muestra	8
Sección 5. Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico - heces	9
5.1 Examen microscópico y macroscópico	9
5.2 Examen directo microscópico	10
5.3 Método de concentración	11
5.4 Método cuantitativo de Kato Katz (análisis cuantitativo = hgh)	22
5.5 Métodos de coloración para protozoarios	25
5.6 Métodos de coloración para helmintos	31
5.7 Fijadores y conservadores	35
Sección 6. Cultivos parasitológicos	40
6.1 Medios de cultivo para protozoos	40
6.2 Métodos de desarrollo para helmintos	41
Sección 7. Examen de secreciones y fluidos	46
7.1 Esputo	46
7.2 Aspirado, secreciones o jugo duodenal	47
7.3 Secreción, fluido y contenido intestinal	48
Sección 8. Diagnóstico de <i>Enterobius vermicularis</i> por el método de Graham (cinta adhesiva transparente)	49
8.1 Fundamento	49
8.2 Materiales	49
8.3 Procedimiento	49
8.4 Observación	50
8.5 Resultado	50

Sección 9. Examen de biopsias	51
9.1 Biopsias del tubo digestivo	51
9.2 Recomendaciones.....	51
Sección 10. Resultados	52
10.1 Generalidades	52
10.2 Resultado positivo	52
10.3 Resultado negativo.....	52
10.4 Formato para entrega de resultados	53
Sección 11. Examen de muestras de agua superficiales	54
11.1 Generalidades	54
11.2 Uso y elaboración del hisopo de gasa.....	54
11.3 Obtención de muestras de agua en hisopo de gasa	54
11.4 Obtención de muestras de agua en botella o frasco	54
11.5 Procesamiento de muestras de agua en hisopo de agua	55
11.6 Procesamiento de muestras de agua en botella o frasco.....	55
Bibliografía	56
Anexos	
Anexo A. Principales parásitos intestinales del hombre	57
Anexo B. Algoritmo para el examen parasitológico	66
Anexo C. Preparación de reactivos y colorantes	71
Anexo D. Claves de identificación de los protozoarios (amebas y flagelados) y helmintos.....	78
Anexo E. Elementos que pueden confundirse con los parásitos intestinales	83
Anexo F. Registro de los parásitos intestinales en el laboratorio por mes y por año.....	87
Anexo G. Ficha para el estudio del cultivo de <i>Entamoeba histolytica</i> (cpa)	90
Anexo H. Parásitos no intestinales: <i>Paragonimus</i> y <i>Fasciola</i> (distomatosis pulmonar y hepática)	91
Anexo I. Micrometría.....	92

INTRODUCCIÓN

Dentro de los problemas de salud pública que el país debe enfrentar, uno en especial, ha elevado su tasa de prevalencia y se ha convertido en una grave dificultad entre sectores de menos recursos, se trata del parasitismo intestinal, problema que agrava más la ya deteriorada salud de la población.

La presencia de factores desfavorables para la salud de la comunidad, como el fecalismo, el deficiente saneamiento ambiental, la pobreza, el bajo nivel educativo y los hábitos de higiene inadecuados, permiten la presencia y expansión del parasitismo intestinal, preferentemente en el grupo de menor edad.

Los parásitos intestinales son protozoos y helmintos que en sus estadios evolutivos pueden observarse en las heces, secreciones, fluidos y frotis perianal de las personas. Estos parásitos afectan el desarrollo intelectual y nutricional de la población y se convierte en otro factor que afecta la economía.

Para el estudio de las parasitosis intestinales existe la necesidad de contar con un manual para el diagnóstico oportuno y preciso de estas infecciones, el cual nos permita tomar las acciones correctivas inmediatas y mediatas, ya sea de tratamiento con medicación, diagnóstico y capacitación adecuada en prevención de los parásitos.

El "Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de los parásitos intestinales del hombre" elaborado en el Laboratorio de Enteroparásitos del Centro Nacional de Salud Pública, es una compilación de los métodos evaluados más usados y útiles para el diagnóstico de las enteroparasitosis, que pueden realizarse en la Red Nacional de Laboratorios en Salud Pública del país, así como en aquellos laboratorios con infraestructura, equipos e instrumental mínimos.

Se detalla los procedimientos más apropiados para el diagnóstico de los parásitos intestinales, *Fasciola* y *Paragonimus* (fase crónica) descritos en nuestro medio; asimismo, se considera la detección de los parásitos en muestras de agua superficiales mediante el uso del hisopo de gasa.

Este manual será de ayuda inmediata y sencilla para el personal técnico y profesional de los laboratorios locales, intermedios y regionales de la Red Nacional de Laboratorios en Salud Pública del país.

Las autoras

SECCIÓN 1

GENERALIDADES

1.1 Objetivo

Establecer los procedimientos normativos para realizar el diagnóstico parasitológico de las infecciones y enfermedades producidas por los parásitos intestinales y otros que se encuentran en las muestras coprológicas (*Fasciola*, *Paragonimus*, *Clonorchis*, *Macracanthorhynchus*, *Linguatula*, *Capillaria*, etc.).

1.2 Campo de aplicación

Se aplica en laboratorios de establecimientos de salud del sistema de la Red Nacional de Laboratorios en Salud Pública, Fuerzas Armadas y Policiales y EsSalud.

1.3 Responsabilidades

1.3.1 El Centro Nacional de Salud Pública (CNSP), a través de su Dirección Ejecutiva de Enfermedades Transmisibles, es responsable de autorizar el diseño, elaboración, revisión y actualización del presente manual, de acuerdo con los procedimientos aprobados por el Instituto Nacional de Salud.

1.3.2 Los directores de los establecimientos de salud son responsables de autorizar, proporcionar los recursos necesarios y designar al personal responsable para la aplicación de las disposiciones contenidas en el presente manual.

1.3.3 El personal de los establecimientos de salud es responsable de planificar, organizar, ejecutar, capacitar y controlar sus acciones, de acuerdo con las disposiciones contenidas en este manual.

1.3.4 Los jefes o responsables de los laboratorios deben asegurar el control de calidad interno, la idoneidad del personal, equipos, materiales y reactivos, la mejor utilización del recurso humano y la distribución de los ambientes e instalaciones.

1.3.5 El personal profesional, técnico / operativo y auxiliar es responsable de seguir las especificaciones contenidas en el presente manual y aplicar los procedimientos indicados.

1.3.6 Culminados los procedimientos de laboratorio, el personal encargado del manejo de muestras biológicas, así como el director del establecimiento, son responsables de la neutralización y eliminación de los desechos en lugares apropiados.

1.4 Documentos de referencia

1.4.1 **Instituto Nacional de Salud.** Guía de procedimientos diagnósticos de las parasitosis intestinales. Lima: INS; 1998.

1.4.2 **Instituto Nacional de Salud.** Manual de Procedimientos de Laboratorio para la Obtención y Envío de Muestras (I). Segunda Edición. Lima: INS, 1997. Serie de Normas Técnicas N.º 15.

1.4.3 **Instituto Nacional de Salud.** Manual de Procedimientos Bioseguridad en los Laboratorios de Ensayo, Biomédicos y Clínicos. Serie de Normas Técnicas INS 2005. Norma Técnica N.º 18.

- 1.4.4 **Instituto Nacional de Salud.** Manual de laboratorio del nivel local. Lima: INS; 1993.
- 1.4.5 **Instituto Nacional de Salud.** Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de los Parásitos Intestinales del Hombre. Lima INS 2003. Serie de Normas técnicas N.º 37.

1.5 Definiciones y abreviaturas

- 1.5.1 **AFA:** fijador conteniendo alcohol, formol y ácido acético.
- 1.5.2 **Antígeno:** sustancia generalmente de naturaleza proteica, capaz de provocar una respuesta del sistema inmunitario.
- 1.5.3 **Anticuerpo:** inmunoglobulina que es capaz de reaccionar con antígenos y provocar su neutralización o modificación.
- 1.5.4 **Aplicador:** trozo de madera tipo bajalenguas, útil en aplicación de métodos de diagnóstico parasitológico.
- 1.5.5 **Bioseguridad:** conjunto de medidas de protección contra cualquier tipo de acción que ponga en peligro la salud del ser humano.
- 1.5.6 **CI:** clasificación internacional.
- 1.5.7 **Cápsula ovígera:** vesícula que contiene huevos.
- 1.5.8 **Céstode:** gusano o helminto platelminto de forma acintada.
- 1.5.9 **Centrifugación:** sedimentación del contenido de una suspensión mediante la fuerza centrífuga.
- 1.5.10 **Colorante vital:** colorante en solución salina que permite ver la estructura interna del parásito vivo.
- 1.5.11 **Coproantígeno:** antígeno presente en las heces.
- 1.5.12 **Cristal de Charcot - Leyden:** cristales de proteínas provenientes de los gránulos de eosinófilos, que se destruyen en el intestino.
- 1.5.13 **Diafanizar:** aclarar para facilitar la visualización microscópica.
- 1.5.14 **Diagnóstico parasitológico:** demostración directa o indirecta de alguna forma o estadio evolutivo del parásito.
- 1.5.15 **Enteroparásito:** parásito que tiene por hábitat el tubo digestivo, especialmente el intestino.
- 1.5.16 **Espora:** esporoquiste aislado. Estadio o elemento infectante de los microsporidios.
- 1.5.17 **Esporoquiste:** quiste con cubierta definida que contiene esporozoítos.
- 1.5.18 **Estróbila:** porción del cuerpo de las tenias o céstodos formadas por una cadena de proglótidos.
- 1.5.19 **Fijación:** conservación de la estructura del parásito.
- 1.5.20 **Heces:** mezcla de productos de excreción y secreción que se eliminan por el intestino.
- 1.5.21 **Helminto:** ser pluricelular con exoesqueleto flexible, ausencia de apéndices y con movimientos reptantes.

- 1.5.22 **hgh:** número de huevos por gramo de heces.
- 1.5.23 **Huevo:** producto de la fecundación con potencialidad de desarrollar un nuevo ser.
- 1.5.24 **Herida:** pérdida de piel y potencial puerta de entrada de agentes patógenos.
- 1.5.25 **Invasivo(a):** agente infectante que tiene capacidad de invadir tejidos.
- 1.5.26 **Larva:** estadio evolutivo de algunos seres vivos como los helmintos y los artrópodos en quienes aún no se han desarrollado el aparato genital.
- 1.5.27 **MIF:** fijador que contiene merthiolate, yodo y formol.
- 1.5.28 **montar:** colocar el espécimen entre lámina y laminilla con bálsamo de Canadá para su conservación permanente.
- 1.5.29 **Nemátode:** gusano o helminto de forma cilíndrica.
- 1.5.30 **Neutralizar:** incorporación de un agente químico a la muestra biológica, es capaz de eliminar todo agente vivo.
- 1.5.31 **Ooquiste:** quiste que contiene el huevo o cigote.
- 1.5.32 **Organoléptico:** características orgánicas de una sustancia (consistencia, color, olor, etc.).
- 1.5.33 **PAF:** fijador o conservador (contiene fenol, alcohol y formol) para muestras con parásitos, sobre todo protozoarios.
- 1.5.34 **PVA:** alcohol polivinílico, fijador para conservar los parásitos en muestras fecales.
- 1.5.35 **Parásito:** ser vivo de escala zoológica inferior que vive a expensas de otro de escala superior.
- 1.5.36 **Patogenicidad:** capacidad de producir daño.
- 1.5.37 **Protozooario:** ser unicelular.
- 1.5.38 **PMNS:** polimorfonucleares
- 1.5.39 **Proglótide -o:** segmento o anillo de la estróbila de las tenias o céstodes que puede ser inmaduro, maduro o grávido, según el estadio de desarrollo de sus aparatos genitales.
- 1.5.40 **Quiste:** forma de resistencia de los protozoos, los cuales se rodean de una membrana dura e impermeable.
- 1.5.41 **Solución sobresaturada:** solución en la cual el soluto está en su máxima concentración.
- 1.5.42 **SAF:** fijador que contiene acetato de sodio, ácido acético glacial y formol.
- 1.5.43 **Trofozoíto:** forma vegetativa de los protozoos libres y en movimiento.
- 1.5.44 **Tremátode-o:** gusano aplanado o platelminto, que presenta su cuerpo indivisible.

SECCIÓN 2

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

2.1 Responsabilidades

El personal involucrado en los diferentes procesos para el diagnóstico parasitológico de las infecciones o enfermedades deben cumplir los requisitos y aplicar las medidas establecidas en el Manual de Normas de Bioseguridad (Serie de Normas Técnicas N° 18), editado por el Instituto Nacional de Salud.

2.2 Campo de aplicación

Se deben cumplir y controlar las medidas necesarias, en especial las siguientes:

2.2.1 Del personal

2.2.1.1 Manipular con guantes la obtención, recepción y tratamiento de las muestras frescas.

2.2.1.2 Descartar rápidamente el material fresco, o fijar en caso de conservación.

2.2.2 Tipos de agentes

2.2.2.1 Considerar como material de alto peligro las muestras de pacientes con VIH o hepatitis B.

2.2.3 La vestimenta

2.2.3.1 Vestir siempre mandil dentro del laboratorio y quitárselo para transitar por otras áreas.

2.2.4 Área de examen de las muestras

2.2.4.1 Debe ser una sola dentro del laboratorio.

2.2.5 Envío de muestras al laboratorio

2.2.5.1 El único material fresco que se puede enviar de un laboratorio a otro laboratorio es el cultivo, el resto debe fijarse para su envío.

2.2.6 En casos de accidentes

2.2.6.1 Cubrir con papel periódico donde hay derrame de la muestra biológica e incorporar sobre este hipoclorito de sodio o formol al 10 % por aproximadamente 45 a 60 minutos, salir del área donde ocurrió el incidente.

2.2.7 El laboratorio

2.2.7.1 Debe salir el personal para evitar los productos químicos colocados por el accidente

2.2.7.2 Registrar el incidente o accidente ocurrido

2.2.8 Neutralización y eliminación del material biológico

2.2.8.1 La descontaminación debe ser en cada laboratorio y el material sucio debe eliminarse o lavarse.

SECCIÓN 3

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

3.1 Condiciones generales

- 3.1.1 Los parásitos intestinales del hombre son protozoarios o helmintos llamados comúnmente gusanos intestinales (Anexo A). Estos helmintos o gusanos pueden ser cilíndricos (nemátodos), anillados o segmentados (céstodos) y acantocéfalos, los cuales poseen ganchos en la parte anterior.
- 3.1.2 Para observar los trofozoítos, quistes u ooquistes de los protozoarios, así como las larvas y huevos de helmintos, se debe usar un microscopio; en cambio, la mayor parte de los gusanos o helmintos adultos son macroscópicos y su morfología puede estudiarse directamente con ayuda de un estereoscopio o una lupa.
- 3.1.3 Los protozoarios y helmintos intestinales son eliminados con las heces en sus formas evolutivas (trofozoíto, quiste, ooquiste, espora, huevos, larvas y adultos) según la especie involucrada.
- 3.1.4 Los helmintos intestinales adultos (proglótidos de *Taenia* sp., *Enterobius vermicularis* y *Ascaris lumbricoides*) pueden salir al exterior espontáneamente o después del tratamiento.

Los métodos de diagnóstico de los parásitos intestinales pueden ser: directo, concentración, coloración de los elementos parasitarios que se eliminan con las heces.

- 3.1.6 En las heces podemos encontrar formas adultas y microscópicas (huevos, larvas, trofozoítos, quistes, ooquistes, esporas) y adultos de los parásitos intestinales; por ello, es importante obtener una buena muestra fecal, así como la colección y conservación óptima del espécimen o gusano.
- 3.1.7 La muestra debe ser obtenida (entre 3 y 8 g) lo más fresca posible (máximo 240 min, si se busca *Entamoeba histolytica*), y depositada en un frasco de boca ancha con tapa rosca y rotulada correctamente con los datos de identificación.
- 3.1.8 La muestra debe obtenerse antes del uso de medicamentos antiparasitarios, o hasta 2 a 5 días después de su administración.
- 3.1.9 Las heces depositadas en el suelo no son las recomendadas para el diagnóstico debido a que pueden contaminarse con formas biológicas, como por ejemplo: larvas similares a los enteroparásitos del hombre, larvas de nemátodos, huevos de ácaros o de insectos, etc.
- 3.1.10 Si el paciente no es regular en la evacuación de sus deposiciones y ha evacuado en la noche anterior al examen, se recomienda guardar la muestra en una refrigeradora o en un lugar fresco no expuesto a la luz solar, para que no se alteren las formas parasitarias. Cuando la muestra va a demorar en llegar al laboratorio varias horas o días, se recomienda adicionarle líquido fijador o conservador (PAF, PVA, formalina 10%, SAF, acetato de sodio, etc.).
- 3.1.12 En algunas parasitosis intestinales, es necesario realizar los exámenes en muestras de bilis, esputo, secreción / fluido, contenido duodenal, biopsia, tejido de necropsia o frotis perianal; así como realizar la diferenciación de espécimen adulto o fragmento de este.

3.2 Muestra para examen parasitológico

Comprende las siguientes muestras: heces, bilis o fluido duodenal, esputo, secreción, biopsia o preparaciones histológicas, espécimen o gusano. Las muestras de heces son las más frecuentes.

3.2.1 Heces

3.2.1.1 Características de la muestra

- a. Recipiente o contenedor: boca ancha con tapa rosca.
- b. Cantidad: 3 - 8 g
- c. Condiciones óptimas: no estar mezclado con orina, que no exista el antecedente de haber ingerido bario u otros productos de contraste. Se debe llevar la muestra al laboratorio en corto tiempo (de 2 - 4 h después de su obtención).

3.2.1.2 Datos de la muestra

Se debe consignar la siguiente información: nombre, edad, sexo, ocupación, síntomas y signos, fecha de inicio de síntomas, diagnóstico presuntivo, ingesta de ensaladas, viajes, los últimos 3 meses.

El recipiente o contenedor que contiene la muestra debe estar bien cerrado y colocado dentro de una bolsa de plástico y donde no le llegue la luz directa. En caso que demore en llegar al laboratorio ver sección 4.

3.2.1.3 Procesamiento de la muestra

- a. Debe realizarse lo antes posible y en un lugar apropiado (cerca al caño de agua). Las muestras diarreicas y las que contienen sangre, deben examinarse en forma macroscópica y microscópica apenas lleguen al laboratorio.
- b. Se aplicará la metodología correspondiente (Anexo B).
- c. Los reactivos y colorantes empleados en el procesamiento deben estar en envases adecuados, mantenerse fuera de los rayos del sol o luz, etiquetados (con nombre y fecha de preparación), sometidos a un control periódico y con una preparación proporcional a la demanda (Anexo C).

3.2.1.4 Reporte de resultados

Se debe escribir el nombre completo de los parásitos, género y especie indicando el estadio evolutivo y su densidad en la muestra (Sección 10).

SECCIÓN 4

OBTENCION, ENVÍO, TRANSPORTE, FIJACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

4.1 Objetivo

Describir el procedimiento, condiciones de obtención, envío, transporte, fijación y conservación de las muestras para el laboratorio.

4.2 Condiciones específicas

Las muestras deben estar en frascos o contenedores rotulados con soluciones conservadoras (Tabla 1); deben mantenerse en un ambiente fresco y lejos de la luz solar, evitar las temperaturas extremas o el desecamiento; asimismo, se debe considerar cantidades óptimas y.

Tabla 1. Condiciones de conservación, envío y transporte de muestras para el diagnóstico parasitológico

TIPO DE MUESTRA	TIEMPO QUE DEMORA EN LLEGAR AL LABORATORIO		AGENTES PARASITARIOS
	< 24 h	≥ 24 h	
Espujo, secreción biliar	T° ambiente	PAF, SAF, formalina 10%	<i>Paragonimus, Fasciola, Giardia.</i>
Contenido duodenal	T° ambiente	PAF, formalina 10%	<i>Giardia, Strongyloides, Fasciola, Paragonimus, Ancylostoma duodenale, Necator americanus, Microsporidia</i> y otros.
Frotis perianal	T° ambiente	T° ambiente	<i>Enterobius, Ascaris, Trichuris, Taenia</i> y otros.
Secreción vaginal	T° ambiente	Frotis en lámina	<i>E. vermicularis, T. vaginalis.</i>
Tejidos	4 °C	Formol 10%	<i>E. histolytica</i> , otros (según el tejido)
Helmintos	T° ambiente	Nemátodos en alcohol 70%, céstodos y tremátodos en formol 10%	<i>Ascaris, Trichuris, Diphylobothrium, Taenia, Paragonimus</i> y <i>Fasciola</i> , etc.
Suero	4 °C	Hielo seco o congelador	<i>E. histolytica, Giardia, Paragonimus, Fasciola</i> y otros
Heces	T° ambiente	PAF, PVA, Cary blair, Bicromato de potasio al 2,5%, MIF	<i>E. histolytica, Giardia, Cryptosporidium, Enterocytozoon, Encephalitozoon</i> y otros.

Figura 1. Requisitos para la remisión de la muestra de heces

Para la conservación emplee formalina al 10%,
Cierre el frasco herméticamente.
Coloque los datos del paciente.
Señale a qué temperatura se debe mantener la muestra
Coloque la fecha
Escriba: **FRÁGIL, MATERIAL BIOLÓGICO**



4.3 Procedimiento

- 4.3.1 Coloque la muestra elegida en un envase apropiado, rotulado correctamente y luego, este en un recipiente secundario (podría ser de plástico u otro material resistente a roturas) (Figura 1).
- 4.3.2 Enviar la muestra al laboratorio lo antes posible; en caso fuera fresca, dentro de las 2 a 4 h de obtenida.
- 4.3.3 Si el envío de la muestra va a demorar más de un día en llegar al laboratorio, debe guardarla en un fijador conservador, aplicando las medidas de bioseguridad correspondientes (Tabla 1).
- 4.3.4 Si la muestra se envía a otro laboratorio, el responsable del envío debe elegir la forma apropiada para la óptima conservación de esta.
- 4.3.5 Cuando la muestra no reúne las condiciones o cantidades óptimas para los análisis, así como los datos, se recomienda establecer contacto con la persona responsable para efectuar las correcciones respectivas.

4.4 Rechazo de una muestra

- 4.4.1 Es importante controlar cada hoja de pedido y verificar si tiene toda la información (etiquetado). De no cumplirse, se debe establecer contacto con la persona responsable para efectuar las correcciones necesarias.
- 4.4.2 Los criterios para rechazar una muestra son los siguientes:
 - 4.4.2.1 No indicar el tipo de muestra o procedencia.
 - 4.4.2.2 No indicar el examen requerido.
 - 4.4.2.3 Demora en el envío al laboratorio.
 - 4.4.2.4 Muestra sin rotular o mal rotulada.
 - 4.4.2.5 Muestra que presente evidencia de haber sido derramada.
 - 4.4.2.6 Recipiente o contenedor inapropiado.
 - 4.4.2.7 Muestra contaminada.
 - 4.4.2.8 Muestra escasa o seca en el contenedor.
 - 4.4.2.9 Presencia de una sola muestra, a pesar de la presencia de varias órdenes.
 - 4.4.2.10 Volumen o cantidad inadecuada.
- 4.4.3 En caso de rechazar una muestra, el personal de laboratorio debe explicar al solicitante las observaciones y motivos en la ficha de solicitud de diagnóstico. Si no fuera posible la obtención de otra muestra, revise nuevamente los exámenes realizados.
- 4.4.4 Tenga en cuenta el examen parasitológico por macroscopía.

SECCIÓN 5

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO - HECES

5.1 Examen directo macroscópico

5.1.1 Fundamento

Permite observar directamente las características morfológicas de los parásitos adultos, enteros o fraccionados, así como los cambios en las características organolépticas de las heces eliminadas, (color, presencia de sangre o moco, consistencia, etc.).

5.1.2 Materiales

5.1.2.1 Suero fisiológico (Anexo C).

5.1.2.2 Aplicador (bajalengua).

5.1.2.3 Pinza de metal.

5.1.2.4 Coladera de plástico o malla metálica.

5.1.3 Procedimiento

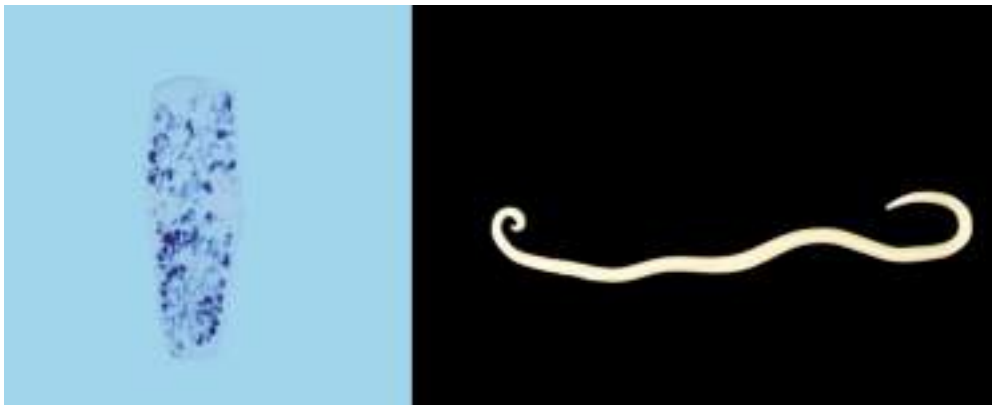
5.1.3.1 Agregue suero fisiológico en cantidad suficiente para homogeneizar la muestra.

5.1.3.2 En caso de presencia de parásitos adultos extraerlos y tamizar o colar la muestra.

5.1.4 Observación

Observe las características organolépticas de las heces, útiles para la ayuda diagnóstica (consistencia, color, presencia de moco, sangre, alimento sin digerir), así como la presencia de gusanos cilíndricos, anillados o aplanados (enteros o parte de ellos) (Figura 2).

Figura 2. *Ascaris lumbricoides* macho adulto (der.) y proglótido grávido de *Taenia solium* (4X) (izq.), coloración: Tionina



5.1.5 Resultado

En caso que la muestra contenga información útil para el diagnóstico (ejemplo: presencia de glóbulos rojos, fibras musculares no digeridas, mucus, etc.), se debe adicionar al informe del examen parasitológico las características macroscópicas de las heces.

5.2 Examen directo microscópico

5.2.1. Fundamento

Observe, principalmente en muestras frescas, la presencia de formas evolutivas móviles o quistes, ooquistes, larvas o huevos de parásitos de tamaño microscópico (trofozoítos, quistes de protozoos: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Balantidium coli*, *Isospora*, *Cryptosporidium*, etc.; así como larvas o huevos de helmintos: *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma* o *Necator*, *Trichostrongylus sp.*, *Paragonimus*, *Fasciola hepatica*, etc.).

5.2.2 Materiales (Figura 3)

- 5.2.2.1 Láminas portaobjetos.
- 5.2.2.2 Laminillas cubreobjetos.
- 5.2.2.3 Aplicador de vidrio o madera.
- 5.2.2.4 Microscopio óptico.
- 5.2.2.5 Marcador de vidrio.
- 5.2.2.6 Suero fisiológico (Anexo C).
- 5.2.2.7 Solución de lugol (Anexo C).
- 5.2.2.8 Verde brillante (Anexo C).
- 5.2.2.9 Rojo neutro (Anexo C).

Figura 3. Materiales para la aplicación del método directo: láminas, laminillas, aplicador, solución salina y lugol



5.2.3 Procedimiento

- 5.2.3.1 Coloque en un extremo de la lámina portaobjeto una gota de suero fisiológico y, con ayuda de un aplicador, agregar 1 a 2 mg de materia fecal; emulsionarla y cubrirla con una laminilla cubreobjetos.
- 5.2.3.2 Coloque en el otro extremo de la lámina portaobjeto, una gota de lugol y proceda a la aplicación de la muestra fecal como en el párrafo anterior.
- 5.2.3.3 Con el suero fisiológico los trofozoítos y quistes de los protozoarios se observan en forma natural; con lugol se observan las estructuras internas, núcleos y vacuolas.
- 5.2.3.4 En algunos casos se recomienda el uso de colorantes vitales, debido a que no alteran la actividad del trofozoíto. Los más usados son verde brillante 0,2% y rojo neutro 0,01%, así como fucsina 0,01%.

5.2.4 Observación (Figura 4)

- 5.2.4.1 Observe con el microscopio a 10X o 40X. No es aconsejable usar objetivo de inmersión (100X), puesto que se puede contaminar el microscopio.
- 5.2.4.2 Recorra la lámina siguiendo un sentido direccional, por ejemplo, de derecha a izquierda, o de arriba hacia abajo.

5.2.5 Resultado

En un formato y en el cuaderno de registro correspondiente, se anotará el nombre de la especie del parásito y su estadio evolutivo, indicando la densidad (número de formas parasitarias por campo microscópico) expresado en cruces (Sección 10).

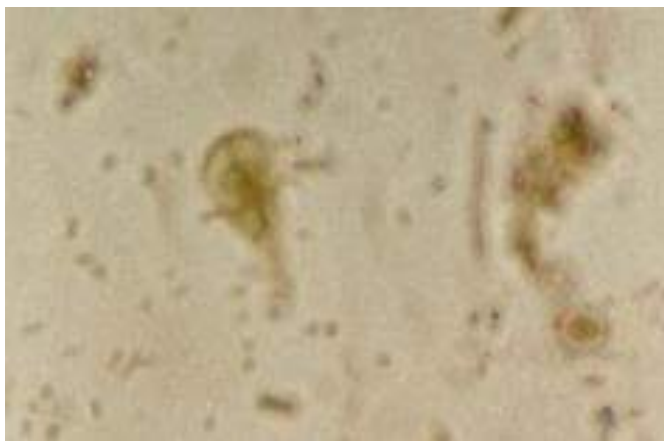


Figura 4. Trofozoíto de *Giardia lamblia* con solución lugol (200X)

5.3 Métodos de concentración

Los trofozoítos, quistes, ooquistes, larvas y huevos, pueden concentrarse por diversos procedimientos, ello permite corroborar lo hallado en el método directo y conocer la intensidad del enteroparasitismo. Estos procedimientos de concentración pueden ser: flotación, sedimentación, o por combinación de ambos métodos. La elección de cada procedimiento dependerá de las facilidades del laboratorio, el adiestramiento del personal, la procedencia de la muestra (zona geográfica), el conocimiento de la prevalencia de los parásitos (zona costera, andina y selvática o

área rural o urbana), y la especie del parásito que se desea investigar.

5.3.1 Métodos de concentración por sedimentación

5.3.1.1 Técnica de la sedimentación espontánea en tubo TSET (técnica de concentración por sedimentación, sin centrifugación)

a. **Fundamento**

Se basa en la gravedad que presentan todas las formas parasitarias para sedimentar espontáneamente en un medio menos denso y adecuado como la solución fisiológica. En este método es posible la detección de quistes, ooquistes, trofozoítos de protozoarios, huevos y larvas de helmintos.

b. **Materiales**

- Tubos de vidrio o plástico de 13 x 100, 16 x 150, o tubos de 50 mL de capacidad que terminen en forma cónica.
- Láminas portaobjetos.
- Laminillas de celofán recortadas adecuadamente (22 x 22 mm o 22 x 30 mm).
- Solución fisiológica (Anexo C).
- Pipetas de vidrio o plástico.
- Agua destilada, hervida o de lluvia.
- Gasa recortada en piezas de 9 x 9 cm.

c. **Procedimiento**

- Colocar una porción de heces (1 - 2 g) en un tubo limpio y homogenizar con suero fisiológico o en el mismo recipiente en que se encuentra la muestra.
- Coloque una gasa, hundiéndola en la abertura del tubo y sujetándola con una liga alrededor de ella.
- Filtre el homogenizado a través de la gasa, llenando el tubo hasta la cuarta parte de su contenido.
- Agregue suero fisiológico hasta 1 cm por debajo del borde del tubo.
- Ocluya la abertura del tubo con una tapa, *parafilm* o celofán.
- Agite enérgicamente el tubo por 15 segundos, aproximadamente.
- Deje en reposo de 30 a 45 min. En caso que el sobrenadante esté muy turbio, eliminarlo y repetir la misma operación con solución fisiológica o agua filtrada.
- aspire la parte media del sedimento en el tubo con una pipeta y colocar 1 o 2 gotas en una lámina portaobjeto.
- Agregue 1 o 2 gotas de solución lugol a una de las preparaciones.

- Cubra ambas preparaciones con las laminillas de celofán y observe al microscopio

d. Observación

Examine primero la preparación con solución fisiológica para observar formas móviles y de menor peso específico (trofozoítos, quistes) y luego la preparación con lugol para observar sus estructuras internas, de estos y de otros parásitos de mayor peso específico (huevos, larvas).

e. Resultado

Informe la presencia de las formas evolutivas de los parásitos (Sección 10).

5.3.1.2 Método de sedimentación rápida (TSR, MSR) (concentración por sedimentación) (Lumbreras et al. 1962)



Figura 5. Materiales para la aplicación de la técnica / método de sedimentación rápida: (TSR) vasos, gasa, pipeta de transferencia, desinfectante, etc.

a. Fundamento

Se basa en la gravedad de los huevos que, por su tamaño y peso, sedimentan rápidamente cuando se suspenden en agua.

b. Materiales

- Copa o vaso de vidrio o plástico, cónico de 150 a 200 mL.
- Coladera de malla metálica o de plástico.
- Placas Petri o lunas de reloj.
- Aplicador de madera (1/3 de bajalengua).
- Pipetas de transferencia.
- Gasa.
- Agua corriente filtrada.

- Microscopio.

c. Procedimiento

- Homogenice 3 a 8 g de heces con unos 10 a 20 mL de agua filtrada.
- Coloque la coladera y dos capas de gasa en la abertura del vaso y, a través de ella, filtre la muestra.
- Retire la coladera y llene la copa con agua filtrada hasta 1 cm debajo del borde, esto es 15 a 20 veces el volumen de la muestra.
- Deje sedimentar la muestra durante 30 minutos.
- Decante las 2/3 partes del contenido del vaso y nuevamente agregue agua.
- Repita los pasos anteriores cada 5 a 10 min por 3 a 4 veces, hasta que el sobrenadante quede limpio.
- Transfiera el sedimento a una placa Petri o luna de reloj, por incorporación o con ayuda de una pipeta Pasteur.
- Observe al estereoscopio o microscopio, a menor aumento.

d. Observación

Observe la presencia de huevos. Este método es especialmente útil para la detección de tremátodos como: *Fasciola hepatica*, *Paragonimus sp.* y nemátodos como *Ascaris lumbricoides* (huevo fecundado o no fecundado), *Trichuris trichiura*, *Hymenolepis nana*, *Diphyllobothrium pacificum*, etc. (Anexo A).

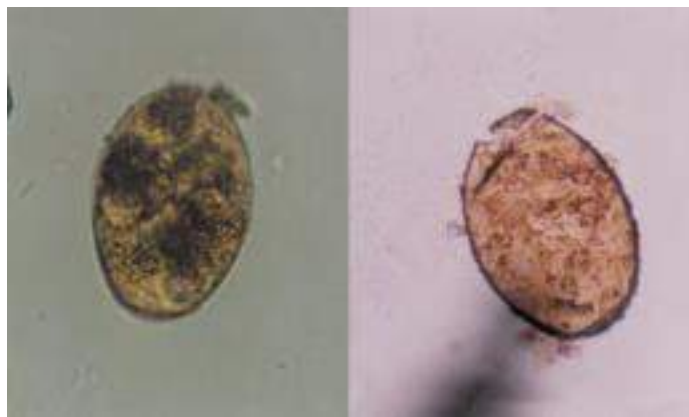


Figura 6. Huevos operculados de *Paragonimus peruvianus* (izq.) y *Fasciola hepatica* (der.) en muestra fresca

e. Resultado

Informe de la presencia de huevos o larvas de parásitos (Sección 10).

5.3.1.3. Técnica de Faust: Método de sedimentación y flotación por centrifugación con sulfato de zinc al 33% y densidad 1180.

a. Fundamento

Se basa en que los quistes y/o huevos de los parásitos flotan en la superficie por ser de menor densidad que el sulfato de zinc al 33,3%, cuya densidad es 1180. Es útil para la búsqueda de quistes y/o huevos de parásitos y, excepcionalmente, se observan larvas. Se recomienda controlar la densidad del sulfato de zinc y usar agua filtrada para el lavado previo de la muestra.

b. Materiales

- Gradilla para tubos de ensayo.
- Tubos de prueba 15 x 150.
- Tubos de prueba 13 x 100.
- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Embudo pequeño de vidrio.
- Bajalengua o bagueta.
- Gasa.
- Sulfato de zinc 33,3%, densidad 1180 (Anexo C).
- Solución de lugol (Anexo C).

c. Procedimiento.

- Coloque 1 a 2 g de la muestra de heces en el tubo de prueba 13 x 100 o 15 x 150 mm y agregue de 7 a 10 mL de agua filtrada o destilada. Realice una buena homogenización con ayuda del bajalengua.
- Coloque en el tubo la muestra homogenizada hasta alcanzar 1 cm por debajo del borde del tubo
- Centrifugue entre 2000 a 2500 r.p.m. durante 2 a 3 minutos.
- Decante el sobrenadante, adicione agua al sedimento, homogenice y repita la centrifugación 1 o 2 veces, hasta que el sobrenadante se observe limpio.
- Elimine el sobrenadante y agregue la solución de sulfato de zinc (3-4 mL), homogenice y complete con la misma solución hasta 1 cm del borde del tubo.
- Centrifugue de 1 a 2 minutos entre 2000 a 2500 r.p.m.
- Coloque el tubo en la gradilla y agregue, con ayuda de un gotero, la solución de sulfato de zinc hasta formar un menisco en la boca del tubo.
- Coloque una laminilla cubreobjeto sobre el menisco y deje en reposo durante 5 a 6 min.
- Deposite una gota de solución lugol en la lámina portaobjeto.
- Retire la laminilla cubreobjeto, colócala sobre la lámina con lugol, o con asa de Kolle colocar 3 o 4 asadas en la lámina y cubrir con una laminilla cubreobjeto luego observar al microscopio.

d. Observación

Se observan principalmente quistes y huevos de parásitos.

e. Resultado

Informe el nombre y estadio evolutivo encontrado, así como la cantidad de elementos observados por campo (Sección 10).

5.3.2 Métodos de concentración por flotación

5.3.2.1 Sheather Sugar: método de concentración por flotación con centrifugación en una solución de azúcar

a. Fundamento

Se basa en la flotación de quistes, ooquistes y huevos de parásitos en una solución de azúcar que posee mayor densidad que ellos. Esta técnica es útil para la concentración de quistes y ooquistes de protozoos y huevos de helmintos y se usa como método preferencial en el diagnóstico de los coccidios: *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora*, etc.

b. Materiales

- Tubos de ensayo 13 x 100.
- Láminas portaobjetos.
- Laminilla cubreobjetos.
- Aplicador.
- Solución de azúcar (Anexo C).
- Asa de platino.
- Gradilla para tubos de ensayo.
- Suero fisiológico (Anexo C).
- Embudo de vidrio.
- Gasa.

c. Procedimiento

- Homogenice 1 a 2 g de materia fecal en suero fisiológico en un tubo 13 x 100mm.
- Centrifugue el tubo con el material homogeneizado a 2500 r.p.m. durante 2 a 5 min.
- Elimine el sobrenadante, y agregue la solución de azúcar hasta 1 cm del borde del tubo; agite hasta disolver el sedimento, centrifugue como en el paso anterior, complete con la solución de azúcar hasta el borde y espere de 2 a 5 minutos la formación de un menisco.
- Con la ayuda del asa de platino, tome una muestra de la superficie del menisco y colóquela en una lámina portaobjeto; agregue lugol, cubra con una laminilla y observe al microscopio. En caso de observar coccidios, de la superficie del preparado tomar, con la asa de platino o con una pinza curva, una muestra para preparar un frotis para teñir por el método de Ziehl-Neelsen modificado.

d. Observación

Esta técnica es apropiada para la observación y registro de ooquistes de *Isospora*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora* y *Sarcocystis*.

e. Resultado

Informe la presencia de las formas evolutivas de los parásitos encontrados y su cantidad, expresado en cruces (Sección 10).

5.3.2.2. Método de Parodi Alcaraz (métodos de concentración por flotación sin centrifugación, en solución sobresaturada de azúcar):

a. Fundamento

Se basa en la propiedad que tienen los quistes y/o huevos de flotar en la superficie de una solución saturada de azúcar, debido a su menor densidad. El método es útil para la detección de quistes de protozoarios y huevos de helmintos.

b. Materiales

- Tubos de 13 x 100 o 15 x 150.
- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Solución saturada de azúcar (azúcar rubia) (Anexo C).
- Formol.
- Aplicador de madera (1/3 de baja lengua).
- Solución de lugol (Anexo C).

c. Procedimiento.

- Coloque 1 a 2 g de heces en el tubo de ensayo.
- Agregue 3 a 5 mL de la solución sobresaturada de azúcar y homogenice con un aplicador.
- Complete el contenido del tubo con la misma solución de azúcar hasta formar un menisco.
- Deje en reposo por 30 minutos.
- Coloque en contacto con el menisco, una laminilla cubreobjeto que permitirá la adherencia por viscosidad de los quistes y huevos.
- Coloque en la lámina portaobjeto una gota de solución de lugol.
- Retire la laminilla con sumo cuidado, colocarla sobre la lámina portaobjeto y examine al microscopio.

d. Observación

Es conveniente la observación inmediata a 10X y 40X, pues los quistes y/o huevos suelen deformarse si la

densidad de la solución es demasiado alta.

e. Resultado

Informe los nombres y estadios evolutivos de los parásitos encontrados (Sección 10).

5.3.3 Método de Ritchie o de sedimentación por centrifugación y flotación (mixto, con fijador)

5.3.3.1 Fundamento

Se basa en la concentración de los quistes y huevos por sedimentación mediante la centrifugación, con la ayuda de formol y éter para separar y visualizar los elementos parasitarios.

5.3.3.2 Materiales.

- Gradilla de tubos de ensayo.
- Tubos de ensayo 13 x 100.
- Pipetas Pasteur o de transferencia.
- Lámina portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Hisopos
- Solución de formol 10%
- Solución fisiológica (Anexo C).
- Éter etílico.
- Lugol.
- Bajalengua o bagueta.
- Microscopio binocular.

5.3.3.3 Procedimiento (Figura 7)

- Coloque en el tubo de ensayo 1 a 2 g de muestra de heces, agregue 8 mL de solución salina, homogenice y centrifugue a 2000 rpm por 2 a 3 minutos.
- Decante el sobrenadante y repita 1-2 veces el paso anterior hasta que se observe el sobrenadante limpio.
- Decante el sobrenadante, agregue al sedimento 6 mL de solución de formol al 10%, homogenice y deje reposar 5 min, luego agregue 3 mL de éter.
- Coloque el *parafilm* sobre el tubo y agite cuidadosamente para evitar la salida del material.
- Elimine las capas formadas de sobrenadante, de ser necesario, con ayuda de un hisopo.
- Retire la tapa, centrifugue el tubo de 2000 a 3000 r.p.m por 3 min.

- Deposite una gota de lugol en la lámina portaobjeto y con ayuda de una pipeta Pasteur, tome una porción del sedimento para mezclarlo con la solución de lugol.
- Cubra con una laminilla cubreobjeto y observe al microscopio.

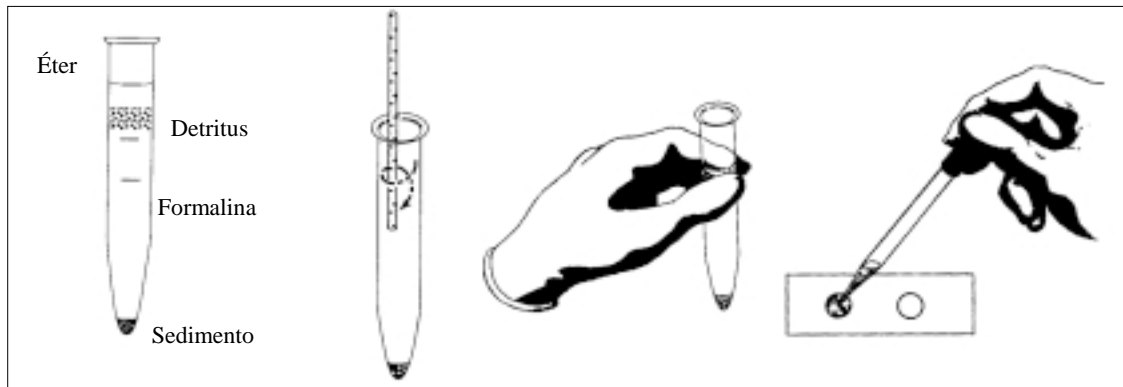


Figura 7. Aplicación del método de Ritchie (sedimentación y flotación)

5.3.3.4 Observación

Se pueden observar quistes, ooquistes y huevos de los parásitos. Es poco útil para observar trofozoítos y larvas.

5.3.3.5 Resultado

Informe el nombre, estadio evolutivo del parásito y la presencia de cristales de Charcot-Leyden (Sección 10).

5.3.4 Método de Baermann (método de concentración por migración)

5.3.4.1 Fundamento

Se basa en los tropismos positivos: geotropismo, termotropismo e hidrotropismo de los trofozoítos de protozoos y larvas de helmintos. Es útil principalmente para *Balantidium coli* y larvas de *Strongyloides stercoralis*.

5.3.4.2 Materiales

- Copas cónicas de 200 a 300 mL.
- Coladera metálica o rejilla.
- Pipetas de transferencia.
- Gasa.
- Láminas cavadas.
- Suero fisiológico (Anexo C).



Figura 8. Materiales del método de Baermann: copa de vidrio, pipetas de transferencia, coladera, láminas y laminillas

Para una mejor diferenciación de las larvas de los parásitos, realizar el método de Harada-Mori

5.3.4.3 Procedimiento

- Coloque la coladera o rejilla metálica con la gasa doblada (2 a 3 capas) dentro de la copa (Figura 8).
- Coloque sobre la gasa de 3 a 8 g de la muestra de heces en fresco.
- Vierta solución salina a 37 °C o a temperatura ambiente, en cantidad suficiente, por el borde de la copa.
- Deje a temperatura ambiente o en estufa entre 28 – 37 °C por 30 a 50 min.
- Retire la coladera o rejilla y, con ayuda de una pipeta de transferencia, obtenga 1 mL de sedimento.
- Coloque el sedimento en una luna de reloj o una lámina cavada y observe al microscopio o esteroscopio.

5.3.4.4 Observación

Observa trofozoítos y larvas en movimiento. En algunas ocasiones se pueden observar formas adultas de *E. vermicularis* macho.



Figura 9. *Strongyloides stercoralis* L-1. Larva rabbitiforme de (izq) (200x) y huevos (der) (200x)

5.3.4.5 Resultado

Informe los nombres y estadios evolutivos de los parásitos encontrados (Sección 10).

5.3.5 Método cualitativo: técnica de Kato o método de concentración por tamizado

5.3.5.1 Fundamento

Método que consiste en la diafanización o aclaración de las heces con el uso de glicerina, que permite preparar una capa transparente y observar las formas parasitarias.

5.3.5.2 Materiales

- Láminas portaobjeto.
- Aplicador.
- Papel celofán (humectante especial), de 2 x 3 cm y sumergido en una solución de glicerina por un período no menor de 24 h.
- Nylon u organza blanca.
- Solución glicerizada con verde de malaquita (Anexo C).

5.3.5.3 Procedimiento

- Tamice 0,5 g de la muestra de heces a través de organza o nylon fino.
- Extienda el tamizado sobre la lámina portaobjeto y cubra con una laminilla impregnada en glicerina.
- Comprima la muestra con el tapón de jebes sobre la laminilla, quite el exceso de glicerina, deje en una bandeja a temperatura ambiente por 30 a 45 minutos luego observe al microscopio.

5.3.5.4 Observación

Es una técnica apropiada para la observación de huevos de helmintos como *Trichuris* y algunos protozoarios como *Isospora belli* (Figura 10).

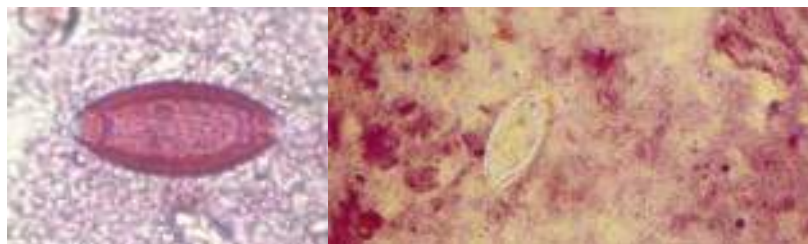


Figura 10. *Trichuris trichiura* e *Isospora belli* con colorante temporal eosina (400x)

5.3.5.5 Resultado

Informe los nombres y estadios evolutivos de los parásitos encontrados (Sección 10).

5.4 Método cuantitativo de Kato – Katz (análisis cuantitativo = hgh)

5.4.1 Fundamento

Se basa en la técnica de Kato Katz que permite cuantificar la presencia de huevos de helmintos. Se expresa en número de huevos por gramo de heces (hgh).

5.4.2 Materiales (Figura 11)

5.4.2.1 Láminas portaobjetos 2,5 x 7,5 cm.

5.4.2.2 Papel absorbente (toalla o periódico).

5.4.2.3 Aplicador.

5.4.2.4 Papel de celofán impregnado con glicerina y verde de malaquita (Anexo C).

5.4.2.5 Molde de plástico con perforación central de 6 mm de diámetro.

5.4.2.6 Nylon u organza de color blanco de 0,09 mm.



Figura 11. Materiales del método de Kato - Katz: lámina perforada, aplicador, nylon u organza y verde de malaquita

5.4.3 Procedimiento

5.4.3.1 Con un aplicador (bajalengua) transfiera la muestra fecal (0,5-1g) sobre el papel absorbente.

5.4.3.2 Coloque un nylon de 2 x 3 cm sobre la muestra.

- 5.4.3.3 Con el aplicador del kit comprima la malla para tamizar la muestra.
- 5.4.3.4 Coloque el molde de plástico sobre la lámina portaobjeto y rellene la perforación con la muestra tamizada.
- 5.4.3.5 Levante el molde dejando el “cilindro” de la muestra en la lámina portaobjeto.
- 5.4.3.6 Coloque la laminilla glicerizada con verde de malaquita sobre la muestra y, con ayuda de un tapón de jebes, presione sobre la laminilla, buscando extender la muestra.
- 5.4.3.7 Deje para la diafanización a temperatura ambiente durante 30 a 45 min.

5.4.4 Observación

- 5.4.4.1 Observe los huevos de helmintos, tal como se muestra en la Figura 12.

5.4.5 Resultado

- 5.4.5.1 El número de huevos encontrados en la lámina se multiplica por k ($k= 24$), el resultado es el número de huevos por gramo de heces (hgh) (Tabla 2).
- 5.4.5.2 Deben contarse todos los huevos del preparado.

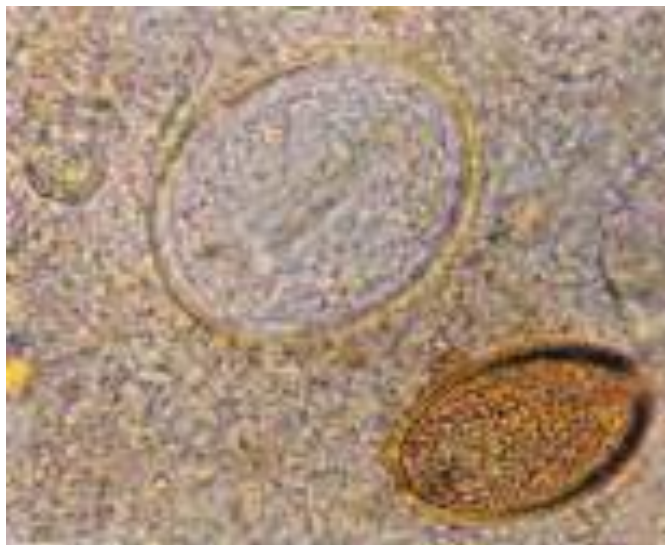


Figura 12. Huevos *Ancylostoma / Necator* y *Trichuris trichiura* por el método de Kato Katz (400X)

Tabla 2. Cálculo del número de huevos por gramo de heces (hgh). Método de Kato - Katz

Número de huevos observados en la lámina	Número de huevos por gramo de heces (hgh)	Número de huevos observados en la lámina	Número de huevos por gramo de heces (hgh)
1	24	38	912
2	48	39	936
3	72	40	960
4	96	41	984
5	120	42	1008
6	144	43	1032
7	168	44	1056
8	192	45	1080
9	216	46	1104
10	240	47	1128
11	264	48	1152
12	288	49	1176
13	312	50	1200
14	336	51	1224
15	360	52	1248
16	384	53	1272
17	408	54	1296
18	432	55	1320
19	456	56	1344
20	480	57	1368
21	504	58	1392
22	528	59	1416
23	552	60	1440
24	576	61	1464
25	600	62	1488
26	624	63	1512
27	648	64	1536
28	672	65	1560
29	696	66	1584
30	720	67	1608
31	744	68	1632
32	768	69	1656
33	792	70	1680
34	816	71	1704
35	840	72	1728
36	864	73	1752
37	888	74	1776

5.4.5.3 En caso de heces líquidas o pastosas, usar los factores de corrección que se incluyen en el kit k/2 para heces "blandas" y K/3 para heces diarreicas.

5.4.6 Intensidad de la infección (hgh)

5.4.6.1 El Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica la intensidad de la infección por helmintos según los rangos indicados en la Tabla 3.

Tabla 3. Intensidad de las infecciones

AGENTES	LEVE	MODERADA	SEVERA
<i>A. lumbricoides</i>	1 - 4999	5000 - 49 999	≥ 50 000
<i>T. trichiura</i>	1 - 999	1000 - 9999	≥ 10 000
<i>A. duodenale</i> <i>N. americanus</i>	1 - 1999	2000 - 3999	≥ 4000
<i>Fasciola hepatica</i> <i>Paragonimus peruvianus</i>	1 - 99	100 - 399	≥ 400

5.5 Métodos de coloración para protozoarios

5.5.1 Método de Ziehl-Neelsen (modificado para observación de coccidio: *Cryptosporidium* y otros)

5.5.1.1 Fundamento

Se basa en el comportamiento ácido-resistente de la cubierta de estos parásitos, cuyos ooquistes se tiñen de rojo y destacan sobre un fondo verde o azul, dependiendo del colorante de contraste usado.

5.5.1.2 Materiales

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Soporte de varillas de vidrio para coloración de láminas portaobjetos.
- Estiletes o pinzas punta curva.
- Fucsina fenicada (Anexo C).
- Verde de malaquita o azul de metileno acuoso (Anexo C).
- Metanol.
- Hidróxido de sodio al 4%.
- Alcohol ácido (Anexo C).

5.5.1.3 Procedimiento

- Coloque las láminas portaobjetos sobre el soporte o las varillas de vidrio.
- Con el estilete o pinza curva haga un frotis de heces en la lámina portaobjeto y deje secar.
- Fije la lámina con alcohol metílico de 2 a 5 minutos y deje secar.
- Agregue hidróxido de sodio sobre el preparado por un minuto, elimine el exceso y lave con agua.
- Cubra la lámina con la fucsina fenicada (previa agitación del frasco) por 5 minutos, diluida en agua al tercio (1 mL colorante y 2 mL de agua).
- Lave suavemente la lámina portaobjeto con agua corriente.
- Decolore con alcohol-ácido (alcohol de 96° de 1-3% con ácido clorhídrico), cubriendo el portaobjeto por unos segundos hasta quitar el colorante.
- Lave suavemente el portaobjeto con agua.
- Coloque como colorante de contraste verde de malaquita 1% o azul de metileno 1-1,4% durante 5 min, diluidos previamente al tercio.
- Lave la lámina suavemente con agua corriente y deje secar a temperatura ambiente.

- Realice el montaje con cytoseal, bálsamo de Canadá o Permount, use una laminilla cubreobjeto y observe en el microscopio.

5.5.1.4 Observación

Los ooquistes de *Cryptosporidium*, *Isospora* y *Cyclospora* aparecen de un color rojo fucsia sobre un fondo verdoso (con verde de malaquita) o azul (con azul de metileno). En algunos casos no se colorean bien, pero la refringencia característica permite diferenciarlos (Figura 13).

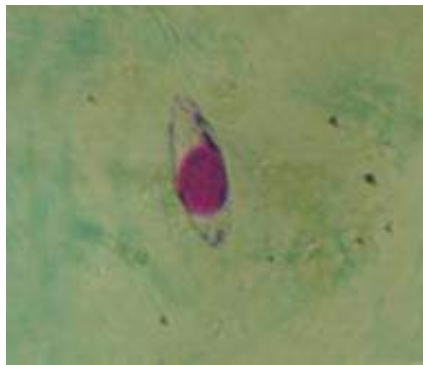


Figura 13. *Isospora belli* coloreado por Ziehl - Neelsen modificado (400X)

5.5.1.5 Resultado

Informar los nombres y estadios evolutivos de los parásitos encontrados (Sección 10).

5.5.2 Coloración Gram y coloración tricrómica (para microsporidiosis)

5.5.2.1 Fundamento

Se basa en la identificación de esporas de *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, etc. por la combinación de las coloraciones Gram y tricrómica.

5.5.2.2 Materiales

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

5.5.2.3 Procedimiento

- Prepare el set de placas Petri 10 x 150 mm.
- Realice un frotis fino en una lámina o laminilla y deje secar.
- Fije el frotis pasándolo tres veces por una llama, un segundo de tiempo por vez (opcional).
- Agregue el colorante cristal violeta y espere 1 min.
- Enjuague en agua corriente y elimine totalmente el agua.
- Adicione el yodo de Gram por 30 segundos, remueva el exceso con el decolorante y enjuague con agua.
- Agregue el colorante Chromotrope por 5 min de 50 °C a 55 °C.
- Pase por el decolorante (alcohol 90% y ácido acético 1%) de 1 a 3 segundos.
- Pase por alcohol 95% y por alcohol etílico absoluto por 1 min.
- Pase 1 min por xilol buscando que la coloración sea adecuada para visualizar el parásito.
- Realice el montaje y observe al microscopio.

5.2.4 Observación

Observe al microscopio a 10X y 40X. Para observar al microscopio a 100X, cubra con aceite de inmersión.

Se observan las esporas de los microsporidios, etc., que aparecen de un color rosado o rojo tenue o fucsia sobre el fondo verde o azul.

5.2.5 Resultado

Informe los parásitos encontrados (Sección 10).

5.5.3 Coloración Trichrome (Gomori Wheatley)

5.5.3.1 Fundamento

Permite colorear las estructuras internas de los protozoos para su caracterización. Esta técnica utiliza muestras de heces frescas, preservadas con PVA o fijadas con Schaudinn. Es un método rápido y de utilidad en el estudio de *Entamoeba*, *Giardia*, *Balantidium*, *Cyclospora* y otros protozoarios.

5.5.3.2 Materiales (Figura 14)

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Asa de platino.
- Estilete curvo o pinza curva.
- Agua destilada.
- Tintura de yodo (Anexo C).
- Cytoseal o bálsamo de Canadá.
- Alcoholes 85%, 90% y 95% y absoluto.
- Xilol.
- Colorante chromotrope (Anexo C).

- Ácido acético.
- Solución Schaudinn (Anexo C).
- Frascos coplin o placas Petri.



Figura 14. Materiales para la coloración tricrómica: colorante, pinza, porta laminillas (tapón de jebe), laminillas y placas Petri

5.5.3.3 Procedimiento

- Prepare un set de placas Petri 15 x 150 mm con los reactivos correspondientes, sujete la laminilla con el portalaminillas y con el estilete o pinza curva haga el frotis fino de la muestra sobre la laminilla.
- Fije la muestra con solución Schaudinn por 2 a 5 minutos.
- Pase por alcohol 70% con 2 o 3 gotas de tintura de yodo.
- Pase por un minuto por alcohol 70%.
- Pase por el colorante Chromotrope de 8 a 15 minutos.
- Pase por solución decolorante (alcohol 90% con ácido acético al 1%) de 10 a 15 segundos y vea al microscopio el tono de coloración.
- Pase por alcohol 95% y alcohol absoluto durante 3 min.
- Pase por xilol de 1 a 5 minutos. No debe verse opaco.
- Realice el montaje con cytoseal, bálsamo de Canadá o Permount.

5.5.3.4 Observación

Observe con objetivo de inmersión 100X. El citoplasma de los parásitos se tiñe de color verde y el núcleo de color rosado (Figura 15).

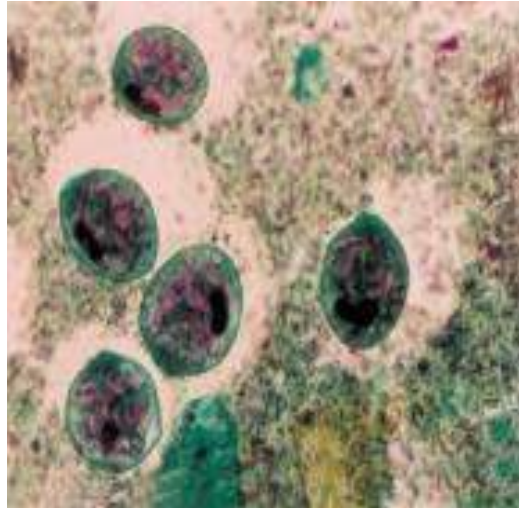


Figura 15. Trofozoitos de *Balantidium coli* con macronúcleo, coloración tricrómica (200X). Observar los macronúcleos característico

5.5.3.5 **Resultado**

Informe el nombre del parásito y su estadio evolutivo (Sección 10).

5.5.4 **Coloración de May Grünwald**

5.5.4.1 **Utilidad**

Colorea protozoarios, principalmente flagelados.

5.5.4.2 **Materiales**

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Estilete o pinza curva.
- Colorante May Grünwald (Anexo C).
- Alcohol metílico.
- Bálsamo de Canadá.

5.5.4.3 **Procedimiento**

- Con la ayuda de un estilete o una pinza curva, realice el frotis de la muestra fresca en la lámina o laminilla y deje secar.
- Fije el frotis con unas gotas de alcohol metílico, cubriendo la muestra por 5 minutos.
- Cubra el frotis con el colorante (diluido al $\frac{1}{2}$ o $\frac{1}{3}$ con agua destilada) durante 15 minutos.
- Lave con agua corriente y deje secar.
- Realice el montaje con cytoseal o bálsamo de Canadá y observe al microscopio.

5.5.4.4 **Observación**

Observe la lámina con objetivo de inmersión. Los protozoos se observan con su citoplasma de color azul claro y los núcleos de color púrpura (Figura 16).

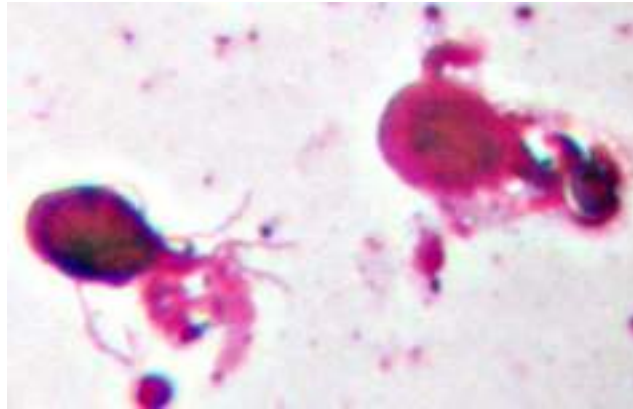


Figura 16. Trofozoíto de *Giardia lamblia* coloreado con May Grünwald (400X)

5.5.4.5 Resultado

Informe el nombre del parásito y el estadio evolutivo (Sección 10).

5.5.5 Coloración de hematoxilina férrica de Heidenhain

5.5.5.1 Utilidad

Colorea protozoarios, principalmente amebas y flagelados.

5.5.5.2 Materiales (Figura 17)

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Frasco coplin o placas Petri.
- Estilete o pinza curva.
- Colorante de hematoxilina (Anexo C).
- Cytoseal o bálsamo de Canadá.
- Alcohol etílico al 50%, 70%, 85%, 95% y absoluto en placas Petri.
- Solución Schaudinn (Anexo C).
- Solución mordiente de sulfato de hierro y amonio (Anexo C).
- Tintura de yodo (Anexo C).
- Solución fisiológica (Anexo C).
- Microscopio binocular.



Figura 17. Materiales para la coloración hematoxilina férrica de Heidenhain: colorante, bicloruro de mercurio, porta-laminillas (tapón de jebe), pinza punta curva y placas Petri

5.5.5.3 Procedimiento

- Prepare un set de placas Petri 100 x 150 mm o el frasco Coplin con los reactivos correspondientes, con ayuda de un estilete o pinza curva haga un frotis fino en la lámina o la laminilla, esta última sujeta al portalaminilla.
- Si la muestra es dura, haga una emulsión previa en solución fisiológica, realice el frotis y pase en solución Schaudinn por 3 a 5 minutos.
- Pase por alcohol 70% más 1 a 2 gotas de tintura de yodo por 5 min.
- Pase por alcohol 70% y 50% por 5 a 10 min cada vez.
- Pase por agua corriente por 5 a 10 min.
- Pase por la solución mordiente 2% de 5 a 10 min y enjuague con agua corriente.
- Pase por colorante por 5 a 10 min (1 mL de solución colorante hematoxilina y 9 mL de agua).
- Lave con agua y pase por una segunda solución de mordiente al 2% para decolorar, observando la intensidad de la coloración.
- Lave con agua corriente a un pequeño chorro continuo de 10 a 15 min.
- Deshidrate pasando por alcohol 70%, 85%, 95% y absoluto, de 10 a 15 min cada uno.
- Aclare con xilol agitando el frotis, monte con cytoseal o bálsamo de Canadá y observe al microscopio.

5.5.5.4 Observación

Observe con objetivo de inmersión 1000x. El citoplasma de los parásitos se observan de color azul oscuro y los núcleos de color morado intenso a negruzco (Figura 18).

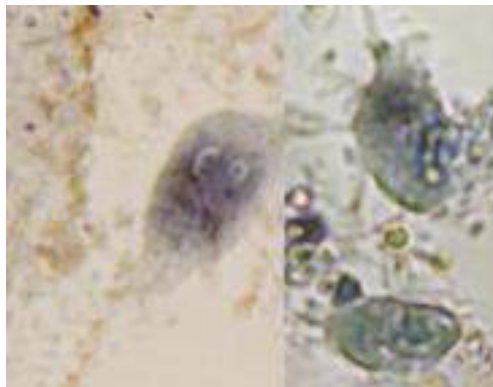


Figura 18. Trofozoítos de *Giardia lamblia* y *Chilomastix mesnili*, coloreados con hematoxilina férrica de Heidenhain (1000X)

5.5.5.5 Resultado

Informe el nombre del parásito y el estadio evolutivo (Sección 10).

5.6 Métodos de coloración para helmintos

5.6.1 Coloración Carmín clorhídrico

5.6.1.1 Utilidad

Coloración de estructuras internas de especímenes adultos o segmentos de este. Se usa de preferencia para el estudio de céstodos y tremátodos, ya que los nemátodos suelen deformarse con el montaje. La muestra debe ser lo más fresca posible.

5.6.1.2 Materiales (Figura 19).

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



Figura 19. Materiales para la coloración Carmin clorhídrico: colorante, especímenes aplanados, placas Petri y pinza

5.6.1.3 Procedimiento

- Los proglótidos de céstodes y los adultos de tremátodes deben lavarse y aplanarse, luego colocarlos entre dos láminas, sujetándolos con pabilo o usando pesas para sumergirlos 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 helminto o gusano.
- Coloque el gusano en alcohol 70% durante 10 a 20 min.
- Pase por el colorante carmín durante 5 a 10 min.
- Pase por alcohol ácido controlando la coloración observando con el estereoscopio.
- Deshidrate el helminto pasando por alcohol 85%, 95% y absoluto, durante 10 min en cada uno.
- Pase por la creosota o xilol, controlando al estereoscopio o microscopio la deshidratación apropiada.
- Seque el exceso de creosota con papel filtro y realice el montaje con bálsamo de Canadá.

5.6.1.4 Observación

La observación y estudio de la morfología del ejemplar se realiza macroscópicamente e incluso solo usando el estereoscopio (Figura 20).

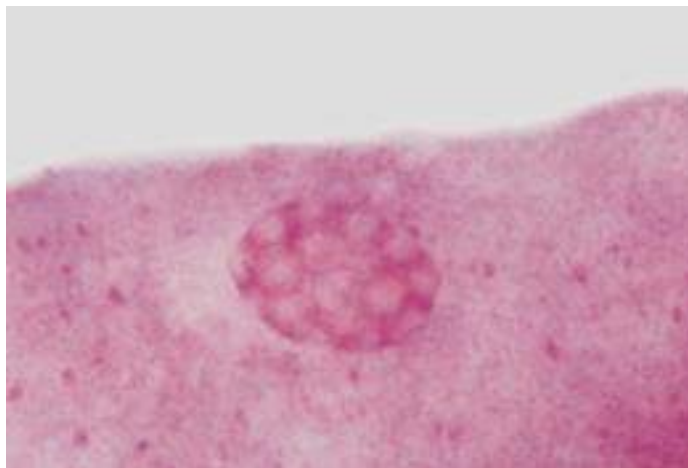


Figura 20. Huevos de *Dipylidium caninum* en cápsula ovígera coloreados con carmín clorhídrico (40X)

5.6.1.5 Resultados

Informe el nombre del parásito y su estadio evolutivo (Sección 10).

5.6.2 Coloración de Bonilla, Naar y Beloy

5.6.2.1 Utilidad

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

5.6.2.2 Materiales

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Alcohol 25%, 30%, 70%, 85% y 95%.
- Solución rojo de Congo (Anexo C).
- Solución de salicilato de metilo (Anexo C).
- Láminas excavadas.
- Bálsamo de Canadá o cytoseal.
- Pipeta.
- Placas Petri 60 x 90 mm.

5.6.2.3 Procedimiento

- Prepare un set de placas Petri 60 x 90 mm con los reactivos correspondientes y coloque las larvas en alcohol 25- 30% con unas gotas de solución de rojo de Congo por 20 a 30 min.
- Controle por la observación microscópica el color de las larvas.
- Deshidrate la muestra, pasándola por alcohol 70%, 85%, 95% y absoluto, por 20 a 30 min en cada uno.
- Coloque la muestra en solución de salicilato de metilo durante 3 min.
- Coloque los especímenes en cytoseal, bálsamo de Canadá o Permunt y observar al microscopio.

5.6.2.4 Observación

Los especímenes y sus estructuras internas se tiñen de color rojo.

5.6.2.5 Resultado

Informe el nombre del parásito y su estadio evolutivo (ver Sección 10).

5.6.3 Coloración hematoxilina férrica de Delafield

5.6.3.1 Utilidad

Se usa en casos de céstodes y tremátodos. Permiten colorear estructuras internas de especímenes adultas o fragmentadas del mismo.

5.6.3.2 Materiales

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Alcohol de 25%, 30%, 70%, 85% y 96%.
- Hematoxilina férrica.

- Bálsamo de Canadá o cytoseal.
- Pipeta.
- Placas Petri 150 x 100 mm.

5.6.3.3 Procedimiento

- Prepare un set de placas Petri 60 x 90 mm o 100 x 150 mm con los reactivos correspondientes, dependiendo de los especímenes a colorear.
- Los tremátodos y céstodos fijados con formol 10% se lavan en agua corriente.
- Diluya el colorante stock de 8 a 10 gotas en agua destilada y coloque los especímenes (35 mL por placa) por 12 h.
- Lave con agua corriente y pase por agua (segundos), dependiendo del espécimen.
- Pase por alcohol 50%, 30% y 10% por 10 min en cada uno, luego por agua corriente el tiempo necesario para sacar el exceso de colorante.
- Deshidrate en alcohol 10%, 30%, 50%, 70%, 85%, 95% y 100% cada uno por 10 min.
- Pase dos veces por xilol, monte con bálsamo de Canadá y observe al microscopio.

5.6.3.4 Observación

La observación de los especímenes se realiza en el microscopio o en el estereoscopio.

5.6.3.5 Resultado

Informe el nombre del parásito y su estadio evolutivo.

5.6.4. Aclarante para helmintos

5.6.4.1. Aclarante para nemátodos

Si los especímenes están en alcohol colocarlos en el aclarante por 10-15 min, en caso contrario requieren mayor tiempo (C4.12.3).

5.6.4.2 Otros aclarantes: xilol, tergitol, salicilato de metilo (C4.12.2.)

- Elija uno de los aclarantes (cuando aún están en alcohol absoluto) y coloque en partes iguales en alcohol absoluto por 5-15 min.
- Observe la diafanización
- Monte en bálsamo de Canadá o cytoseal.

5.7 Fijadores y/o conservadores

Los fijadores sirven para preservar protozoarios, sin que se modifiquen las estructuras internas, sobre todo cuando las muestras no pueden ser procesadas inmediatamente

PAF (phenol-alcohol-formol) = FAF (fenol – alcohol – formol)

5.7.1.1 Utilidad

Conserva las estructuras de los parásitos (trofozoítos, quistes, huevos y larvas), pudiendo incluso observarse en semanas o meses (6) sin que exista deterioro alguno. Es recomendable mantener el fijador preparado en frascos color caramelo. Además, permite observar el material al microscopio.

5.7.1.2 Materiales

- Fijador PAF o FAF (Anexo C).
- Tionina o azure A (O'methylene azure A) (Anexo C).
- Agua destilada.
- Hisopo.
- Tubos de centrifuga de 15 mL.
- Aplicadores.
- Tritón NE.
- Éter.
- Embudo de vidrio.
- Solución fisiológica (Anexo C).

5.7.1.3 Procedimiento

- La muestra de heces se mezcla con el fijador en un recipiente en la proporción 1:1 o v/v. para la observación microscópica:
- Mezcle bien la muestra fijada en PAF y con ayuda de un embudo y una gasa doblada en un tubo de 15 mL, cuele de 3 a 4 mL del material fijado.
- Agregue solución salina hasta un volumen de 12 mL y centrifugue a 1800 r.p.m. por 3 min.
- Decante el sobrenadante para obtener un sedimento de 0,5 mL; si es menor, agregue de la muestra filtrada una cantidad suficiente y vuelva a centrifugar para obtener el volumen del sedimento deseado.
- Decante el sobrenadante y complete 12 mL con solución fisiológica, emulsione con el aplicador y centrifugue a 1800 r.p.m. por 3 min.
- Repita el centrifugado y lave de 2 a 3 veces más.
- Agregue 2 mL de solución fisiológica al sedimento final, emulsione y obtenga una gota del sedimento con una pipeta Pasteur y luego colóquela en una lámina portaobjetos.
- Agregue una gota del colorante tionina o azure A, cubra con una laminilla cubreobjetos y examine al microscopio.

También puede obtenerse una muestra para la observación microscópica, mediante el siguiente procedimiento:

- Al sedimento emulsionado y sobrante del procedimiento anterior, agregue 10 mL de solución fisiológica y una gota de tritón NE.

- Agregue 2 mL de éter, tape con un tapón de jebe o de corcho, agite suavemente y destape.
- Centrifugue a 2000 r.p.m. por 3 min, decante y elimine los detritus de las paredes del tubo mediante un aplicador cubierto de algodón.
- Agregue al sedimento 1 o 2 gotas de solución fisiológica, mezcle y obtenga del fondo del tubo con una pipeta Pasteur una gota que se colocará en una lámina portaobjeto.
- Agregue una gota de colorante tionina o azure A, cubrir con una laminilla y observe al microscopio

5.7.1.4 Observación

Observe los elementos parasitarios: el citoplasma se ve de color azul y el núcleo azul oscuro.

5.7.1.5 Resultado

Informe el nombre del parásito y su estadio evolutivo (Sección 10).

5.7.2 PVA (Polivinil alcohol = alcohol polivinílico)

5.7.2.1 Utilidad

Fija y preserva, principalmente los trofozoítos y quistes de protozoarios, por tiempo muy prolongado sin modificación importante de su morfología.

5.7.2.2 Materiales

- Solución fijadora - conservadora de PVA (Anexo C).
- Aplicador.
- Viales de vidrio de 3 a 4 mL.
- Láminas portaobjetos.

5.7.2.3 Procedimiento

- Coloque en una lámina portaobjetos 1 o 2 mg de muestra, seque el frotis, agregue 2 o 3 gotas de PVA y seque o guarde hasta por 3 meses para colorearlos, o
- Agregue al frasco que contiene la muestra 1:3. Generalmente se puede preservar por meses y cuando se considere conveniente se realizará la coloración con Trichrome Gomori Wheatley.

5.7.3 MIF (merthiolate - yodo - formol)

5.7.3.1 Utilidad

Fija y colorea simultáneamente los quistes y huevos de parásitos, lo que permite la observación inmediata de la muestra.

5.7.3.2 Materiales

- Solución MIF (Anexo C).
- Viales de vidrio de 3 a 4 mL.

- Aplicador.

5.7.3.3 Procedimiento

- Coloque 1 o 2 mL de la solución MIF en el vial con ayuda de una pipeta.
- Para la observación microscópica, coloque 1 o 2 mL, o su equivalente de la muestra fresca de heces, mezclar y observar al microscopio.

5.7.3.4 Observación

Observe los parásitos teñidos de color amarillo oro.

5.7.3.5 Resultado

Informe el nombre del parásito y su estadio evolutivo (Sección 10).

5.7.4 Fijadores para preservar, conservar y enviar helmintos adultos

5.7.4.1 Utilidad

Conserva ejemplares adultos para su estudio morfológico, su preservación en museos o para contar con muestras de referencia. Los más usados suelen ser formol al 10%, AFA (ácido acético – formol - alcohol) o SAF (acetato sodio - ácido acético - formol).

5.7.4.2 Materiales necesarios

- Formol 10% (Anexo C).
- Solución AFA (Anexo C).
- Alcohol 70%.
- Glicerina 5%.
- Láminas portaobjetos.
- Pabilo o pesas de metal según modelo.
- Frascos boca ancha 150 – 200 mL.
- Placas Petri 150 x 100 mm y 240 x 200 mm.

5.7.4.3 Procedimiento

a. Colección y lavado de los helmintos

- Todo espécimen aislado del hospedero debe mantenerse fresco (agua o suero fisiológico) en un frasco con tapa.
- Los adultos colectados son lavados varias veces con solución fisiológica para eliminar la mucosidad y otras sustancias adheridas al cuerpo del helminto.
- Finalmente, se lava con agua para permitir el relajamiento del parásito

- Caliente a 55 °C, alcohol de 70%, formol 10% o AFA, para la fijación y que los ejemplares queden estirados y se pueda observar sus estructuras internas.

b. Fijación

- Para una conservación apropiada usar formol al 10%, para céstodes y tremátodes, o una mezcla de alcohol 70% para nemátodos, ambos con glicerina 5%.
- Todos los frascos deben ser rotulados en papel bond y escrito con lápiz, indicando el nombre o grupo del parásito, hospedador, localización, procedencia y fecha de colección.
- Para la identificación, en ocasiones, se requiere hacer el aclaramiento con lactofenol (Anexo C) o la mezcla de alcohol y fenol 1:1.

c. Aplanamiento

- Útil para céstodes y tremátodes.
- Se les coloca entre láminas portaobjetos y se las ajusta con el pabito para favorecer su aplanamiento.
- Se sumerge en formol 10% o AFA de 1 a 3 días, luego del cual se puede colorear o conservar como pieza de museo en formol 10% y glicerina 5%.
- Los tremátodes como *Fasciola* o *Paragonimus* pueden prepararse y conservarse siguiendo los pasos dados para los céstodes (Figura 21).

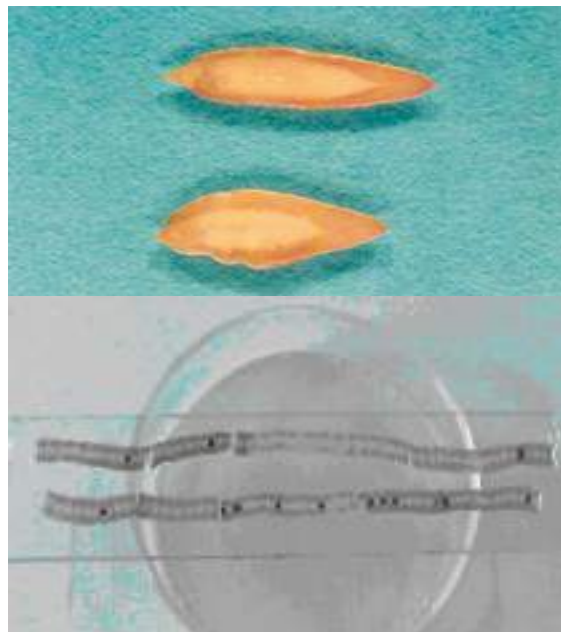


Figura 21. *Fasciola hepatica* adulto y *Diphylobothrium pacificum* después del aplanamiento

SECCIÓN 6

CULTIVOS PARASITOLÓGICOS

Algunos protozoos intestinales del hombre pueden ser cultivados en medios artificiales. Estos cultivos pueden servir como complemento de otros métodos diagnósticos, con fines de enseñanza, para proveer organismos en mayor cantidad para trabajos de investigación y para preparar los antígenos.

Los protozoos cuyo cultivos han demostrado ser útiles para su identificación son *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Balantidium coli*, en tanto, los helmintos que pueden desarrollar parte de su ciclo evolutivo en medios artificiales y sirven como ayuda diagnóstica son *Ancylostoma* o *Necator*, *Strongyloides stercoralis* y *Trichostrongylus sp.*

6.1 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*.

6.1.1 Medio Pavlova

6.1.1.1 Constituyentes

Fosfato ácido de sodio 12 H ₂ O	8,95 g
Fosfato de potasio	1,15 g
Cloruro de sodio	20,00 g
Extracto de levadura	4,00 g
Agua destilada	2750,00 mL

Adicionar:

1. 37,5 mL de suero de caballo, inactivado a 56 °C por 30 min.
2. 2,75 g de almidón de arroz estéril.
3. 1 000 UI/mL de penicilina G sódica.
4. 50-100 ug/mL de estreptomycin.

6.1.2 Medio Diamond

6.1.2.1 Constituyentes

Trypticase BBL	2,00 g
Extracto de levadura DIFCO	1,00 g
Maltosa	0,50 g
Clorhidrato de L-cisteína	0,10 g
Ácido ascórbico	0,02 g
Agar	0,05 g
Agua destilada	1000,00 mL

6.1.2.2 Procedimiento

- Ajuste el pH con hidróxido de sodio 1N a 6,8 – 7,0, distribuya en cada tubo 9 mL, autoclave a 120 °C por 15 min y almacene a 4 °C hasta su uso (máximo un mes).
- Agregue a cada tubo en el momento de la siembra, 1 mL de suero sanguíneo estéril, penicilina G potásica 1 000 UI/mL y sulfato de estreptomicina 1 mg/mL.
- Lleve el registro en una ficha (Anexo G).

6.1.3 Medio de Tanabe y Chiba modificado para *Entamoeba histolytica*.**6.1.3.1 Constituyentes**

Agar	2,00 g
Asparagine	2,00 g
Solución Ringer	100,00 mL

6.1.3.2 Procedimiento

- Junte los constituyentes y disuelva en baño María.
- Reparta 3 mL en tubos de 15 x 150 mm, autoclave a 100 ° C por 30 minutos y deje solidificar en plano inclinado.
- Agregue a cada tubo 0,5 a 1 mL de solución Ringer al que se le ha añadido previamente suero de caballo 1%.

6.1.3.3 Solución Ringer

Cloruro de sodio	0,90 g
Cloruro de potasio	0,42 g
Bicloruro de mercurio	0,034 g
Bicarbonato de sodio	0,01 / 0,038 g
Glucosa	0,10 o 0,26 g
Agua destilada	100 mL

Autoclave a 15 libras de presión por 15 min y almacene a 4 °C hasta el momento de su uso.

6.2 Métodos de desarrollo para helmintos**6.2.1 Placas de agar**

Este método permite incrementar la sensibilidad diagnóstica hasta 2,5 veces más que el método de Baermann.

6.2.1.1 Constituyentes

Agar	2,00 g
------	--------

Cloruro de sodio	0,50 g
Agua destilada	100,00 mL

6.2.1.2 Procedimiento

- Mezcle los reactivos, disuelva y autoclave.
- Reparta en placas Petri (o en láminas portaobjetos), dependiendo de la densidad parasitaria, agregue la muestra en el centro de la placa, incuba a 37 °C de 1 a 9 días y controle diariamente el desarrollo de larvas.

6.2.2 Agar carbón

6.2.2.1 Constituyentes

Agar	2,00 g
Carbón	0,50 g
Agua destilada	1000,00 mL

6.2.2.2 Procedimiento

- Homogenice o licue y reparta en tubos de 13 x 100 mm o placas Petri 10 x 150 mm, inocule la muestra y siga el procedimiento anterior (podría utilizar el microcultivo usando el agar en lámina portaobjeto).

6.2.2.3 Método de Harada-Mori

6.2.3.1 Utilidad

Esta técnica permite el desarrollo de huevos a estadios larvales de los nemátodos lo cual posibilita su diferenciación morfológica. Es útil, principalmente, para la obtención de larvas rabditiformes y filariformes de anquilostomídeos y estrogiloides.

6.2.3.2 Materiales

- Tubos 13 x 100, 16 x 150 o 16 x 180 mm.
- Papel filtro.
- Agua estéril o agua de caño filtrada.
- Pinza curva
- Aplicador.
- Tapón de goma o corcho.
- *Parafilm* o cinta adhesiva.
- Solución fisiológica (Anexo C).
- Alcohol 30%.
- Formalina 5%.

6.2.3.3 Procedimiento

a. Preparación del tubo

- Agregue al tubo 1 o 2 mL de agua destilada o solución salina (Figura 22:1).
- Corte una tira de papel filtro de 12-15 x 1,5-2 cm, dependiendo del diámetro y tamaño del tubo (Figura 22:2).
- Haga una muesca en el extremo inferior del papel filtro (Figura 22:3).

b. Extendido de la muestra

- Con el aplicador, extienda la muestra de heces (0,5 a 1 g) sobre la superficie del papel, dejando libre los extremos.
- Coloque cuidadosamente el papel filtro dentro del tubo, evitando el contacto de las heces con el líquido (Figura 22:4).
- Tape el tubo y rotule con los datos del paciente (Figura 22:5).
- Incube a 27 °C – 37 °C por 4 a 10 días (o a temperatura ambiente).

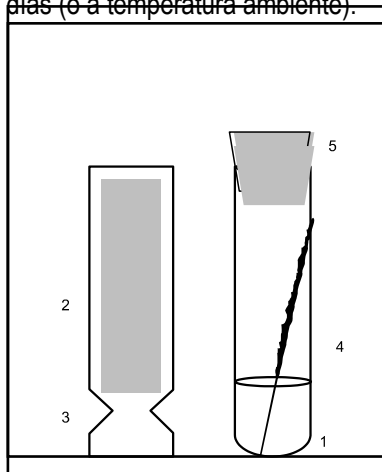


Figura 22. Material del método de Harada Mori tubo con tapa y papel filtro con extendido para el desarrollo de las larvas

6.2.3 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 (Anexo D y Figuras 23-25).

- Las larvas pueden conservarse fijándolas en alcohol 25 a 30% o formalina 5%.

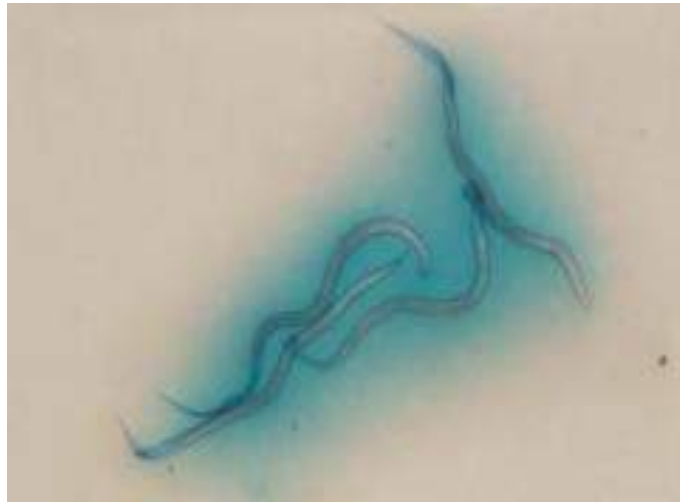


Figura 23. Larvas en *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* (100X) en movimiento con colorante temporal azul de metileno

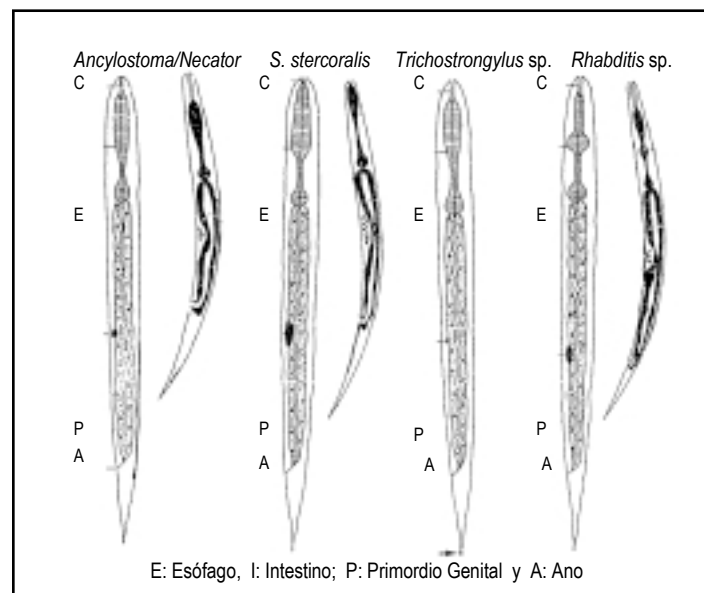


Figura 24. Diferenciación de las larvas rhabditiformes: *Strongyloides stercoralis*, *Necator/Ancylostoma*, *Trichostrongylus* y *Rhabditis* sp

*Strongyloides
stercoralis*

*Necator
americanus*

*Ancylostoma
duodenale*

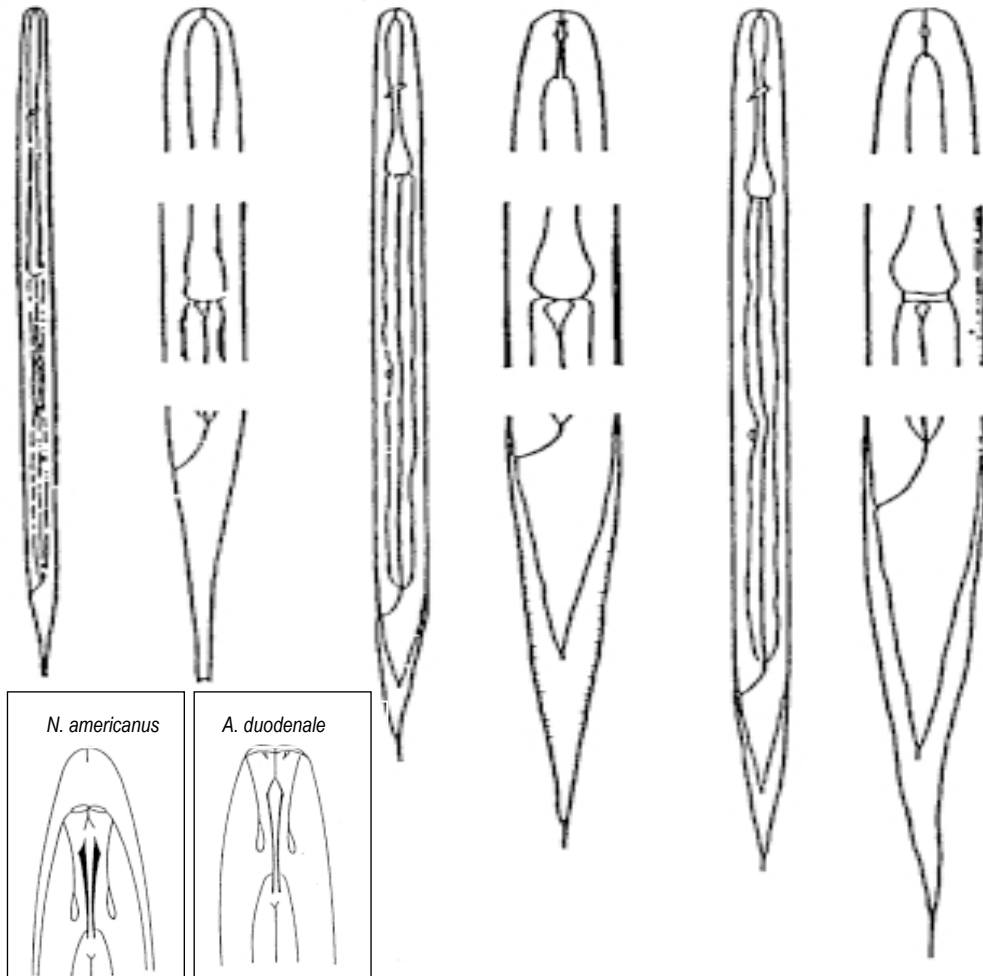


Figura 25. Diferenciación de las larvas filariformes: cutícula radiada, forma ovoide de la parte anterior de *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*, *Strongyloides stercoralis* con cola característica

6.2.4 Método de Harada - Mori modificado por María Beltrán Fabián

6.2.4.1 Procedimiento

- La preparación del tubo es similar al ítem 6.2.3.3; pero, además de la solución salina o agua, se le adiciona al tubo el colorante vital tiónina o verde de malaquita 0,001%.
- El extendido de la muestra también es similar al ítem 6.2.3.3.

6.2.4.2 Observación

Las larvas se extraen del fondo del tubo con una pipeta de transferencia y se observan coloreadas y en movimiento (Figura 26).

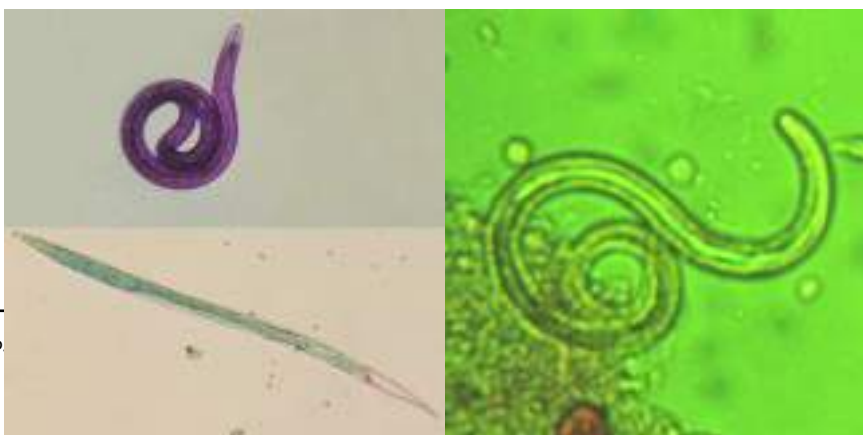


Figura 26. Larvas filariformes de *Necator americanus* (izq) coloreado con tiónina ; *S. stercoralis* verde de malaquita y (der) 100X).
Desarrollo en el método de Harada - Mori modificado

SECCIÓN 7

EXAMEN DE SECRECIONES Y FLUIDOS

7.1. Esputo

7.1.1. Utilidad

Los helmintos que realizan el ciclo de Loos suelen ocasionar sintomatología pulmonar, y pueden encontrarse en una muestra de esputo. Las larvas de *S. stercoralis* son las más frecuentemente observadas en esputo y en las heces.

Por la posibilidad de encontrar estos elementos parasitarios en el esputo, es necesario conocer los principales métodos diagnósticos.

7.1.2 Materiales

7.1.2.1 Láminas portaobjetos.

7.1.2.2 Laminillas cubreobjetos.

7.1.2.3 Vaso cónico o de vidrio de 150 a 200 mL.

7.1.2.4 Coladera o rejilla metálica.

7.1.2.5 Pipetas de transferencia

7.1.2.6 Solución de hidróxido de sodio 2 al 4%.

7.1.2.7 Gasa.

7.1.2.8 Microscopio óptico.

7.1.3 Obtención de la muestra

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

7.1.4 *Strongyloides stercoralis*

7.1.4.1 Procedimiento

- Use el método de Baermann, 5.3.4 reemplazando únicamente la muestra de heces por la de esputo.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur, obtenga el sedimento, colóquela en una luna de reloj o en una placa Petri y observe con el estereoscopio o el microscopio.

7.1.4.2 Observación

Observe las larvas en movimiento.

7.1.5 *Paragonimus spp*

7.1.5.1 *Procedimiento*: técnica AMS III modificada (AMS = American modified service).

- Agregue al frasco con la muestra (4 a 8 mL) 20 a 30 mL de hidróxido de sodio al 2 - 4%, o ácido clorhídrico 1% y, a través de una gasa, vierta a un tubo cónico de 50 mL.
- Centrifugue a 2500 r.p.m. por 5 a 10 minutos, elimine el sobrenadante, agregue hidróxido de sodio 2% o ácido clorhídrico del 3% C.3.8, al sedimento hasta llenar el tubo y deje en reposo durante 45 a 60 minutos.
- Con ayuda de una pipeta obtenga 1 o 2 gotas de sedimento, colóquelo en una luna de reloj o placa Petri y observe con estereoscopio o microscopio.

7.1.5.2. Observación

Observe huevos operculados caracterizados por presentar una cubierta externa ondulada (Figura 6).

7.2 Aspirados, secreciones o jugo duodenal

7.2.1 Utilidad

7.2.1.1 Los parásitos intestinales que tiene por hábitat el duodeno, pueden encontrarse en muestras biliares, obtenidas ya sea por sonda duodenal, por el método de la cuerda encapsulada (Enterotest) o por la cápsula de Beal.

7.2.1.2 Los parásitos intestinales que tienen por hábitat el intestino grueso o delgado, también pueden obtenerse a partir de endoscopías gastrointestinales, proctoscopías o colonoscopías.

7.2.1.3 La obtención del contenido duodenal ha mostrado ser útil en la búsqueda de *Giardia lamblia*, *Isospora belli*,

Strongyloides stercoralis, *Ancylostoma* o *Necator* y *Fasciola hepatica*, cuyos adultos se localizan en el intestino y las vías biliares respectivamente.

7.2.1.4 La obtención de material a través de endoscopia gastrointestinal es útil en la búsqueda de coccidios intestinales, en tanto que las proctoscopias y colonoscopias sirven para la búsqueda de *Entamoeba histolytica*.

7.2.2 Materiales

Para realizar el método de la **cuerda encapsulada** es necesario:

- Cuerda encapsulada.
- Guantes.
- Vaso de bebida.
- Papel pH.
- Placas Petri o lunas de reloj.
- Láminas portaobjetos.
- Láminas de vidrio excavadas.
- Laminillas cubreobjetos.
- Microscopio binocular

Nota: la obtención del contenido duodenal o muestra biliar por sonda, requiere la intervención de personal médico para la introducción y retiro de la sonda duodenal.

7.2.3 Procedimiento

7.2.3.1 El método de la cuerda encapsulada o Enterotest requiere que el paciente esté en ayunas.

7.2.3.2 Un extremo de la cuerda se fija con una cinta adhesiva en la mejilla del paciente y se le hace deglutir la cápsula, en cuyo interior está enrollada una cuerda de nylon, la que se va desenrollando a medida que desciende por el estómago y el duodeno.

7.2.3.3 A las 4 o 5 horas se retira la cuerda, se puede observar que el extremo que llegó al duodeno está de color amarillo

7.2.3.4 Se exprime el extremo en una lámina excavada o lámina portaobjeto.

7.2.3.5 El material obtenido por la sonda duodenal se deposita en un tubo de centrifuga. Una pequeña porción se deposita en una lámina excavada o portaobjeto.

7.2.4 Examen microscópico

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

7.2.4.2 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 o 15 x 150 mm, dependiendo de la cantidad, se mezcla tapando el tubo y, por agitación se liberan las formas parasitarias del mucus duodenal.

7.2.4.3 Deje reposar durante 30 a 45 min, elimine el sobrenadante y observe el sedimento directamente o con tinción de lugol.

7.2.5 Observación

Se observa con estereoscopio o microscopio.

7.2.6 Resultado

Informe el nombre del parásito y su estadio evolutivo (Sección 10).

7.3 Secreción, fluido y contenido intestinal

El aspirado del contenido de lesiones intestinales a través de exámenes endoscópicos (gastrointestinal, proctoscopia o colonoscopia), cirugía y otros, pueden examinarse inmediatamente después de obtenido mediante observación directa y en ocasiones en cámara de Foot o en microscopios de platina caliente, como es el caso de las muestras obtenidas por proctoscopia realizadas para la búsqueda de los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

SECCIÓN 8

DIAGNÓSTICO DE *Enterobius vermicularis* POR EL MÉTODO DE GRAHAM (CINTA ADHESIVA TRANSPARENTE)

8.1 Fundamento

La hembra de *Enterobius vermicularis* deposita sus huevos en las márgenes del ano durante la noche. La técnica de Graham tiene por objeto adherir estos huevos a la cinta adhesiva transparente o cinta *scotch*, la que se extenderá posteriormente en una lámina portaobjeto para su observación microscópica.

8.2 Materiales

- 8.2.1 Láminas portaobjetos desengrasadas.
- 8.2.2 Cinta adhesiva transparente o cinta *scotch* de 1 pulgada de ancho.
- 8.2.3 Solución salina o tolueno.
- 8.2.4 Aplicador (bajalengua).

8.3 Procedimiento

- 8.3.1 Extienda la cinta adhesiva transparente sobre la superficie de la lámina portaobjeto, adhiera una porción pequeña a ambos extremos, dejando una lengüeta separar la cinta de la lámina portaobjeto cuando se va a tomar la muestra (Figura 27).

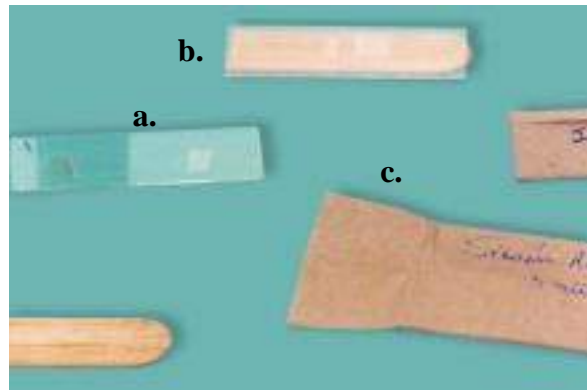


Figura 27. Preparación de la lámina con cinta adhesiva transparente (a); bajalenguas (b), envuelto con papel kraft (c)

- 8.3.2 La obtención de la muestra se realiza de preferencia en la noche, 2 a 3 horas después que el paciente (generalmente los niños) está dormido, o a la mañana siguiente y sin que se haya realizado el aseo de la región perianal.
- 8.3.3 El paciente debe estar inclinado exponiendo la región glútea, se despegla la cinta adhesiva levantando la lengüeta hasta que quede expuesta la parte adherente y, con ayuda de un bajalengua, se aplica el lado adhesivo (Figura 28 A).
- 8.3.4 Se adhiere la cinta haciendo toques en la región perianal en sentido horario o antihorario (Figura 28 B).

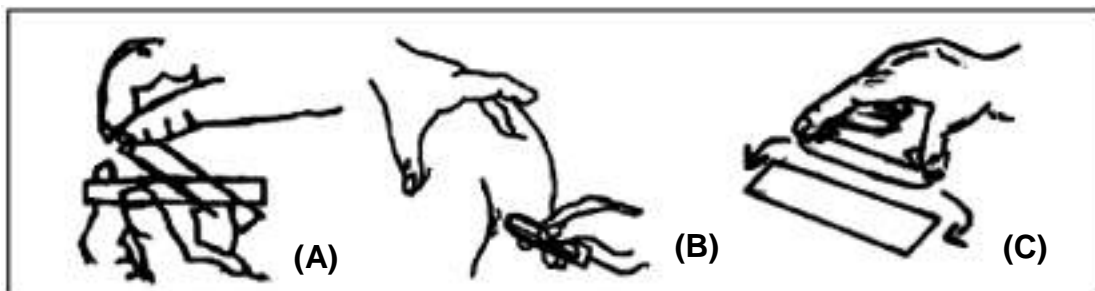


Figura 28. Procedimiento de recolección de la muestra: A-C

- 8.3.5 Terminada la aplicación, extienda la cinta adhesiva (Figura 28C) y vuelva a pégalas en la lámina portaobjeto, luego envuélvala con el papel y escriba el nombre del paciente.

8.3.6 Microscopía de las láminas

- 8.3.6.1 En el laboratorio, desprenda la cinta engomada del frotis perianal por un extremo, agregue solución de tolueno, hidróxido de sodio al 2% o solución salina (1 o 2 gotas de la sustancia elegida) ello clarificará la muestra y permitirá una mejor observación de los huevos o adultos de *E. vermicularis*. Es necesario observar la lámina en su totalidad.
- 8.3.6.2 En ocasiones, se pueden observar al microscopio, huevos de otros helmintos, principalmente huevos de *Taenia* sp, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* entre otros.

8.4 Observación

Observe los huevos embrionados o hembra adulta de *E. vermicularis*.

8.5 Resultado

Informe el nombre del parásito y su estadio evolutivo (Figura 29).

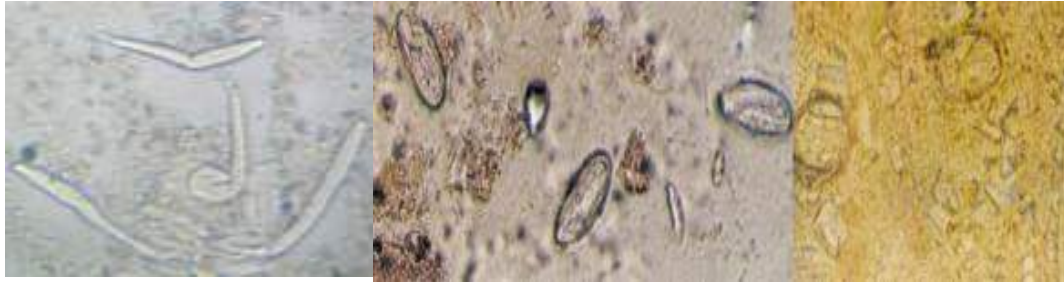


Figura 29. Adultos y huevos de *Enterobius vermicularis* (izq. y medio) y *Ascaris lumbricoides* (derecha). Método de Graham (100X)

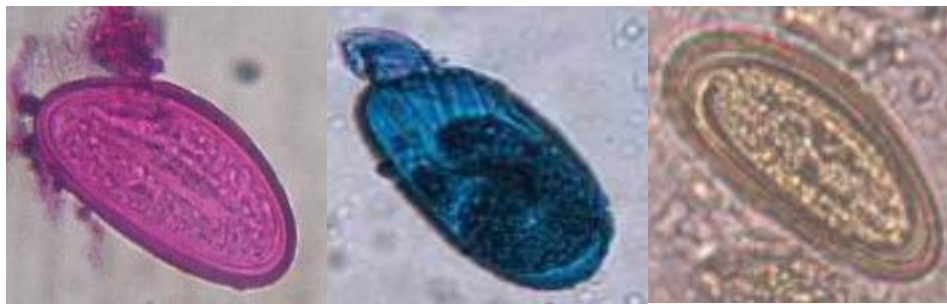


Figura 30. *Enterobius vermicularis* (huevos larvas) recientemente liberados, aislados del método de Graham (100X)

SECCIÓN 9

EXAMEN DE BIOPSIAS

9.1 Biopsias del tubo digestivo

- 9.1.1 Las biopsias que son útiles para la búsqueda de parásitos son las obtenidas del antro pilórico, duodeno y recto, mediante endoscopías.
- 9.1.2 Los parásitos diagnosticados frecuentemente en biopsias del antro pilórico y del duodeno son: *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Strongyloides stercoralis* y *Giardia lamblia*, menos frecuente es la observación de coccidios intestinales como *Cryptosporidium* y *Cyclospora*.
- 9.1.3 Las biopsias de ulceraciones del intestino grueso muestran *Entamoeba histolytica* o *Balantidium coli*.
- 9.1.4 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.

9.2 Recomendaciones

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

- 9.2.2 La coloración de hematoxilina-eosina es útil, aunque generalmente no es posible reconocer la morfología del parásito, pues el corte microscópico afecta su integridad.
- 9.2.3 Las piezas anatómicas pueden conservarse en formol al 10% para ser usadas como piezas de museo o muestras de referencia.

SECCIÓN 10

RESULTADOS

10.1 Generalidades

- 10.1.1 Los resultados indicarán el(los) método(s) empleado(s), el género o la especie del parásito observado y su estadio evolutivo. La densidad parasitaria puede expresarse como el número de formas parasitarias observadas por campo de microscopio con objetivo de 10X y 40X.
- 10.1.2 Todo formato de respuesta de resultados debe contener los datos de identificación: nombre, edad, sexo, fecha, las características organolépticas de las heces (consistencia, color, presencia de sangre y moco), datos de la observación microscópica (presencia de leucocitos, eritrocitos, levaduras, fibras musculares no digeridas y parénquima de células vegetales en cantidad considerable), ya que esta información facilitará un mejor diagnóstico clínico.
- 10.1.3 Los resultados obtenidos deben registrarse en un cuaderno de registros del laboratorio. En el caso de los laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, siguiendo las normas de control de calidad, el 10% de las muestras deben conservarse en el fijador, siendo mensual, trimestral y anualmente remitidas al laboratorio inmediato en jerarquía para establecer la concordancia de los resultados (Anexo F).
- 10.1.4 Para la vigilancia de las infecciones parasitarias establecida por el Instituto Nacional de Salud llene las fichas correspondientes (Anexo F).

10.2 Resultado positivo

- 10.2.1 El informe debe contener el nombre del paciente, los agentes observados y su estadio o forma evolutiva: quistes (q), ooquistes (o), trofozoítos (t), esporas (e), huevos (h) o larvas (l) y adultos (a).
- 10.2.2 La intensidad parasitaria puede expresarse cualitativa o semicuantitativamente:

10.2.2.1 *Cualitativamente*

Escaso, regular o buena cantidad, según sea el grado de facilidad o dificultad para ubicarlos.

10.2.2.2 *Semicuantitativamente*

Contando las formas parasitarias:

Si se observan 1 o 2 elementos en toda la lámina, escribir el nombre del agente y su estadio evolutivo.

(+) si se observan de 2 a 5 elementos por campo microscópico 10X o 40X; (++) si se observan de 6 a 10 elementos por campo microscópico 10X o 40X; (+++) si se observan >10 elementos por campo microscópico 10X o 40X.

10.3 Resultado negativo

- 10.3.1 Se informa que no se observó quistes, trofozoítos, ni huevos de parásitos.

SECCIÓN 11

EXAMEN DE MUESTRAS DE AGUA SUPERFICIALES PARA LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS

11.1 Generalidades

El análisis parasitológico de las muestras de aguas superficiales (ríos, canales o bocatomas, pozos) se realiza a partir de botellas / frascos de agua, y mediante el uso del hisopo de gasa (Moore modificado).

11.2 Uso y elaboración del hisopo de gasa

El hisopo de gasa es utilizado para el estudio de los parásitos en muestras de aguas superficiales (agua y desagüe) por la facilidad en la obtención, manejo y transporte; además por su sensibilidad para captar los protozoarios y helmintos, incluyendo amebas de vida libre (AVL) y *Paragonimus sp.*

El hisopo se elabora con gasa de 75 x 90 cm, con un peso seco de 20 g aprox. Se dobla la gasa en forma de abanico, se coloca los extremos tratando de no quedar visibles y se sujeta a una cuerda (pabilo o nylon) de 2 m de longitud (Fig. 31).



Figura 30. Hisopo de gasa

11.3 Obtención de las muestras de agua con hisopo de gasa

- 11.3.1 Seleccionada el área de muestreo, se procede a la toma de muestra por arrastre o se deja por 24 horas, el hisopo siempre debe permanecer sumergido en el agua tratando que no quede visible, se sujeta a un tronco para evitar su pérdida.
- 11.3.2 El hisopo con la muestra de agua se coloca en una bolsa de polietileno y dentro de cajas, preferentemente de poliestireno, para conservarlas a bajas temperaturas, de tal manera que la muestra extraída sea similar a la composición del agua por investigar, por un mayor tiempo sin que se altere.

11.4 Obtención de las muestras de agua en botella o frasco

- 11.4.1 La obtención de las muestras de agua consiste en la captación de un volumen determinado (2-4 L) de agua para su análisis de parásitos, estas pueden ser de pozo, río, canales, bocatomas o desagües.

11.4.2 Para la obtención

- Las botellas o frascos de recolección de volumen de 2-4 L, deben estar limpios.
- Para la extracción requiere de otro recipiente, balde o jarra limpia por dentro y por fuera, este se colocará con una soga y se sumergirá rápidamente en el agua y regresarlo a la superficie para llenar la botella o frasco de recolección.
- Rotule la muestra y haga su respectiva una ficha con los siguientes datos: lugar de muestreo, fecha, hora, número de muestra, temperatura y cantidad.

11.5 Procesamiento de muestras de agua en hisopos de gasa

- Pese cada hisopo muestreado, sumérjalo en un beacker con 100-250 mL de solución salina durante 1-1½ h, agite cada 15- 20 min para desprender todos los elementos parasitarios que estuvieran en el hisopo.
- Retire el hisopo, deje reposar por 20-30 min, elimine el sobrenadante, conserve el sedimento.
- Extraiga 20-30 mL de la muestra, colóquelo en una placa Petri, lave el sedimento 3-4 veces hasta que esté claro, vierta en una placa ese sobrenadante luego observe con estereoscopio.
- Resuspenda en dos tubos (A y B), 3-5 mL de sedimento y lave el tubo A con solución de azúcar (*sheather sugar*) y el tubo B con dicromato de potasio 1,5-2,5%, (método modificado de Cadwell y Cadwell) se centrifuga durante 3-5 min para detectar protozoos y helmintos, coloque el sedimento en una lámina portaobjetos y observe al microscopio.

11.6 Procesamiento de muestras de agua en botella / frasco

- Mida el volumen de la muestra, registre el pH y deje en reposo.
- Filtre ¾ partes del volumen de muestra en papel filtro y cuele el ¼ restante a través de una gasa doblada, se sujeta a una coladera en una copa cónica de 200-300 mL y deje sedimentar.
- Enjuague el papel filtro utilizado en una placa para recuperar las formas parasitarias, elimine el líquido filtrado y analice el sedimento.
- Resuspenda 3-5 mL de sedimento en tubos (A y B) de 15 x 150 mm, a un tubo A se agrega solución de azúcar y al tubo B se le incorpora dicromato de potasio 2,5% luego centrifugar.
- Se elimina el sobrenadante y se repite esta operación una a dos veces. Coloque 1 a 2 gotas en ambos lados extremos y observe con microscopio. Algoritmo B4.

BIBLIOGRAFÍA

- **Álvarez B.** Parasitosis intestinales: aspectos diagnósticos. Ginebra: OMS; 1964. Serie de Informes Técnicos.
 - **Arruda B, Magalhaes E, Freitas N.** Manual de técnicas para histología normal y patológica. Sao Paulo: EDART; 1976.
 - **Ash L, Orihel T.** Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press American Society of Clinical Pathologist. Chicago: ASCP; 1967.
 - **Atías A, Neghme A.** Parasitología Clínica. 3.ª ed.; 1991.
 - **Beltrán M.** Enteroparásitos. Manual de nivel local. Washington DC: OPS; 1993.
 - **Beltrán M, Arce N, Guzmán N.** Un método de obtención de muestras de agua superficiales en el estudio de parásitos intestinales. Res. XI Cong. Lat. Parasitol. I Cong. Per. Parasitol. 21-26 Nov. 1993 122.
 - **Beltrán M et al.** Vigilancia Epidemiológica de las Enteroparasitosis: Experiencia Piloto en Huará Dpto. Lima Contaminación en Aguas superficiales y Suelos. II Congreso de parasitología en Trujillo 1995 p 7 (res10)

Beltrán María, Tello Raúl, Náquira César Manual de Procedimientos de Laboratorio en el diagnóstico de los parásitos del hombre, Norma 37, 2003
 - **Botero D., Restrepo M.** Parasitosis humanas. Colombia: CIB; 1990.
 - **Instituto Nacional de Salud.** Guía de procedimientos diagnósticos de las parasitosis intestinales. Lima: INS; 1998.
 - **Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras (I) 2ª Ed. Lima: INS, 1997. Serie de Normas Técnicas N.º 15.
 - **Instituto Nacional de Salud.** Normas de bioseguridad. 2ª Ed.: Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N.º 18.
 - **ISO (International Standard Organization = Cumplimiento de normas del sistema de calidad) 15189.** Montevideo: Instituto Uruguayo de Normas Técnicas; 1993.
 - **Moura H.** Cram - Chromotrope a new technique that enhances detection of microsporidial spores in clinical samples; 1997.
 - **Organización Mundial de la Salud.** Infecciones Intestinales por protozoos y helmintos. Ginebra: OMS; 1981. Serie Informes Técnicos.
 - **Organización Mundial de la Salud.** Métodos básicos de laboratorio en parasitología Ginebra OMS; 1991
 - **Organización Mundial de la Salud.** Medios auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales. Ginebra: OMS; 1995.
 - **Organización Mundial de la Salud.** Guía para el transporte seguro de sustancias infecciosas y especímenes diagnósticos. Ginebra OMS; 1997.
 - **Organización Panamericana de Salud.** Manual de laboratorio nivel local. Washington OPS; 1993
 - **Shore L, Lawrence R.** Diagnostic Parasitology. Manual of clinical laboratory. C.V Mosby Co.; 1975.
 - **Spencer FM, Monroe LS.** The color atlas of intestinal parasites. Illinois; Ch Thomas Publisher. Springfield 1961.
 - **Suzuki N.** Color atlas of helminthology eggs. 3.ª ed. Tokio: JAPC; 1986.
 - **Bryan Frank L.** Hazard Analytical Critical Control Point evaluations. A guide Identifying Hazards and Assessing Risks Associated with Food preparation and Storage. 1- 70 WHO 1992
-

ANEXO A

PRINCIPALES PARÁSITOS INTESTINALES DEL HOMBRE

Tabla A1. Protozoarios: formas evolutivas de diagnóstico, tipo de muestra y patogenicidad

PROTOZOARIOS			
Parásitos	Formas evolutivas para el diagnóstico	Tipo de muestra	Patogenicidad
Clase Lobosea			
<i>Entamoeba histolytica</i>	Trofozoítos, quistes	Heces	sí
<i>Entamoeba dispar</i>	Trofozoítos, quistes	Heces	no
<i>Entamoeba coli</i>	Trofozoítos, quistes	Heces	no
<i>Entamoeba hartmanni</i>	Trofozoítos, quistes	Heces	no
<i>Entamoeba polecki</i>	Trofozoítos, quistes	Heces	no
<i>Endolimax nana</i>	Trofozoítos, quistes	Heces	no
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	Trofozoítos, quistes	Heces	no
<i>Blastocystis hominis</i>	Trofozoítos	Heces	sí
Clase Zoomastigophorea			
<i>Giardia lamblia</i>	Trofozoítos, quistes	Heces, contenido duodenal	sí
<i>Trichomonas hominis</i>	Trofozoítos	Heces	no
<i>Enteromonas hominis</i>	Trofozoítos, quistes	Heces	no
<i>Retortamonas intestinalis</i>	Trofozoítos, quistes	Heces	no
<i>Chilomastix mesnili</i>	Trofozoítos, quistes	Heces	no
<i>Dientamoeba fragilis</i>	Trofozoítos,	Heces	sí
<i>Lophomonas sp</i>	Trofozoítos	Fluidos	si
Clase Ciliata			
<i>Balantidium coli</i>	Trofozoítos, quistes	Heces	sí
Phylum Apicomplexa			
Clase Sporozoa			
<i>Isospora belli</i>	Ooquistes	Heces, contenido duodenal	sí
<i>Cryptosporidium sp.</i>	Ooquistes	Heces, secreciones	sí
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Ooquistes	Heces, contenido duodenal	sí
<i>Sarcocystis (bovis-hominis, bovis-canis, suis hominis=Isospora hominis)</i>	Esporoquiste	Heces	sí
Phylum Microspora			
Microsporidios			
<i>Enterocytozoon bienersi</i>	Esporas	Heces	sí
<i>Encephalitozoon spp.</i>	Esporas	Heces	sí
<i>Pleistophora</i>	Esporas	Heces, fluidos	sí

Protozoarios intestinales: amebas

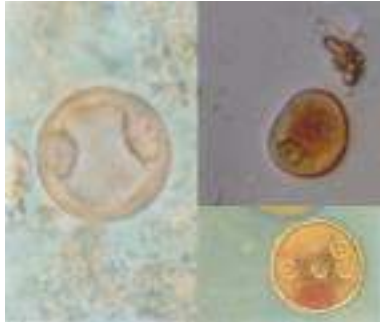


Figura A1.1. *Entamoeba histolytica* con 1, 2 y 4 núcleos, coloración lugol (400X)



Figura A1.2. Trofozoíto de *Entamoeba histolytica* con glóbulos rojos (1000X)



Figura A1.3. Trofozoíto de *Entamoeba histolytica*, coloración lugol (400X)

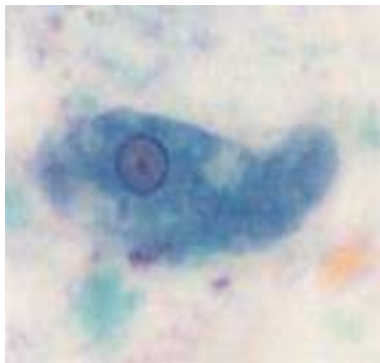


Figura A1.4. Trofozoíto de *Entamoeba histolytica* con coloración tricrómica

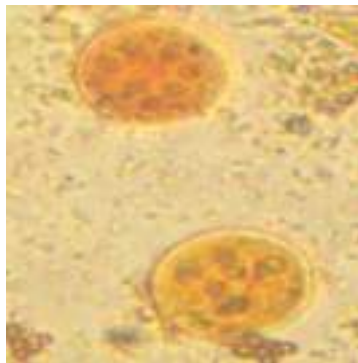


Figura A1.5. *Entamoeba coli* con solución de lugol (1000X)

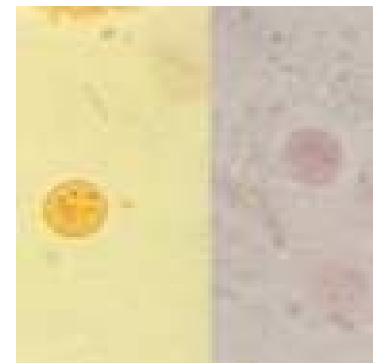


Figura A1.6. Quiste de *Endolimax nana* con 4 núcleos. Coloración lugol (izq.), Coloración MIF (der.)

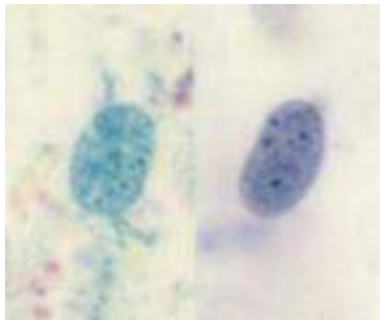


Figura A1.7 Quiste de *Endolimax nana* con 4 núcleos con coloración hematoxilina férrica

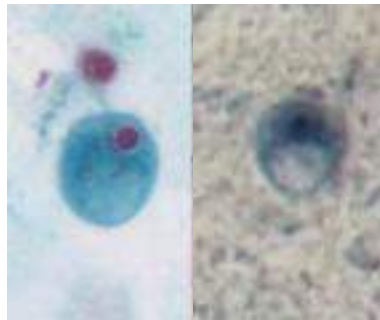


Figura A1.8. *Iodamoeba bütschlii* con coloración tricrómica y en coloración hematoxilina férrica



Figura. A1.9. Trofozoíto de *Blastocystis hominis*, Coloración: Azul de metileno

Fuente: Láminas WHO 1994, Figuras A1.4, A1.7 y A1.8, fotografías originales

Protozoarios intestinales: Flagelados, ciliados y coccidios

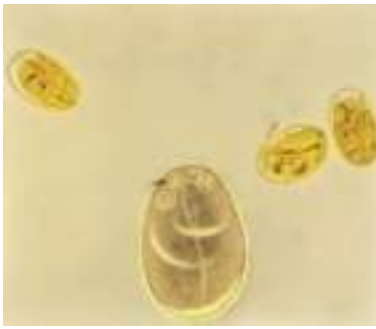


Figura A1.10. Quistes de *Giardia lamblia*, (Iugol) (400X). (1000X)

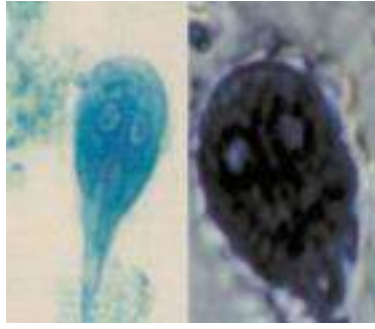


Figura A1.11. Trofozoíto de *Giardia lamblia*, concoloración tricrómica y hematoxilina férrica (1000x)

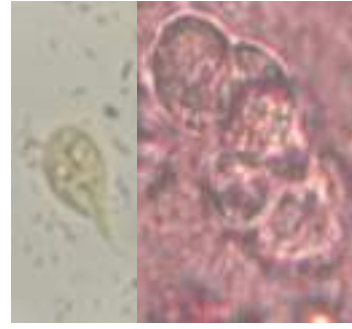


Figura A1.12. Trofozoíto de *Gamblia* (200x), *Lophomonas* sp 400x

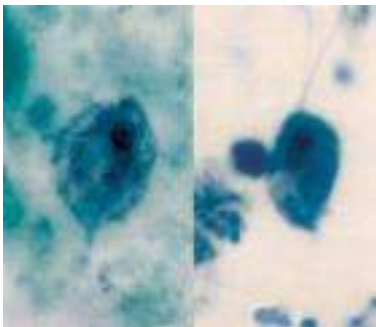


Figura A1.13. *Trichomonas hominis* con Colorac. tricrómica y Hem.férrica (1000x)

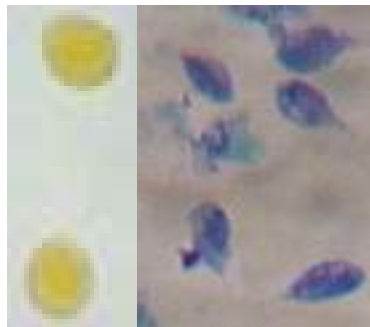


Figura A1.14. Quistes y trofozoitos de *Chilomastix mesnili*, Solución salina (200x) y Hematoxilina férrica (1000X)

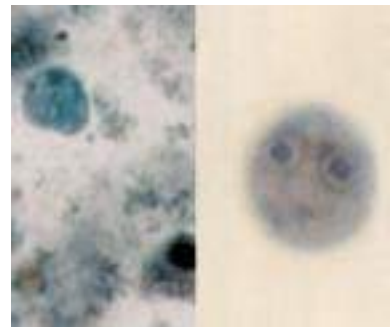


Figura A1.15. *Dientamoeba fragilis*, Hematoxilina férrica (1000X)

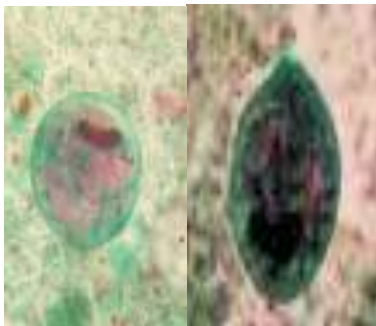


Figura. A1.16. Quistes y trofozoitos de *Balantidium coli*, coloración tricrómica (100x)



Figura. A1.17. *Isospora belli* en coloración Ziehl Neelsen (400X)

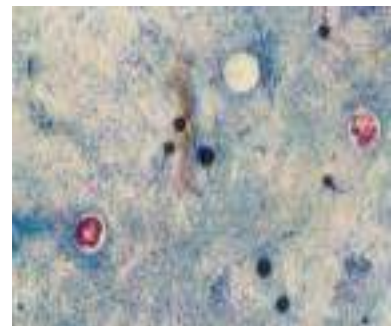
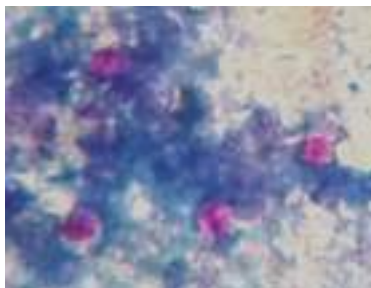


Figura A1.18. *Cryptosporidium parvum*, coloración: Ziehl-Neelsen (1000X)



FiguraA1.19. *Cyclospora cayetanensis* con coloración Ziehl-Neelsen



Figura A1.20. *Sarcocystis hominis* en formalina 10%

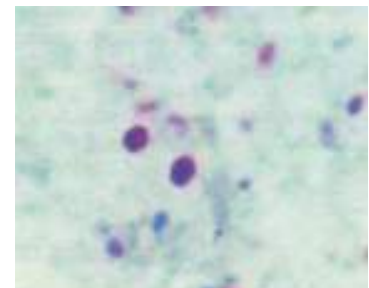


Figura A1.21. *Enterocytozoon bienesi*, coloración Gram-chromotrope

Fuente: Láminas WHO 1994, Figuras A1.11, A1.20 y A1.21, fotografías originales.

HELMINTOS			
Parásitos	Formas evolutivas para el diagnóstico	Tipo de muestra	Patogenicidad
Phylum Nematoda			
Clase Aphasmidea			
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Adultos, juveniles, huevos	Heces	sí
Anquilostomídeos			
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Larvas, huevos	Heces	sí
<i>Necator americanus</i>	Larvas, huevos	Heces	sí
<i>Trichuris trichiura</i>	Huevos	Heces	sí
<i>Capillaria philippinensis</i>	Huevos, larvas, adultos	Heces	sí
Clase Phasmidea			
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Adultos, huevos, larva rabadiforme	Heces, contenido duodenal, esputo	sí
<i>Enterobius vermicularis</i>	Adulto hembra, huevos	Frotis perianal, hisopado anal, heces	sí
<i>Trichostrongylus sp.</i>	Huevos, larvas	Heces	sí
Phylum Platyhelminthes			
Clase Cestoda			
<i>Taenia solium</i>	Fragmentos de estróbila, progótidis, huevos	Heces, frotis perianal	sí
<i>Taenia saginata</i>	Fragmentos de estróbila, progótidis, huevos	Heces, frotis perianal	sí
<i>Diphyllobothrium pacificum</i>	Adulto, estróbila, proglótidos, huevos	Heces	sí
<i>Dipylidium caninum</i>	Estróbila, proglótidos, cápsulas ovíferas	Heces	sí
<i>Hymenolepis nana</i>	Huevos	Heces	sí
<i>Hymenolepis diminuta</i>	Huevos	Heces	sí
Clase Trematoda			
<i>Fasciola hepática</i>	Huevos	Heces, contenido duodenal, secreción biliar	sí
<i>Paragonimus peruvianus</i> = <i>P. mexicanus</i>	Huevos	Espujo, heces	sí
<i>Clonorchis sp</i>	Huevos	Heces	sí
<i>Schistosoma mansoni</i>	Huevos	Heces	sí
<i>Echinostoma sp.</i>	Huevos	Heces	sí
<i>Cotylophorum sp</i>	Huevos	Heces	sí
Phylum Acanthocephala			
<i>Macracanthorhynchus</i> <i>Hirudinaceus Linguatula sp.</i>	Huevos, adultos	Heces, cirugías o autopsias Huevos	sí sí
Fitoparásitos			
<i>Meloidogyne sp.</i>	Huevos, larvas	Heces	sí
<i>Heterodera sp.</i>	Huevos, larvas	Heces	¿?
<i>Rhabditis sp</i>	Larvas, adultos	Heces	¿?

Helmintos: nemátodos

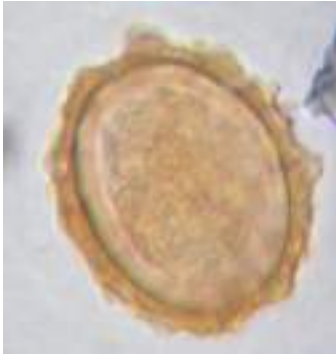


Figura A2.1. Huevo fertilizado de *Ascaris lumbricoides*

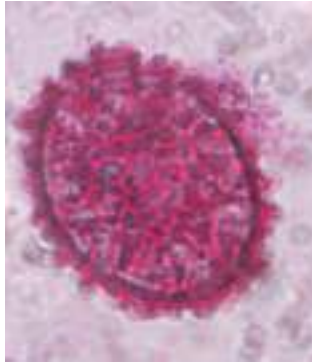


Figura A2.2. Huevo fértil corticado de *Ascaris lumbricoides* en coloración temporal de eosina (400X)



Figura A2.3. Huevo infértil de *Ascaris lumbricoides* con lugol (400X)



Figura A2.4. *Ascaris lumbricoides* Huevo larvado, (solución salina)

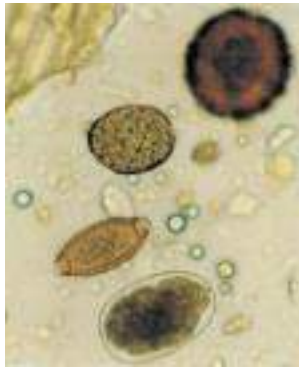


Figura A2.5. *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y *Ancylostoma* o *Necator* en solución salina



Figura A2.6. *Meloidogyne* sp. (arriba) y *Enterobius vermicularis* (abajo) en solución salina (400X)



Figura A2.7. *Enterobius vermicularis* Huevos con lugol, fucsina y solución salina del método de Graham (400X)



Figura A2.8. *Enterobius vermicularis* larva en azul se aprecia la forma de D (400X)



Figura A2.9. *E. vermicularis* Larva de emergiendo en tionina(400X)

Fuente: fotografías originales.

Helmintos: nemátodos



Figura A2.1. *Trichostrongylus* sp. Huevo en solución salina (400X)



Figura A2.2. *Ancylostoma* /*Necator* Huevo embrionado con lugol)



Figura A2.3. *Ancylostoma* /*Necator* Huevo larvado de con lugol



Figura A2.4. *Trichuris trichiura* izq, *Capillaria philippinensis* en lugol (400x)



Figura A2.5. *Ancylostoma duodenale*, en solución salina (400x)

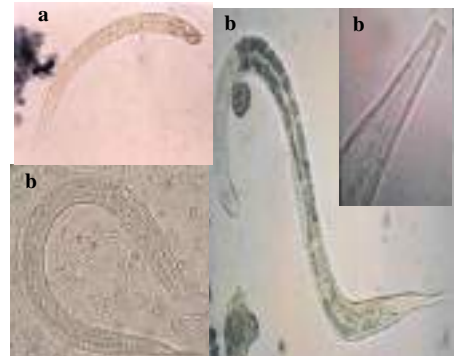


Figura A2.6. *Trichostrongylus* sp(a) y *Strongyloides stercoralis* (b) (400x)



Figura A2.7. *Necator americanus* (N) y *Ancylostoma duodenale* (A) larvas filariformes (200 X)



Figura A2.8. *Ancylostoma duodenale* (I) extremo anterior en solución salina

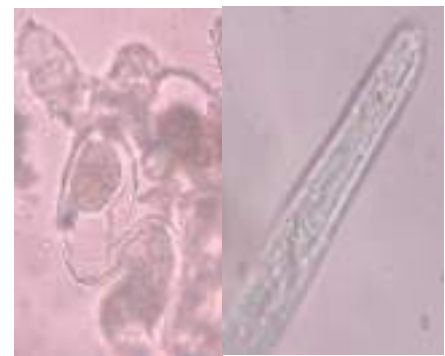


Figura A2.9. *S.fuelleborni* huevos en cadena y extremo anterior larva en sol salina

Fuente: Fotos originales

Helmintos: platelmintos (céstodes)

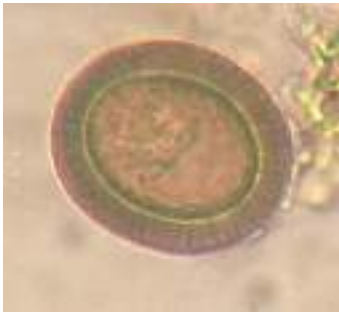


Figura A2.10. Huevo de *Taenia* sp., coloración lugol (200X)

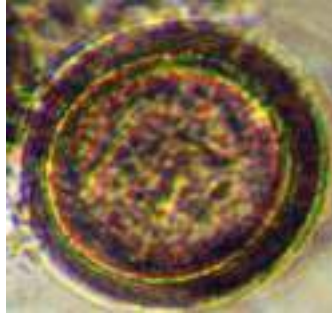


Figura A2.11. Huevo de *Taenia* sp. Solucion salinal (400X)

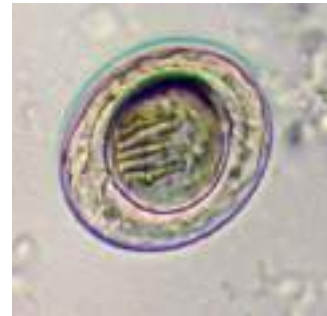


Figura A2.12. *Hymenolepis nana*. Huevo de en solución salina (400X)



Figura A2.13. Huevo de *Hymenolepis nana* con solución lugol (200X)

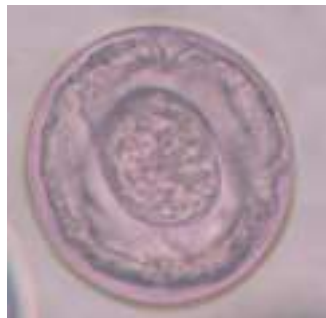


Figura A2.14. Huevo de *Hymenolepis diminuta* con solución salina (400X)



Figura A2.15. Huevo de *Hymenolepis nana* con solución de lugol (400X)



Figura A2.16. *Diphylobothrium pacificum* Huevo en coloración lugol 55 x 42.5 μ m (400X)



Figura A. 2.17. *Diphylobothrium latum*. Huevos en coloración lugol 55 x 67 μ m (400X).

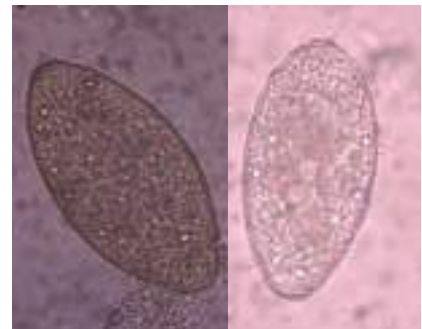


Figura A2.18. *Fasciola* (izq),-*Paramphistomum* (der) con solución salina) note el color(400X)

Fuente: Fotos originales

Helminths: platelmintos (trematodos y acantocéfalos)

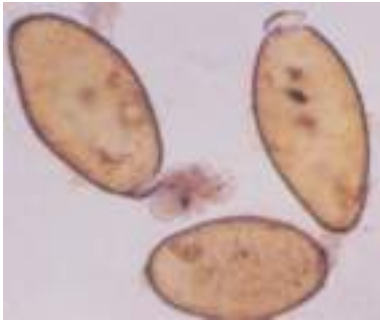


Figura A2.10. Huevo de *F. hepatica*. Solución salina (200X)



Figura A2.11. Huevo de *Fasciola hepatica* con miracidium (200X)



Figura A2.12. Huevo *Cotylophorum* sp en solución salina (400X)



Figura A2.13. Huevo de *Paragonimus peruvianus* con solución salina (400X)



Figura A2.14. Huevo de *Clonorchis sinensis* con solución salina (400X)



Figura A2.15. Huevos de *Paragonimus* sp en muestra de esputo (400X)

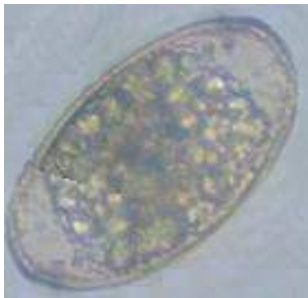


Figura A2.16. *Linguatula* sp Huevo con solución salina (400X)

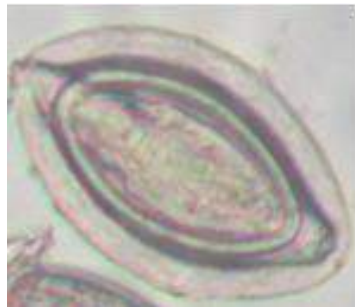


Figura A2.17. *Macracanthorhynchus hirudinaceus*. Huevo, acanthor por liberarse (400X)

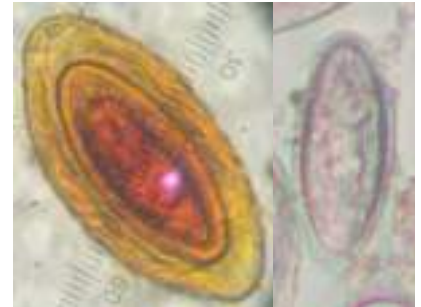
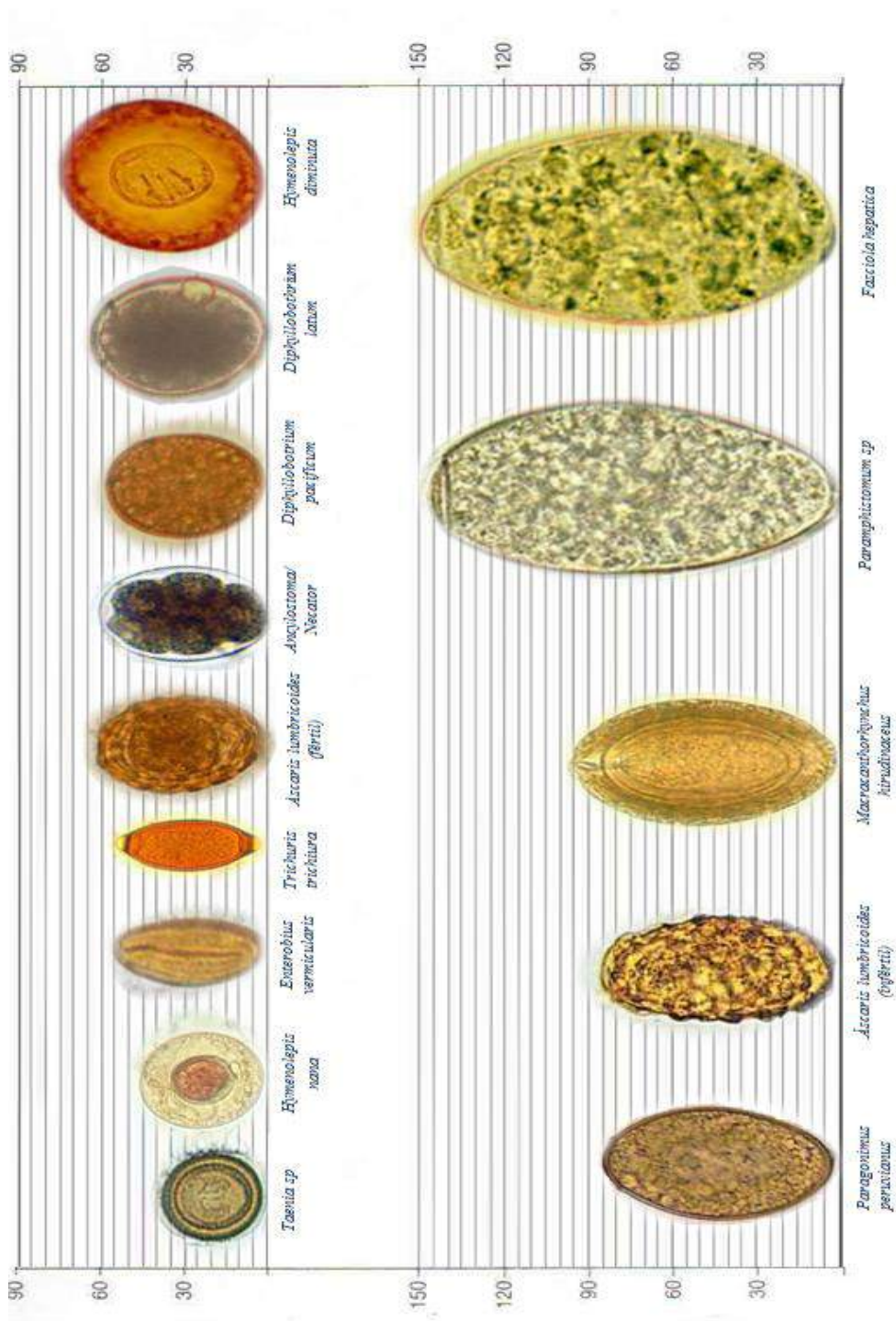


Figura A2.18. *Macracanthorhynchus hirudinaceus*. Huevo con 3 capas y un acanthor libre

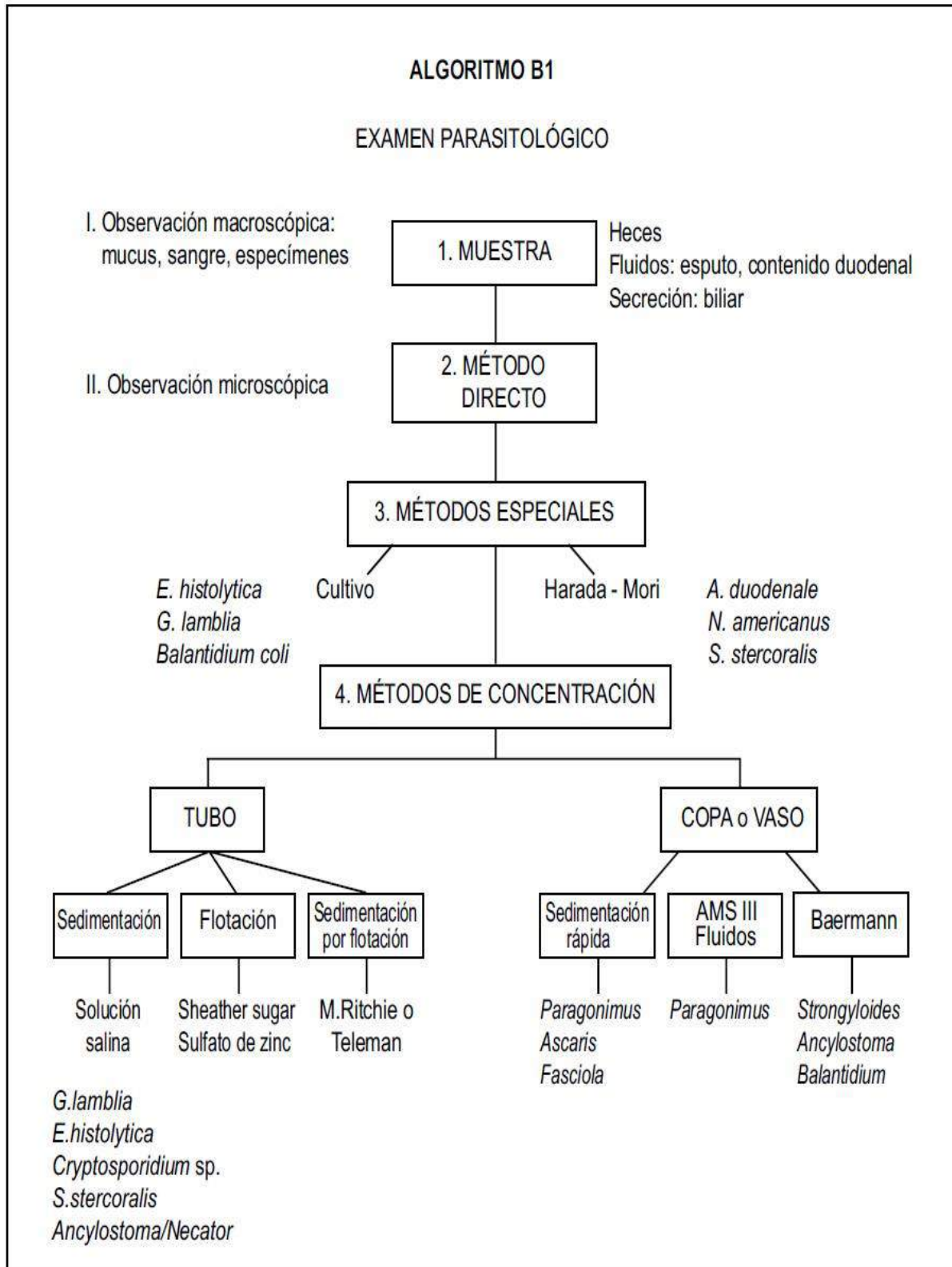
Fuente: Fotos originales

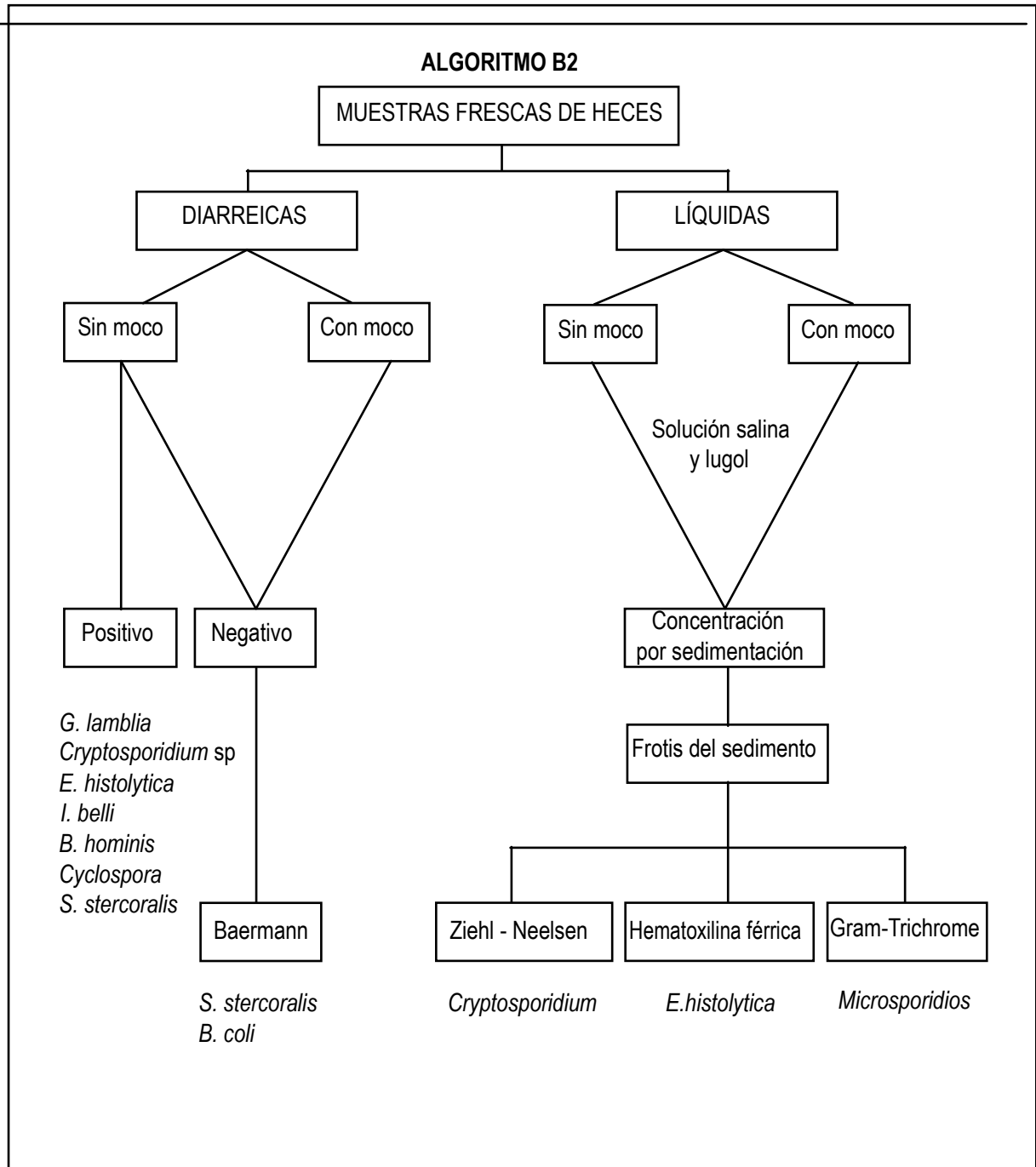
TAMAÑO RELATIVO DE HUEVOS DE HELMINTOS

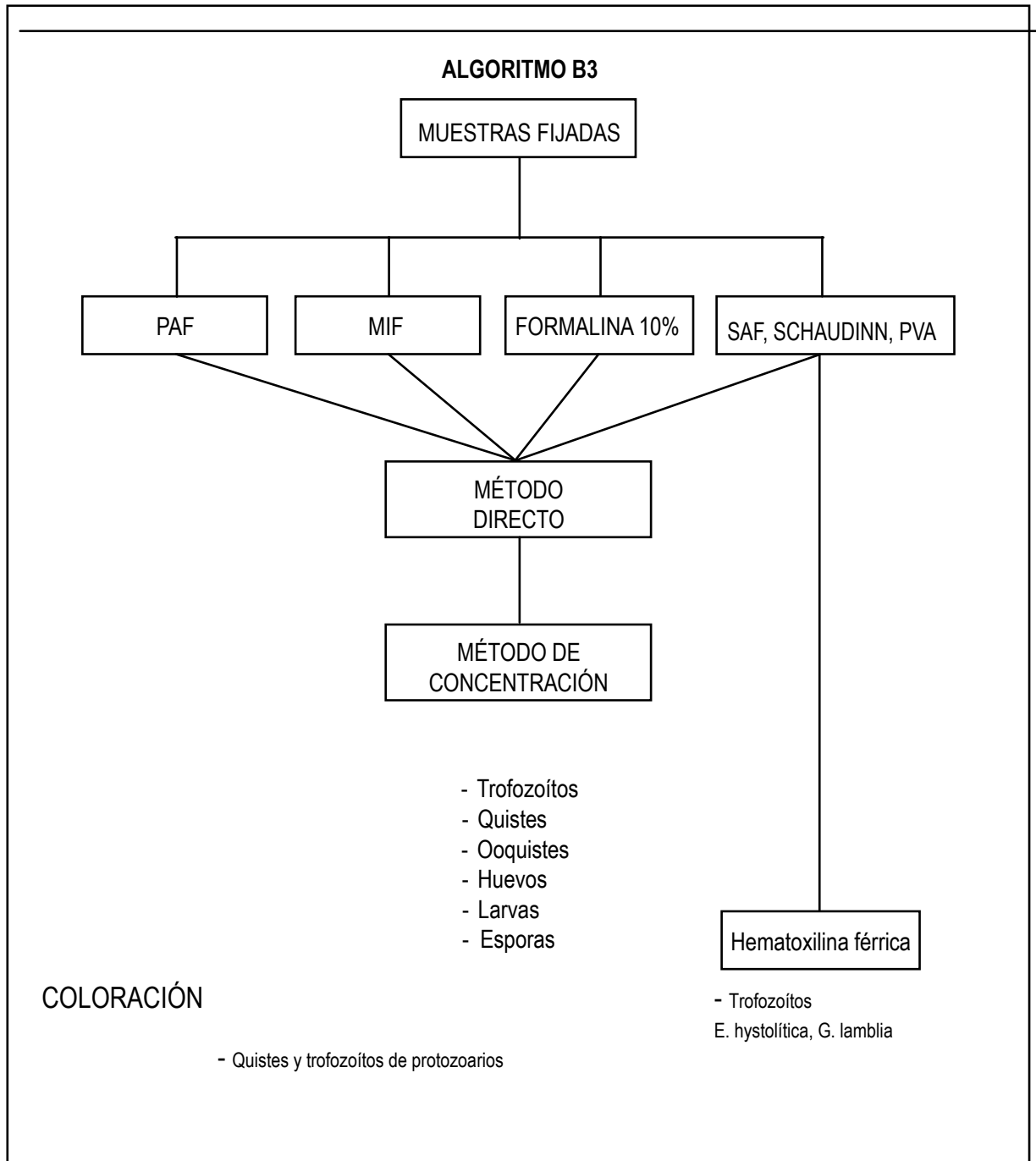


ANEXO B

ALGORITMOS PARA EL EXAMEN PARASITOLÓGICO

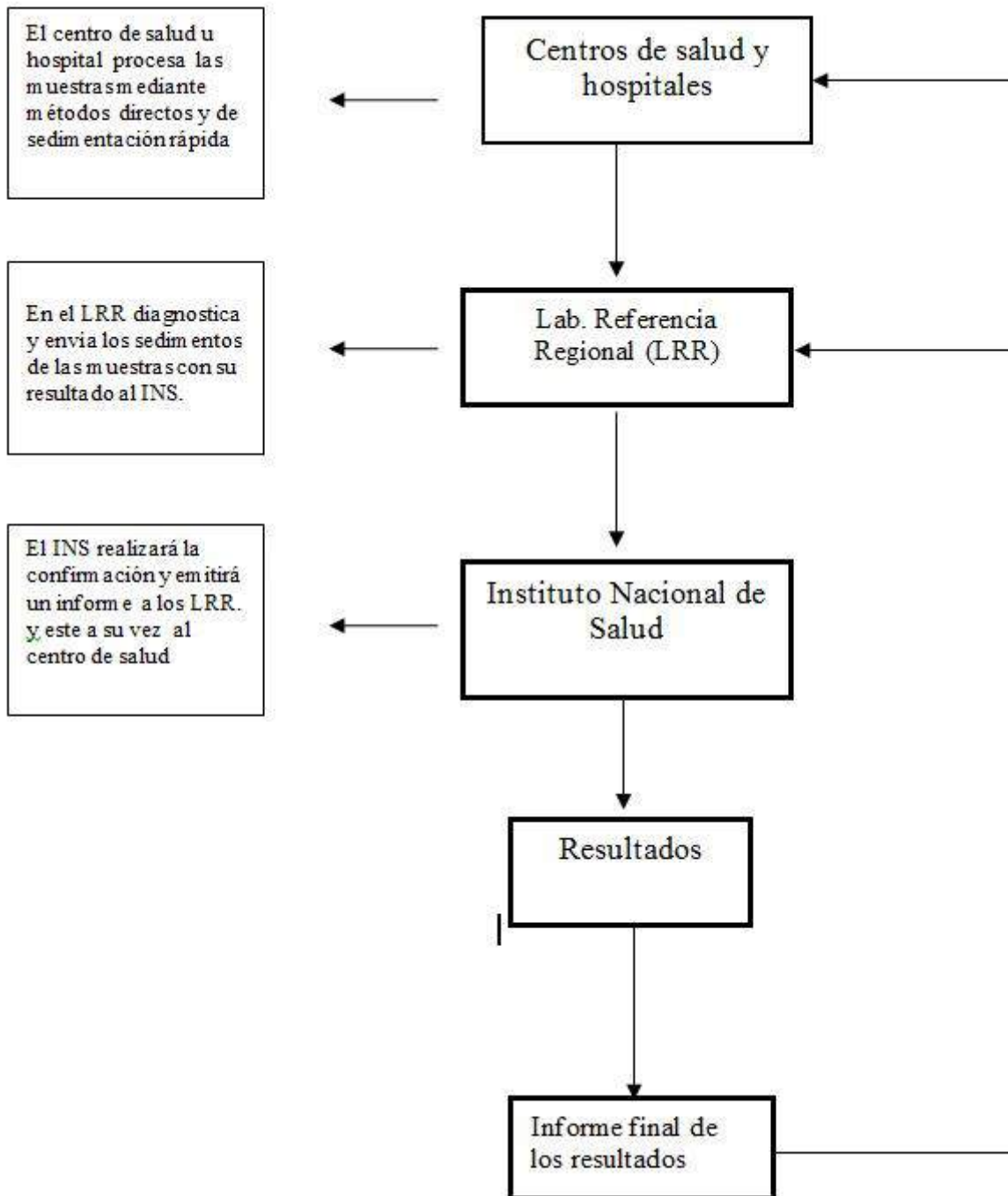






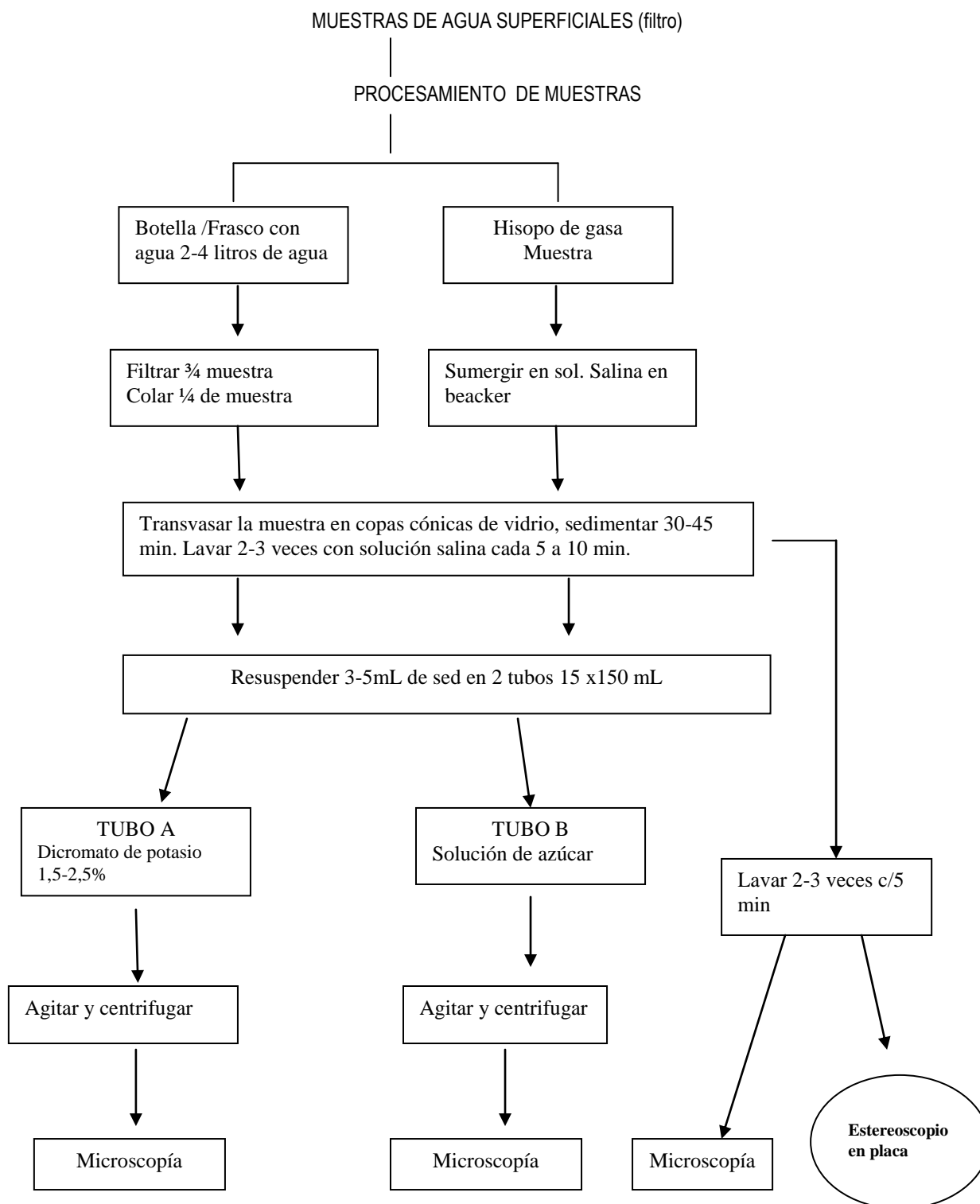
ALGORITMO B4

FLUXOGRAMA DE CONFIRMACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE LOS PARÁSITOS



ALGORITMO B5

Análisis de los parásitos en muestras de agua superficiales



Puede observar huevos, quistes, ooquistes así como huevos /larvas

ANEXO C

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y COLORANTES

C1 COLORANTES

C1.1 Para Protozoarios

C1.1.1 *Chromotrope*

Chromotrope 2R.....	0,60 g
Verde Brillante.....	0,30 g
Ácido fosfotúngstico.....	0,70 g
Ácido acético.....	1,00 mL
Agua destilada.....	100,00 mL

C1.1.2 *May Grunwald*

May Grünwald	0,24 g
Alcohol absoluto	100,00 mL

C1.1.3. *Hematoxilina férrica (solución stock)*

Hematoxilina férrica.....	5,00 g
Alcohol 95%.....	100,00 mL

Al momento de colorear, mezclar 1 mL de la solución stock con 9 mL de agua destilada.

C1.1.4. *Fucsina fenicada (Ziehl Neelsen modificado)*

Fucsina.....	4,00 g
Feno.....	8,00 g
Alcohol 95%.....	20,00 mL
Tween 80 o tergitol.....	1,00 mL
Agua destilada.....	80,00 mL

Disolver la fucsina con alcohol, mezclar con fenol y adicionar agua destilada.

C1.1.5 *Verde de malaquita para Cryptosporidium*

Verde de malaquita.....	1,00 g
Alcohol 95%.....	100,00 mL

C1.1.6 *Azul de metileno*

Azul de metileno.....	1,00-1,40 g
Agua destilada.....	100,00 mL

C1.2 Para microsporidios**C1.2.1 Coloración Gram**

1. Cristal violeta.....1%
Cristal violeta o violeta de genciana.....1,00 g
Agua destilada.....100,00 mL
2. Solución de lugol (Yodo de Gram)
Yodo.....1,00 g
Yoduro de potasio.....2,00 g
Agua destilada.....300,00 mL

Colocar 100 mL de agua y disolver yoduro de potasio en 30 mL de agua, agregar yodo y mezclar hasta que se disuelva, añadir el resto de agua y almacenar en un frasco oscuro.

C1.2.2 Chromotrope 2R

- Chromotrope 2R.....6,00 g
Verde brillante.....0,15 g
Ácido fosfotúngstico.....0,70 g
Ácido acético glacial.....3,00 g
Agua destilada.....100,00 mL

Mezclar los ingredientes cristales con ácido acético glacial, reposar por 30 minutos y agregar el agua destilada. Tamponar con ácido clorhídrico 1N pH 2,5.

C1.3 Para helmintos**C1.3.1 Carmín clorhídrico**

- Carmín.....5,00 g
Acido clorhídrico.....5,00 mL
Alcohol 95%.....200,00 mL
Agua destilada.....100,00 mL

Triturar el carmín en un mortero y añadir ácido, alcohol de 95% y agua, dejar en reposo por una hora y colocar la mezcla en baño María por una hora. En caso de evaporación, completar con alcohol de 95%, dejar enfriar y filtrar.

C1.3.2 Hematoxilina Delafield

1. Solución acuosa saturada de alumbre de amonio
Solución de alumbre de amonio.....20,00 g
Agua destilada.....100,00 mL
2. Hematoxilina.....1,00 g
Alcohol absoluto.....10,00 mL

Preparar ambas soluciones (1 y 2), añadir gota a gota la solución 1 a la solución 2, dejar madurar de 15 días a un mes, filtrar y añadir 25 mL de glicerina y 25 mL de alcohol metílico.

C1.3.3 *Rojo de Congo 1%*

Rojo de Congo.....1,00 g
Agua destilada.....100,00 mL

C1.3.4 *Tionina*

Tionina.....10,00 mg
Agua destilada.....100,00 mL

C1.3.5 *Azure A*

Azure A (O'methylene azure).....10,00 mg
Agua destilada.....80,00 mL

C1.3.6 *Verde de malaquita con solución glicerizada (método de Kato Katz)*

Glicerina comercial.....100,00 mL
Agua destilada.....100,00 mL
Verde de Malaquita 0.3%.....1,00 mL

C1.3.7 *Eosina 1%*

1. Eosina Y.....1,00 g
Agua destilada.....20,00 mL
Alcohol 95%.....80,00 mL

Disolver la eosina Y en agua destilada y adicionar el alcohol.

2. Solución colorante stock de eosina
Solución de eosina.....10,00 mL
Alcohol 80%70,00 mL

C2. COLORANTES VITALES C2.1

Para protozoarios

Rojo neutro 0,1%
Verde brillante 0,1%
Azul de cresil brillante 0,2%
Diluir en solución salina cada uno en forma separada.

C2.2 Para helmintos

Azul de cresil brillante 0,02%
Azul de metileno 0,02%
Rojo neutro0,02%
Diluir en solución salina cada uno en forma separada.

C3 FIJADORES O CONSERVADORES**C3.1 PAF o FAF**

Fenol.....	20,00 g o 23,00 mL
Suero fisiológico.....	825,00 mL
Alcohol 95%.....	125,00 mL
Formaldehído.....	50,00 mL

Mezclar los ingredientes y repartir en frascos con tapa de 10 a 20 mL.

C3.2 PVA

Alcohol polivinílico.....	5,00 gr
---------------------------	---------

Solución 1:

Ácido acético glacial.....	5,00 mL
Glicerol.....	1,50 mL
Solución Schaudinn.....	93,50 mL

Solución 2 (Solución Schaudinn):

Bicloruro de mercurio 6%.....	20,00 mL
Ácido acético glacial 5%.....	1,50 mL
Alcohol etílico 95%.....	10,00 mL

C3.3 MIF*Solución A:*

Glicerol.....	5,00 mL
Agua destilada.....	200,00 mL
Merthiolate N.º 99 Lilly 1:100.....	200,00 mL
Formaldehído.....	25,00 mL

Solución B:

Yodo.....	5,00 g
Ioduro de potasio.....	10,00 g
Agua destilada.....	100,00 mL

Agregar a cada gramo de heces 9,40 mL de solución A y 0,60 mL de solución B

C3.4 AFA

Formaldehído 37 / 40%.....	10,00 mL
Alcohol 95%.....	50,00 mL
Ácido acético glacial.....	5,00 mL
Agua destilada.....	45,00 mL

C3.5 SAF

Acetato de sodio.....	15,00 g
Ácido acético glacial.....	20,00 mL
Formol.....	40,00 mL
Agua destilada.....	925,00 mL

C3.6 Formol al 10%

1. Formaldehído (40%).....100,00 mL
Agua destilada.....900,00 mL
2. *Formalina 10%*
Formaldehído.....10,0 mL
Solución salina 0,85%.....90,00 mL
PBS 0,01 M pH 7,2

C3.7 Solución Schaudinn igual que solución 2 C 3.2

- Bicloruro de mercurio 6% o 2 vol.....20,00 mL
Alcohol 96%.o 1 vol.....10,00 mL
Ácido acético glacial 5%.....1,50 mL

C3.8 American modified service (AMS III) para muestras de secreciones o fluidos

- Solución A (Ácido clorhídrico).....3,00 mL
Agua destilada.....100,00 mL
Solución B (hidróxido de sodio).....2 o.4 ,00 g
Agua destilada.....100,00 mL

Mezclar la solución A y B v/v y agregar e mL de éter.

Podría usar también en forma separada.

C3.9 Otros fijadores para larvas de *Strongyloides*, *Ancylostoma* o *Necator***C3.9.1 Solución de picromato. Bouin**

- Solución acuosa saturada de ácido pícrico.....30,00 mL
Formaldehído (37%).....10,00 mL
Ácido acético glacial.....2,00 mL

C3.9.2 *Formaldehído*.....5,00 mL

- Ácido acético glacial.....2,00 mL
Solución salina 0,85%.....93,00 mL

C4 SOLUCIONES**C4.1 Suero fisiológico**

- Cloruro de sodio.....8,50 g
Agua destilada.....1000,00 mL

C4.2 Solución de sulfato de zinc

- Sulfato de zinc.....333,30 g
Agua destilada.....1000,00 mL

Mezclar hasta la completa dilución del sulfato de Zinc y medir la densidad de la solución, la que debe ser 1,180.

C4.3 Solución de lugol

Yodo metálico.....	1,00 g
Yoduro de potasio.....	2,00 g
Agua destilada.....	100,00 mL

Triturar juntos el yodo y yoduro en un mortero, añadir agua poco a poco y mover lentamente hasta su disolución, añadir el resto de agua y conservar en un frasco color ámbar.

C4.4 Solución de Sheather Sugar

Sacarosa o azúcar blanca.....	500,00 g
Agua destilada.....	320,00 mL
Formol (o fenol).....	10,00 mL (6,00 mL)

C4.5 Solución saturada de azúcar

Sacarosa (azúcar rubia).....	500,00 g
Agua destilada.....	500,00 mL
Formaldehído 40%	10,00 mL

C4.6 Solución mordiente

Sulfato de hierro y amonio.....	4,00 g
Agua destilada.....	100,00 mL

C4.7 Solución de salicilato de metilo**C4.8 Solución de alcohol-ácido 1 ó 3%**

Ácido clorhídrico concentrado \ etanol al 96%.....	1ml \ 99 mL o
Ácido clorhídrico concentrado \ etanol al 96%.....	3 ml \ 97 mL

C4.9 Solución de hidróxido de sodio

Hidróxido de sodio.....	4,00 g
Agua destilada.....	100,00 mL

C4.10 Tintura de yodo (solución madre)

Yodo.....	5,00 g
Yoduro de potasio.....	3,00 g o 7,00 mL
Alcohol 95%.....	20,00 mL
Agua destilada.....	7,00 mL

Diluir el yoduro de potasio en 10mL de alcohol, añadir agua a los cristales restantes.

C4.11 Buffer fosfato (PBS) 0.01 M pH 7.2

Na ₂ HP0 ₄ 12 H ₂ O.....	2,60 g
Na Na ₂ P0 ₄ H ₂ O.....	0,38 g
NaCl	8,38 g
Completar el agua a.....	1000,00 mL

C4.12 Solución para aclarar helmintos*C4.12.1 Lactofenol de Aman*

Ácido félico (qp).....	1,00 g
Ácido láctico.....	1,00 mL
Glicerina.....	2,00 mL
Agua destilada.....	1,00 mL

C4.12.2 Aclarantes: xilol, tergitol, salicilato de metilo
Elegido el aclarante, diluirlo v/v en alcohol absoluto 10-15 min, montar.

C.4.12.3 Aclarante para nemátodos
Fenol 1 vol
Alcohol 50 o 70% 1 vol
Si los especímenes están en alcohol, caso contrario requiere más de 15 min.

C4.13 Solución decolorante (coloración tricrómica)

Ácido acético glacial al 1%.....	1,00 mL
Alcohol 90%.....	99,00 mL

C4.14 Soluciones desinfectantes*C4.14.1 Solución sulfocrómica*

Bicromato de potasio.....	100,00 g
Ácido sulfúrico.....	100,00 mL
Agua destilada.....	1000,00 mL

Disolver el bicromato de potasio en agua destilada sobre un recipiente conteniendo agua de caño para enfriar, añadir el ácido poco a poco y agitar continuamente. **Nunca añadir agua al ácido.**

C4.14.2 Hipoclorito de sodio

Cojín de lejía.....	1,00 unidad
Agua.....	1000,00 mL

C4.14.3 Fenol 3-5% (diluido en agua)

Fenol.....	3,00 o 5,00 g
Agua.....	100 mL

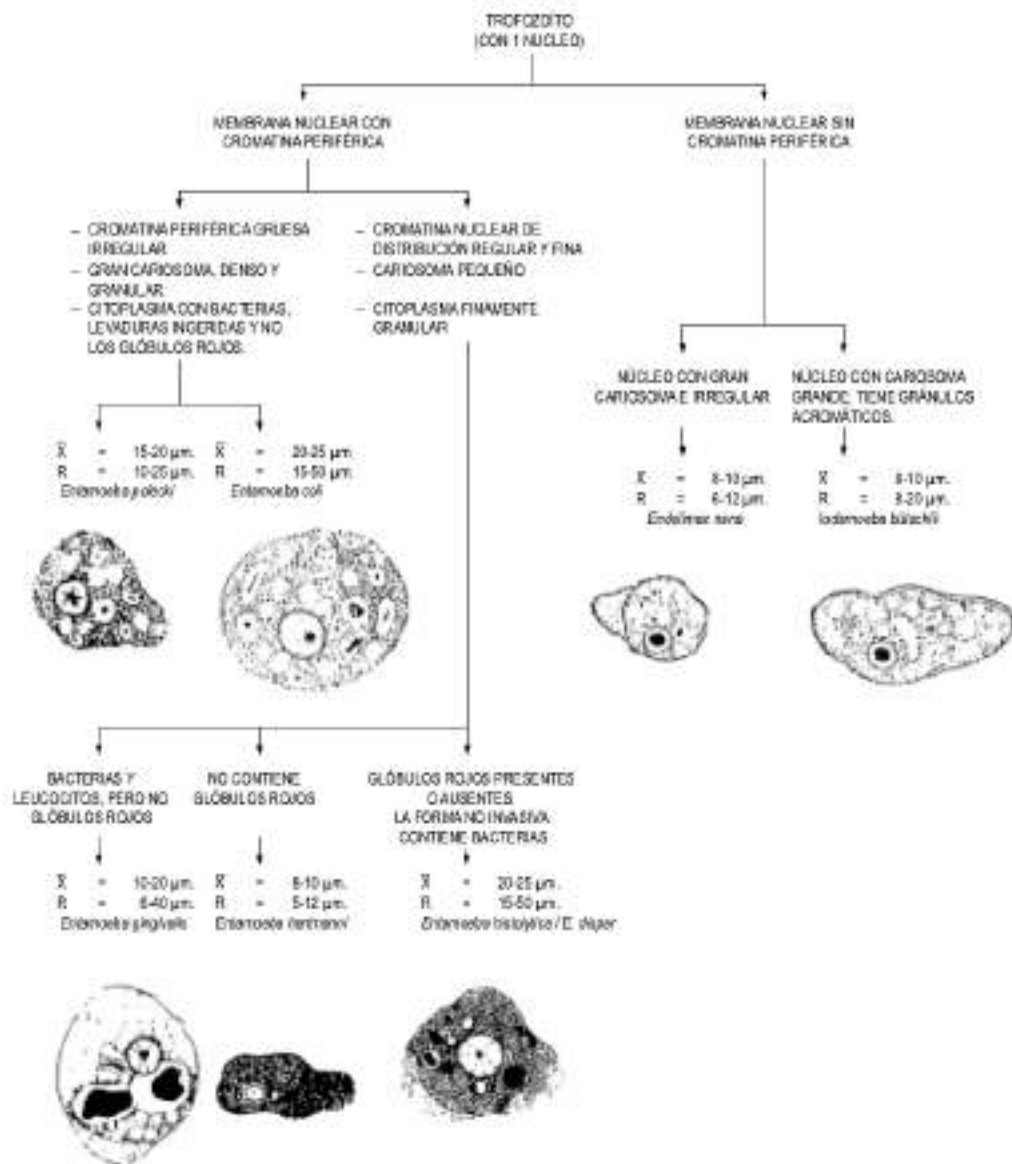
C5. MEDICAMENTOS O PRODUCTOS QUE NO DEBEN INGERIRSE PREVIO AL EXAMEN PARASITOLÓGICO

- C5.1 Antibióticos.
- C5.2 Sulfas.
- C5.3 Sales de bario (sustancias radioactivas).
- C5.4 Sal de bismuto.
- C5.5 Kaolín, pectina o kaopectate.
- C5.6 Laxantes.

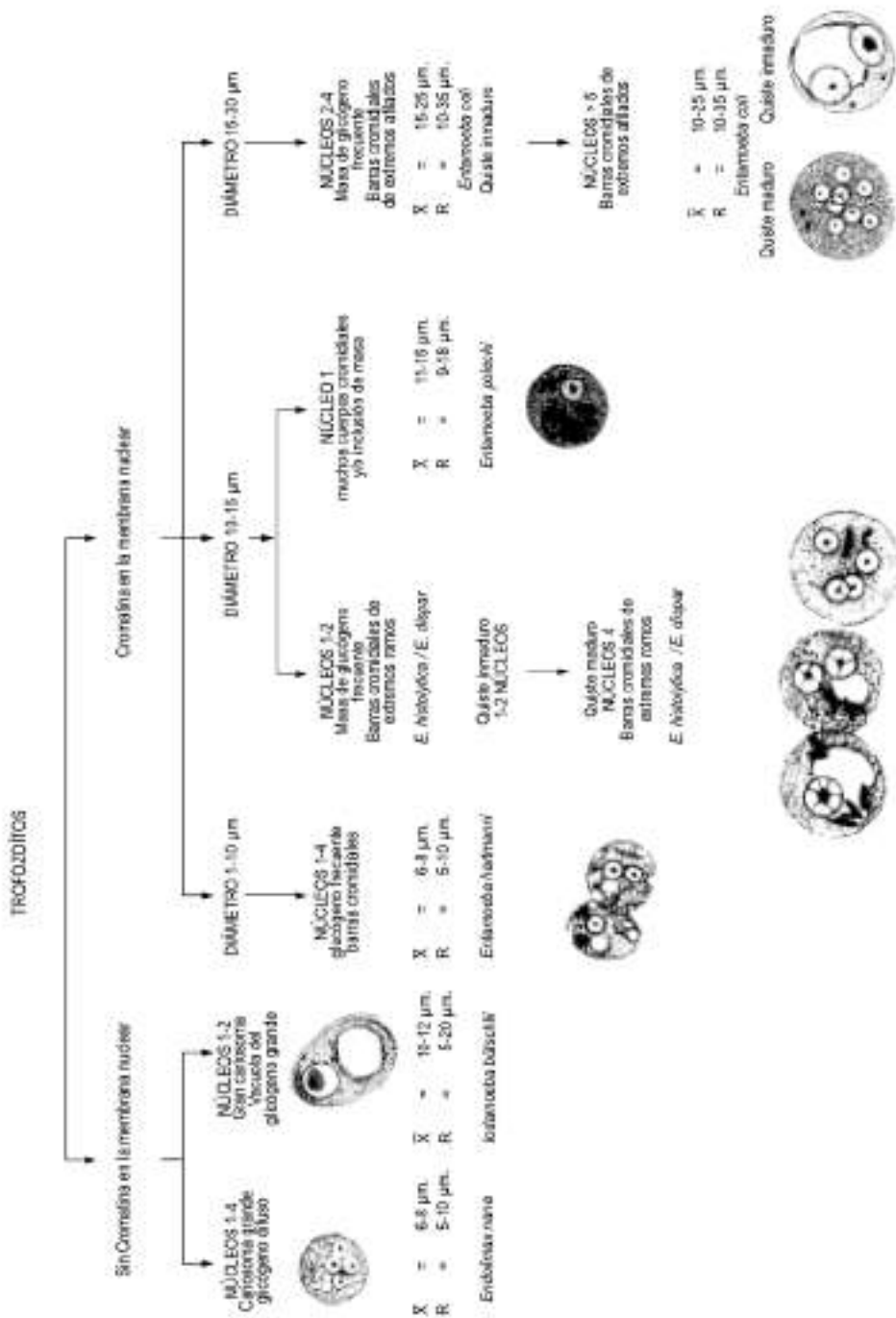
ANEXO D

CLAVE DE IDENTIFICACIÓN DE LOS PROTOZOARIOS (AMEBAS, FLAGELADOS) Y HELMINTOS

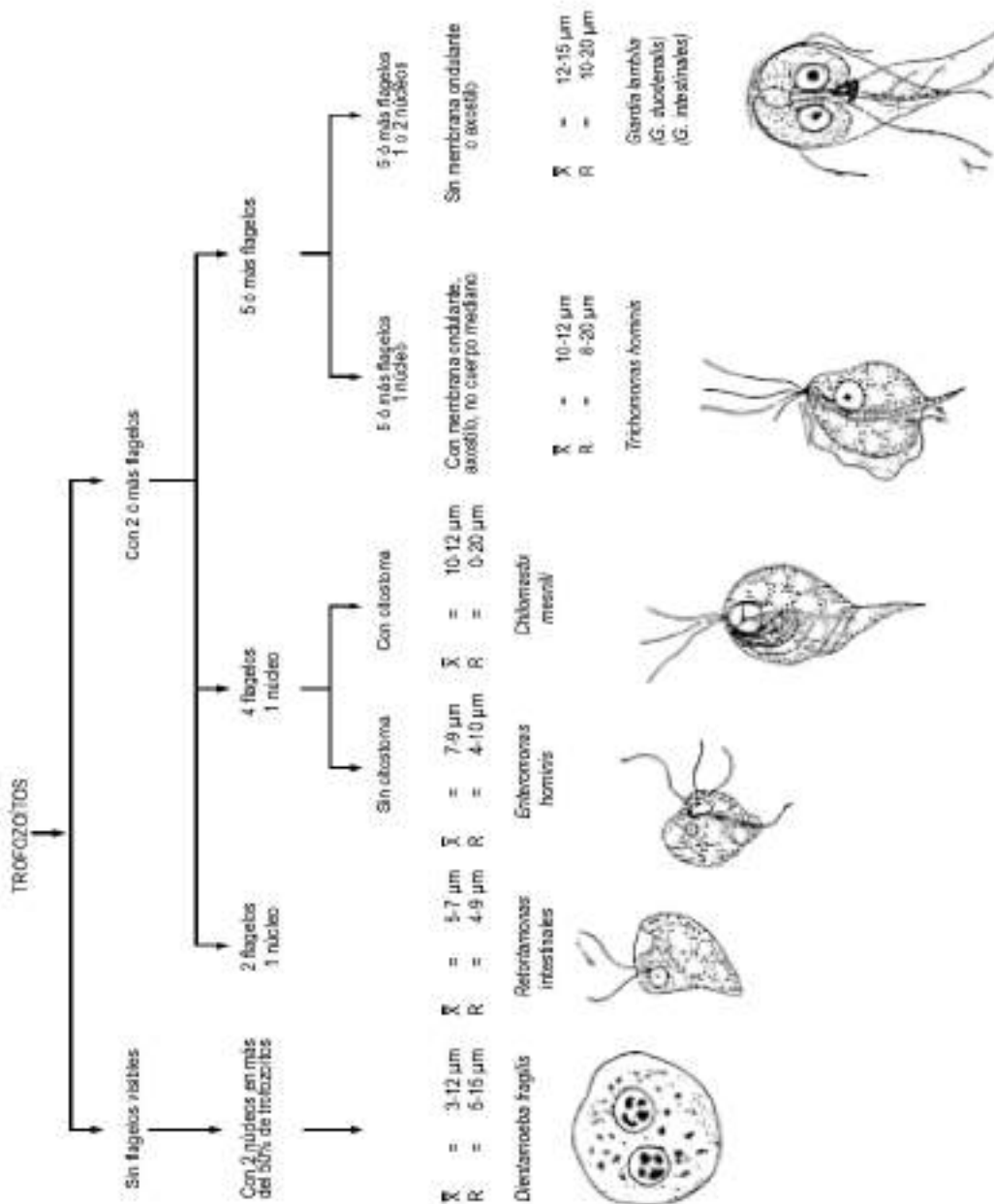
D1. CLAVE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AMEBAS (EXAMEN EN FRESCO O TINCIÓN)



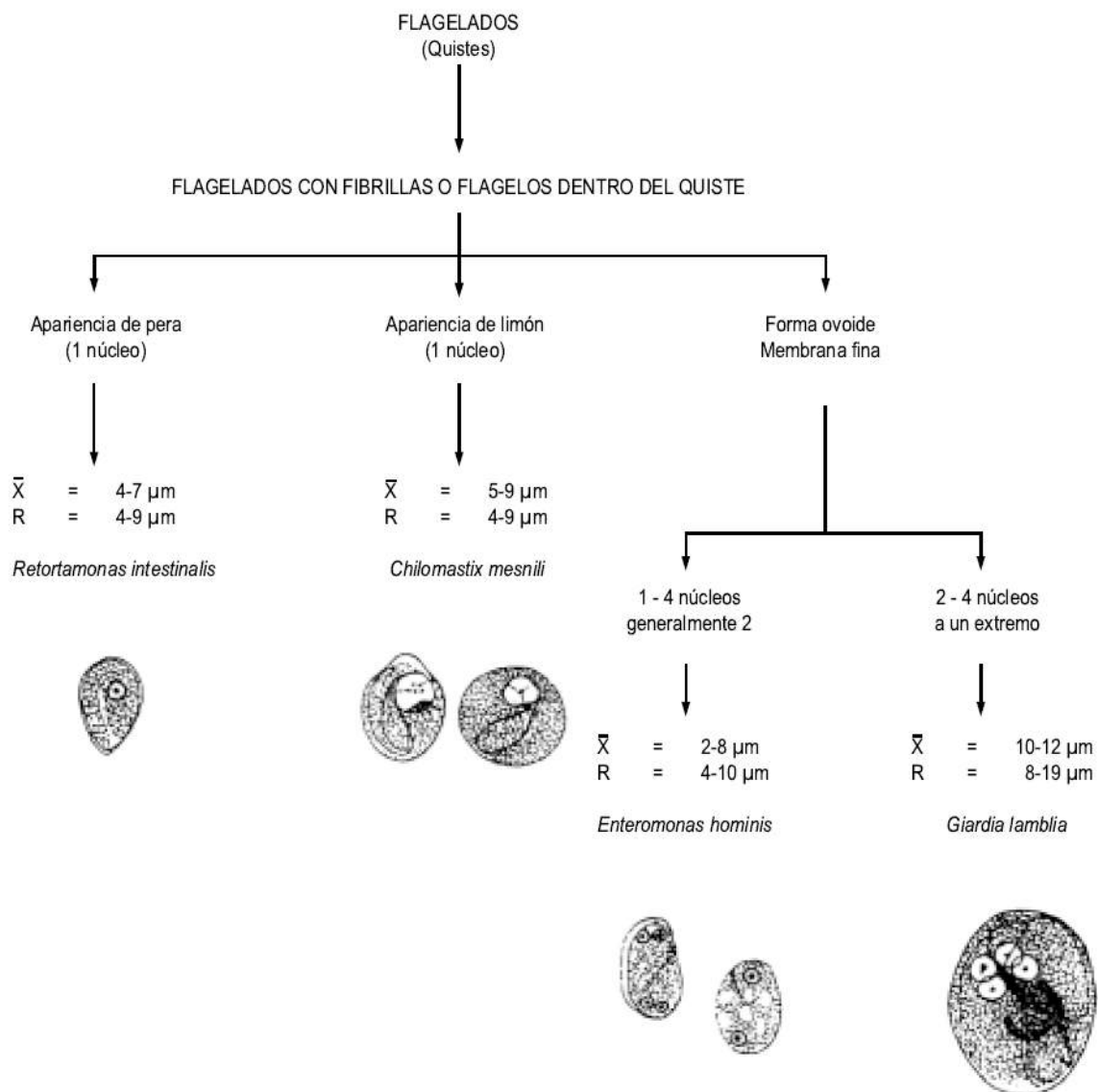
D2. CLAVE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE QUISTES DE AMEBAS (EXAMEN EN FRESCO Y CON TINCIÓN)



**D3. CLAVE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FLAGELADOS INTESTINALES
(EXAMEN EN FRESCO Y CON TINCIÓN)**



**D4. CLAVE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE QUISTES DE FLAGELADOS INTESTINALES
(EXAMEN EN FRESCO Y CON TINCIÓN)**



D5. CLAVE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HUEVOS DE HELMINTOS

- a. Huevo no operculado, esférico, con 6 ganchos, embrionados b
 Huevo semejante al de e
- b. Huevos separados c
 Huevos en paquetes 12 o más *Dipylidium caninum*
- c. Huevo de membrana gruesa con radiaciones conteniendo embrión con ganchos *Taenia* spp
 Huevo de membrana fina, separado del embrióforo por una matriz gelatinosa d
- d. Filamentos ocupa el espacio entre el embrióforo y la membrana externa *Hymenolepis nana*
 Sin filamentos entre el embrióforo y la membrana externa *H. diminuta*
- e. Huevo operculado f
 Huevo no operculado j
- f. Huevo < 35mm *Clonorchis, Opistorchis, Heterophyes, Metagonimus*
 Huevo > 38mm g
- g. Huevo 38-45 mm *Dicrocoelium*
 Huevo > 60mm h
- h. Huevo con opérculo sobresaliente *Paragonimus*
 Huevo sin opérculo sobresaliente i
- i. Huevo > 85 mm *Fasciola, Fasciolopsis, Echinostoma*
 Huevo < 75 mm *Diphyllobothrium*
- j. Huevo > 75 con espina k
 Huevo < 75 sin espina m
- k. Espina terminal *Schistosoma haematobium*
 Espina postterminal l
- l. Espina lateral inconspicua o ausente *S. japonicum*
 Espina lateral prominente *S. mansoni*
- m. Huevo con gruesa membrana y mamelonada *A. lumbricoides*
 Huevo sin la membrana mamelonada n
- n. Huevo con apariencia de barril con dos tapones operculares o
 Huevo sin la apariencia de barril, sin opérculos p
- o. Membrana no estriada *Trichuris trichiura*
 Membrana frecuentemente estriada *Capillaria* sp
- p. Huevo plano en un lado *Enterobius vermicularis*
 Huevo simétrico q
- q. Huevo grande con aire en extremos *Heterodera, Meloidogyne*
 Huevo sin glóbulos polares (aire) r
- r. Huevo con blastómeros, de extremos redondeados 56-76 μ m *Ancylostoma* o *Necator*
 Huevo con numerosos blastómeros, un extremo más o menos afilado
 de 73-95 μ m *Trichostrongylus* sp

D6. CLAVE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE LARVAS INFECTANTES DESARROLLADAS A PARTIR DE MATERIA FECAL HUMANA

- 1.a Esófago casi igual a la longitud total del cuerpo. Cuerpo corto y delgado, mide cerca de 0,5 mm de longitud, cola de extremo romo y a veces bifurcado *Strongyloides stercoralis*
- 1.b Esófago cerca de la longitud total del cuerpo, más grande o más extendido 2
- 2.a El cuerpo más grande entre las 4 especies, cerca de 0,75 mm, la luz intestinal no es recta, sino en zig-zag; extremo de la cola (no de la envoltura) redondeado y como una perilla *Trichostrongylus orientalis*
- 2.b Cuerpo más corto y luz intestinal recta, cola con extremos afilados 3
- 3.a Cuerpo corto y extendido, en forma de huso; mide cerca de 0,59 mm y la envoltura cerca de 0,66 mm de longitud, cabeza redondeada, los estiletes de igual grosor y más apreciable, la porción anterior del intestino más o menos tan ancha como el bulbo esofágico, el primordio genital situado por delante de la mitad del intestino, la terminación de la cola forma un ángulo más ancho con extremo afilado; envoltura claramente estriada *N. americanus*
- 3.b Cuerpo largo y delgado, más o menos de forma cilíndrica mide cerca de 660 μ m y la envoltura cerca de 720 μ m de longitud, cabeza aplanada, estiletes de desigual grosor y poco apreciables, intestino de menor diámetro que el esófago, el primordio genital situado detrás de la porción media del intestino, extremo terminal de la cola estrecho y alargado, con punta menos redondeada, la envoltura no tan claramente estriada *A. duodenale*

ANEXO E

ELEMENTOS QUE SE PUEDEN CONFUNDIR CON LOS PARÁSITOS INTESTINALES

En el examen microscópico, además de encontrarse formas parasitarias en los fluidos, secreciones o material fecal, se pueden encontrar elementos no parasitarios que pueden confundirse con parásitos.

E1. ELEMENTOS O CÉLULAS HUMANAS

E1.1 Macrófagos

Los macrófagos son células grandes, mononucleares y fagocíticas, que se parecen a trofozoítos de *E. histolytica*. Se deben considerar las siguientes diferencias:

<i>Entamoeba histolytica</i>	Macrófago
a. Tamaño: 12 – 60 μm (\bar{X} = 20 μm)	30 – 60 μm
b. Radio del material nuclear en relación al citoplasma 1:10 – 1:12	1:4 – 1:6
c. Núcleo redondeado con cariosoma central y cromatina periférica	Núcleo grande, puede ser irregular
d. Puede tener glóbulos rojos, no fibras ni polimorfonucleares (PMNS)	Tiene fibras, PMNS y glóbulos rojos.
e. Núcleo casi siempre presente	Contiene cuerpos redondeados, núcleo no puede observarse
f. Con trichrome se colorea el citoplasma y el núcleo (oscuro)	Semejante a <i>E. histolytica</i>

E1.2. Neutrófilos polimorfonucleares (PMNS)

Generalmente son encontrados en casos de disentería bacteriana o amebiosis. Sus diferencias son:

<i>Entamoeba histolytica</i>	Macrófago
a. Tamaño: 20 μm (12 – 50)	(\bar{X} = 14 μm)
b. Radio del material nuclear en relación al citoplasma 1:10 – 1:12 (trofozoíto) y 1:3 (quiste)	1:1
c. Núcleo redondeado con cariosoma central y cromatina periférica	Núcleos 2-4, conectados por una banda cromática
d. Citoplasma granular uniforme, puede tener glóbulos rojos	Citoplasma granular

E1.3 Eosinófilos

Estas células, generalmente redondeadas, tienen un diámetro similar al de los PMNS, y se caracterizan en las tinciones por la presencia de grandes gránulos rojo púrpura, además que suelen presentar su núcleo segmentado (1-2).

E1.4 Cristales de Charcot-Leyden

Son cristales alargados con extremos en punta, que con coloración tricrómica se tiñen de rojo púrpura. Ellos son producto de los eosinófilos destruidos en la mucosa intestinal, son frecuentes de observarse en láminas que contienen *Entamoeba histolytica*. También suelen encontrarse en muestras de esputo, como consecuencia de la destrucción de los eosinófilos en la mucosa pulmonar.

E1.5 Glóbulos rojos

Los glóbulos rojos tienen un diámetro de 7,5 μm . Su presencia en las heces puede indicar ulceración en el tracto intestinal u otro problema hemorrágico.

E1.6 Células epiteliales

Las células epiteliales o células escamosas pueden estar presentes en las heces, más aun si la muestra se obtiene por sigmoidoscopia. El tamaño de estas células es semejante al de las amebas, la coloración es verde pálido con apariencia uniforme no granular cuando se les colorea con Trichome- Gomori.

E2. ELEMENTOS VEGETALES O ANIMALES

E2.1 Levaduras

Células ovoides de 4 a 6 μm y que pueden encontrarse en forma de levaduras o hifas.

E2.2 Pelos o tricomas

Los pelos de las hojas o raíces podrían confundirse con larvas de nemátodes (Figura E1).

E2.3 Célula vegetal

Puede observarse en forma no digerida (Figuras E2-E4).

E2.4 Fibra muscular no digerida

Se reconoce por las estrías (Figuras E5 y E6).

E2.5 Célula coloidal o de grasa

Se tiñen con yodo, pudiendo confundirse con huevos (Figura E7 y E8).

Existen otras estructuras que pueden parecerse a larvas o huevos de helmintos y que son convenientes tenerlas en cuenta (Figuras E9-E14)

ESTRUCTURAS SEMEJANTES A LOS PARÁSITOS



Figura E1. Pelos de vegetales semejantes a larvas. Coloración lugol



Figura E2. Parénquima de célula vegetal no Digerida, en solución de lugol



Figura E3. Vaso espiralado (solución salina)



Figura E4. Célula vegetal de vainas, más o menos homogénea, en solución de lugol

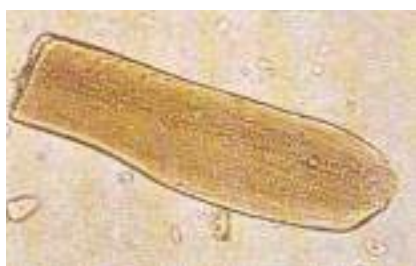


Figura E5. Fibra vegetal no digerida. Con solución de lugol



Figura E6. Fibra muscular estriada con yodo (lugol)



Figura E7. Gránulo, con yodo, deformado al calor del microscopio. Coloración lugol

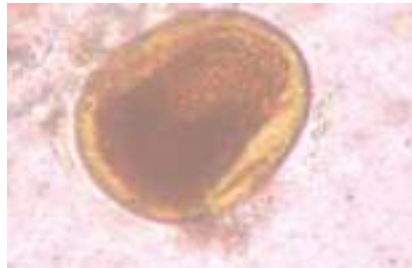


Figura E8. Material vegetal semejante a *Toxocara*. Coloración lugol

Fuente: Spencer FM, Monroe LS. The Color Atlas of Intestinal Parasites; 1961, original E8.

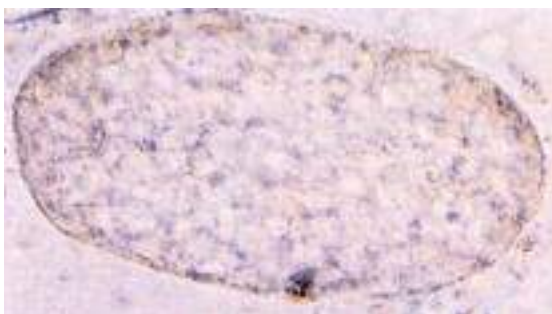


Figura E9. Material semejante a *Fasciola hepática*, pero sin opérculos. Coloración lugol



Figura E10. Material semejante a céstodes y estructuras larvianas. Coloración lugol



Figura E11. Material vegetal semejante a cápsula ovígera



Figura E12. Restos vegetales, filamento y grano de polen. Coloración lugol



Figura E13. Material vegetal semejante a *Paragonimus*, marrón oscuro. Coloración lugol



Figura E14. Material semejante a *Metagonimus*, marrón oscuro. Coloración lugol



Figura E15. Material vegetal en forma de vainas
Solución salina

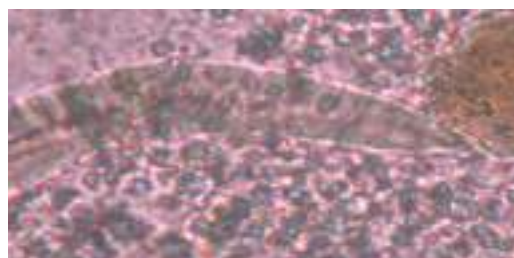


Figura E16. Pelo vegetal semejante a larva.
Coloración lugol

Fuente: Suzuki N. Color Atlas of Human Helminth Eggs; 1968. y fotos originales E11, E12, E15 y E16.

ANEXO F

REGISTRO DE LOS PARÁSITOS INTESTINALES EN EL LABORATORIO POR MES POR AÑO

FICHA 1

Título: Registro de los parásitos intestinales en el laboratorio por mes por año.
La identificación del establecimiento y el año correspondiente se escribe en la parte superior.

La ficha consta de dos partes:

Primera parte

Contiene: iniciales de los meses del año, total anual, número de muestras examinadas, número de paciente, número de casos positivos y número de casos negativos, con sus respectivos porcentajes.

Segunda parte

Contiene: clasificación internacional (CI) de los agentes responsables de las enfermedades parasitarias, nombre del agente, registro por mes y por año.

FICHA 2

Título: Registro de los parásitos intestinales en el laboratorio por mes por año.
La identificación del establecimiento y el año correspondiente se escribe en la parte superior.

La ficha consta de tres partes: los grupos de parásitos, la asociación parasitaria y los grupos etarios.

Primera parte

Contiene: grupo de parásitos por mes del año, número de muestras positivas o número de casos positivos según pertenezcan a los siguientes grupos: protozoarios, helmintos y protozoarios-helmintos.

Segunda parte

Contiene: monoparasitismo y multiparasitismo o la asociación parasitaria.

Tercera parte

Contiene: distribución según grupos etarios de toda la población en estudio. Podría considerarse incluso por sexo.

INSTITUTO NACIONAL SALUD
CENTRO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
LABORATORIO REFERENCIAL DE ENTEROPARÁSITOS

FICHA 1

REGISTRO Y CONTROL MENSUAL DE LOS PARÁSITOS
AÑO.....

	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SET	OCT	NOV	DIC
N° MUESTRAS												
N° PACIENTES												
N° POSITIVOS (+)												
%												
N° NEGATIVOS (-)												
%												

CI AGENTES:

06,1	<i>E. histolytica</i> <i>B. hominis</i> <i>E.coli</i>											
07,0	<i>Balantidium coli</i>											
07,1	<i>Giardia lamblia</i>											
07,3	<i>Trichomonas hominis</i> <i>Lophomonas sp</i>											
07,6	<i>Cryptosporidium sp</i>											
07,8	<i>Cyclospora</i>											
07.2	<i>Isospora belli</i>											
07,9	<i>Ch. mesnili</i>											
121,1	<i>Clonorchis sp</i>											
121,2	<i>Paragonimus sp *</i>											
121,3	<i>F. hepatica **</i>											
123.0	<i>T. solium (intestinal)</i>											
123.0	<i>Taenia sp</i>											
123,4	<i>D.pacificum</i>											
123.6	<i>Hymenolepis nana</i>											
123.6	<i>H.diminuta</i>											
123.8	<i>D.caninum</i>											
126	<i>Ancylostoma/Necator</i>											
126,0	<i>A. duodenale</i>											
126.1	<i>Necator americanus</i>											
127,0	<i>A. lumbricoides</i>											
127,2	<i>S.stercoralis</i>											
127,3	<i>T.trichiura</i>											
127,4	<i>E.vermicularis</i>											
127,5	<i>Capillaria sp</i>											
127.5	<i>Capillaria philippinensis</i>											
127.6	<i>Trichostrongylus sp</i> <i>Rhabditis sp</i> <i>Meloidogyne sp</i> <i>Macracanthorhynchus</i>											

* Se localiza en el pulmón.

** Se localiza en el hígado.

CI = clasificación internacional.

INSTITUTO NACIONAL SALUD
CENTRO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
LABORATORIO REFERENCIAL DE ENTEROPARÁSITOS

FICHA 2

REGISTRO Y CONTROL DE MENSUAL DE LOS PARÁSITOS
AÑO.....

Establecimiento _____		Responsable _____												
Grupo / Parásito / Mes		ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SET	OCT	NOV	DIC	TOTAL
Protozoarios	Nº													
	%													
Helmintos	Nº													
	%													
Protozoarios/Helmintos	Nº													
	%													
TOTAL	Nº													
	%													
Monoparasitismo														
Biparasitismo														
Triparasitismo														
Tetraparasitismo														
Pentaparasitismo														
Hexaparasitismo														
Heptaparasitismo														
Octaparasitismo														

POR GRUPO ETARIO

0,2 - 04,9 años														
5,0 - 09,9 años														
10,0 - 14,9 años														
15,0 - 19,9 años														
20,0 - 24,9 años														
25,0 - 29,9 años														
30,0 - 34,9 años														
35,0 - 39,9 años														
40,0 - 44,9 años														
45,0 - 49,9 años														
50,0 - 54,9 años														
55,0 - 59,9 años														
≥ 60 años														

El grupo etario puede agruparse de acuerdo a la población en estudio

ANEXO G

FICHA PARA EL ESTUDIO DEL CULTIVO DE *Entamoeba histolytica* (cepa)

Paciente..... Edad..... Sexo N.º.....
 Institución..... Dirección..... Dpto.....
 Muestra: heces () aspirado..... () tejido () Otro.....
 Lugar y fecha.....

AGENTES	FECHA	FECHA	FECHA		AGENTES	FECHA	FECHA	FECHA
<i>E. histolytica</i>					<i>D. fragilis</i>			
<i>B. hominis</i>					<i>G. lamblia</i>			
<i>E. dispar</i>					<i>Ch. mesnili</i>			
<i>E. coli</i>					<i>B. coli</i>			
<i>E. nana</i>					<i>E. hominis</i>			
<i>E. moshkowski</i>					<i>T. hominis</i>			
<i>I. bütschlii</i>					<i>R. intestinalis</i>			

CULTIVO: aislamiento primario: fecha..... medio..... °C..... especies.....

SUBCULTIVO

AISLAMIENTO

Fecha..... Medio..... °C.... Especies.....

Fecha..... Medio..... °C.... Especies.....

Fecha..... Medio..... °C.... Especies.....

Fecha..... Medio..... °C.... Especies.....

N.º Medio.....

Dilución	25° C					37° C				
	1	2	4	16	64	1	2	4	16	64
Fecha										
Fecha										
Fecha										
Fecha										
Fecha										
Fecha										
Fecha										

Observaciones.....

Responsable.....

ANEXO H**PARÁSITOS NO INTESTINALES: *Paragonimus* y *Fasciola*
(DISTOMATOSIS PULMONAR Y HEPÁTICA)****H.1 MUESTRA DE ESPUTO O SECRECIÓN BILIAR Y MUESTRA FECAL****H.1.1 Fundamento**

Se basa en la detección de huevos de *Paragonimus* y *Fasciola* en las muestras de esputo, secreción biliar y heces, según la especie del parásito, mediante la observación directa al microscopio o por la concentración de estos por sedimentación.

H.1.2 Materiales

H.1.2.1 Láminas portaobjetos.

H.1.2.2 Tubos 15 x 150 mm.

H.1.2.3 Pipetas de transferencia.

H.1.2.4 Vaso o copa cónica.

H.1.2.5 Placa Petri.

H.1.2.6 Solución de hidróxido de sodio 2 al 4%.

H.1.2.7 Agua destilada.

H.1.2.8 Aplicadores o 1/3 de bajalenguas.

H.1.3 Obtención de la muestra**H.1.3.1 *Muestra de esputo***

a. La muestra se obtiene del paciente con tos persistente.

b. Colectar la muestra en un frasco de boca ancha después de un esfuerzo de tos (4 a 8 mL, aproximadamente). Se prefiere la expectoración de 24 horas.

H.1.3.2 *Muestra de heces*

Colectar la muestra en un frasco de boca ancha (3 a 8 g aproximadamente).

H.1.3.3 *Muestra de secreción biliar*

Colectar la muestra en un frasco o tubo limpio.

H.1.4 **Conservación de la muestra**

H.1.4.1 La muestra se conserva en un lugar con poca iluminación hasta el momento de efectuar el examen parasitológico.

H.1.4.2 Si no es posible realizar el examen inmediatamente o va a demorar más de dos días en llegar al laboratorio, agregar el líquido fijador conservador PAF o formalina al 10% en proporción 1:2 ó 1:3.

H.1.5 **Procedimiento**

H.1.5.1 *Método directo*

Tratar las muestras de heces o de esputo según lo descrito en las secciones 3 y 5. La observación al microscopio se realizará primero a menor aumento (10X) y luego a 40X.

H.1.5.2 *Método de concentración*

a. *Muestra de esputo o secreción biliar*

- Agregar una solución de hidróxido de sodio 2% al frasco que contiene la muestra y homogenizar.
- Pasar a través de una gasa a un tubo de ensayo de 15 x 150 mm o tubo cónico de 50 mL, centrifugar durante 10 min a 2000 r.p.m. o dejar reposar de 1 a 2 h si no se cuenta con centrífuga.
- Eliminar el sobrenadante y adicionar hidróxido de sodio 2%, dejar en reposo de 90 a 120 minutos.
- Obtener el sedimento con ayuda de una pipeta, colocarlo en una lámina y observar al microscopio.

b. *Muestra de heces*

Realizar el procedimiento según al ítem 5.3.

H.1.6 **Observación**

H.1.6.1 Observar huevos operculados, de color marrón oscuro, tanto de *Paragonimus peruvianus* (= *Paragonimus mexicanus*) como de *Fasciola hepatica*, siendo estos últimos de mayor tamaño y *Paramphistomum* sp son incoloros..

H.1.6.2 En caso que tuviera problemas con el diagnóstico, enviar la muestra al Laboratorio de Enteroparásitos del Centro Nacional de Salud Pública – Instituto Nacional de Salud para su confirmación.

ANEXO I

MICROMETRÍA

El tamaño de los parásitos es muy importante como parte de la identificación de sus formas evolutivas, la micrometría es el método que se usa para la medición de los parásitos microscópicos y hace uso de un **ocular micrométrico** y una **lámina patrón**.

El ocular micrométrico, es una luna circular marcada con una línea con divisiones de 50 a 100 unidades, con que se mide a los parásitos, estas divisiones tendrán valores diferentes dependiendo de los objetivos a utilizar.

La lámina patrón es una lámina de vidrio del tamaño de una lámina portaobjetos, que en su parte central tiene grabada una línea con escala conocida en divisiones de 0,1 a 0,01 mm y servirá para dar valor a cada unidad del ocular micrométrico según el objetivo a utilizar, por lo que es necesario calcular los valores de unidades del ocular micrométrico con cada objetivo.

Calibración del microscopio usando un ocular micrométrico

Procedimiento de calibración

1. Colocar el ocular micrométrico en el ocular del microscopio
2. Sobre la superficie de la mesa de platino del microscopio colocar la lámina patrón, hacer coincidir ambas numeraciones (ocular micrométrico y la lámina patrón) primero a menor aumento (10x) y luego a mayor aumento, (40x y 100x).
3. Enfocar el microscopio para poder ver las líneas de la lámina patrón.
4. Hacer coincidir la línea 0 del ocular micrométrico y de la lámina patrón (figura 30).
5. Cuando estas dos líneas coinciden, determinar cuantas líneas están coincidiendo entre sí, tratando de encontrarlas lo más alejado hacia la derecha (varía según el objetivo utilizado).
6. Contar el número de divisiones en la línea del ocular que hay entre 0 y las líneas coincidentes, de la lámina patrón y las divisiones de 0,1 mm que hay entre el 0 y las líneas coincidentes a la derecha.
7. Calcular la porción del ocular micrométrico, como en la figura 30 y el número de milímetros.

Ejemplo: Unidades del ocular micrométrico 33 igual a 0,22

$$1 \text{ unidad del ocular} = \frac{0,22 \text{ mm lámina patrón}}{33 \text{ ocular micrométrico}} = 0,066 \text{ mm}$$

$$= 0,0066 \text{ mm} \times 1000 / 1,000 \text{ mm} = 6,6 \text{ um del aumento calibrado}$$

Resulta una unidad de ocular micrométrico es equivalente a 6,6 um

8. Cuando ya ha sido calibrado cada objetivo no se pueden cambiar ni el ocular ni los objetivos, ni intercambiar con otros oculares u objetivos. Se debe calibrar de nuevo.

Puede preparar su tabla de calibración para cada microscopio:

Medición (unidades)	Objetivos		
	10X	40X	100X
1	6,6	2,4	1
2	13,2	4,8	2
3	19,8	7,2	3
4	26,4	9,6	4

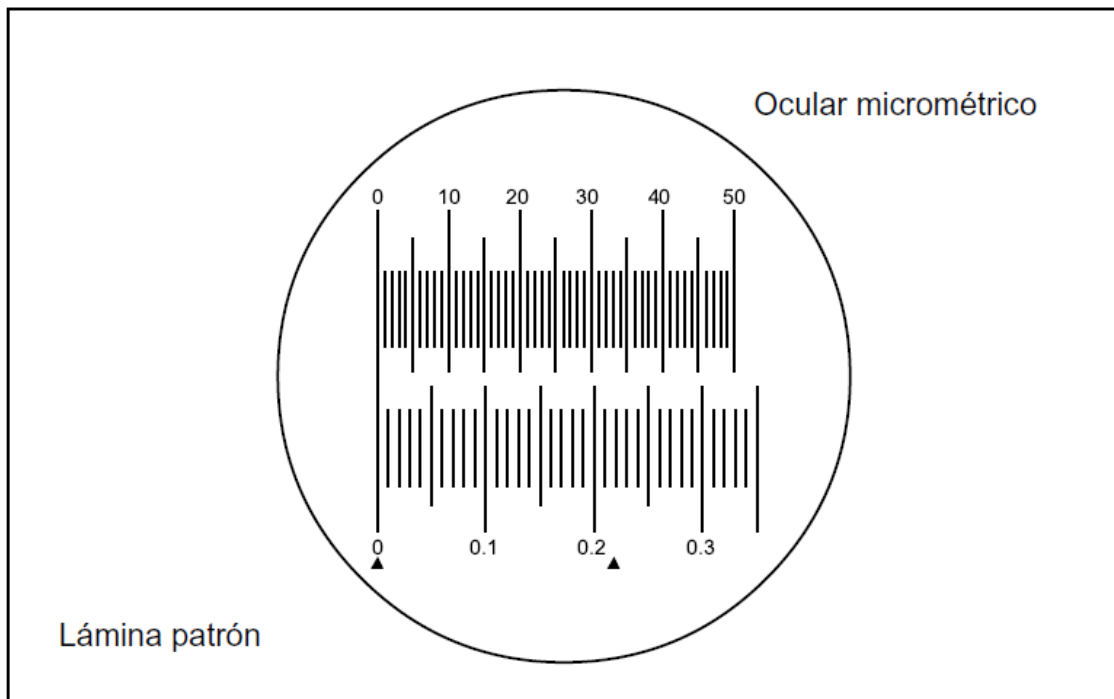


Figura 30. Calibración del microscopio con el ocular micrométrico (en la escala superior) y la lámina patrón en la escala inferior. Coinciden en 33 y 0,22 mm respectivamente

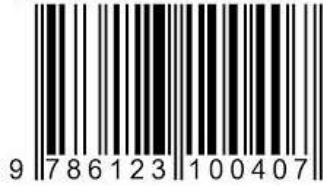
GLOBAL TRADE SERVICE
De Miguel H. Ascuña Gómez

Calle Luis Gálvez Chipoco 350
Balconcillo
Lima 13 - Perú
Telf.: 431-6994 4249548-99392-3922

Sept. 2014

Tiraje: 1000 ejemplares

ISBN: 978-612-310-040-7



Instituto Nacional de Salud
Jirón Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú
Teléfonos: (0511) 748-0000 / 748-1111
Correo electrónico: postmaster@ins.gob.pe
Página web: www.ins.gob.pe