DEPARTAMENTO DE APOYO AL DIAGNOSTICO

SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA

GUIA DE PROCEDIMIENTOS

MICROBIOLOGICOS

PARASITOLOGIA CLINICA

R. RAMOS M

A. ROJAS

E. GALVEZ C.

INDICE

	PAGINA
PRESENTACION	1
INTRODUCCION	2
FINALIDAD	3
SECCIO 1GENERALIDADES	5
1.1 OBJETIVO	5
1.2 CAMPO DE APLICACION	5
1.3 RESPONSABILIDADES	5
SECCION 2 MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD	6
2.1 RESPONSABILIDADES	6
2.2 CAMPO DE APLICACIÓN	6
SECCION 3 OBTENCION DE LA MUESTRA	7
3.1 CONDICIONES NATURALES	7
3.2 MUESTRAS PARA EXAMENES PARASITOLOGICOS	8
SECCION 4 ENVIO Y TRANSPORTE DE LA MUESTRACEA	9
4.1 OBJETIVO	9
4.2 CONDICIONES ESPECIFICAS	9
4.3 PROCEDIMIENTOS	10
4.4 RECHAZO DE UNA MUESTRA	10
SECCIO 5 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIOPARA DIAGNOSTICO PARASITOLOGICO EN HECES	11
5.1 EXAMEN DIRECTO MACROSCOPICO	12
5.2 EXAMEN DIRECTO MICROSCOPICO	13
5.3 METODO DE CONCENTRACION	27
5.4 METODO DE GRAHAM	28
BIBLIOGRAFIA	29

R. RAMOS M.

A. ROJAS

E. GALVEZ C.

A. C. [illegible] H.

MANUAL DE PARASITLOGIA CLINICA

PRESENTACIÓN

El presente "Manual de procedimientos de Laboratorio en Parasitología Clínica" es una herramienta básica y fundamental para mejorar la calidad de los análisis Microbiológicos que se realizan en el Hospital San Juan de Lurigancho, lo cual constituirá un valioso apoyo como herramienta de trabajo para los profesionales y técnicos que realizan los procedimientos para el diagnóstico de las diferentes enfermedades que afectan a la población que acude para su Diagnóstico y tratamiento.

Este Manual es el resultado de una revisión bibliográfica detallada y de un proceso de encuentros técnicos que surgió ante la necesidad de estandarizar metodologías, que permitieran unificar los conocimientos y velar en forma conjunta por la calidad que brindan el Servicio de laboratorio Clínico, de tal manera que proporcionará los elementos necesarios para lograr la confiabilidad de los resultados de laboratorio emitidos.

Sirva entonces este Manual como guía a todos los Profesionales del Laboratorio en el área de Parasitología Clínica, el cual ayudará a mejorar la calidad de los resultados.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

INTRODUCCIÓN

Este Manual de procedimientos es el resultado de un trabajo conjunto de los profesionales del Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Lurigancho. En él se cristaliza gran parte del trabajo de los profesionales y técnicos, de la familia de Laboratorio Clínico. El propósito de este manual, es ofrecer un servicio profesional al laboratorio Clínico.

El laboratorio de análisis de Microbiología tiene que predisponer, documentar y mantener activo un sistema de calidad, para garantizar los requisitos especificados y la conformidad de los productos. Es tarea fundamental de un laboratorio el proveer resultados confiables, entendiendo por veracidad de los resultados analíticos, la precisión, la exactitud, la sensibilidad, la especificidad y la eficiencia instrumental. Para iniciar el Control de Calidad Interno en el Laboratorio Clínico se debe establecer un conjunto de acciones, para asegurar la calidad en los resultados finales, cubriendo así todas las fases del laboratorio. La veracidad, como índice de calidad, caracteriza de modo global un resultado analítico. Para lograr altos estándares de calidad es necesario el seguimiento, supervisión y evaluación de las diferentes fases del laboratorio: pre-analítica, analítica y post-analítica. Con este manual esperamos contribuir al mejoramiento de los procedimientos y servicios que prestan el Laboratorio Clínico.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. CALVEZ C.

A. C.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE PARASITOLOGIA CLINICA

Finalidad

- de muestras biológicas
- Envío y conservación de muestras
- Entrega de resultados

Exámenes urgentes El presente Manual de procedimiento explica la organización del laboratorio de análisis y sus relaciones con los clientes externos e internos de acuerdo con la modalidad de:

- Acceso a las prestaciones diagnósticas
- Ejecución
- Validación del trabajo

Ámbito de referencia

El presente procedimiento está aplicado a un laboratorio de análisis, desde las secciones hospitalarias, y al lugar de toma de muestras, y a los lugares de entrega de resultados.

Responsabilidad

La responsabilidad debe ser conocida y distribuida según sus funciones por:

- El Director del Hospital
- El responsable del laboratorio
- Los responsables de las diferentes secciones del laboratorio

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Calero H.

SECCIÓN 1

GENERALIDADES

1.1 OBJETIVO

Establecer los procedimientos normativos para realizar el diagnóstico parasitológico de las infecciones y/o enfermedades producidas por los parásitos intestinales.

1.2 CAMPO DE APLICACIÓN

Se aplica en el Laboratorio de Parasitología del Hospital San Juan de Lurigancho

1.3 RESPONSABILIDADES

1.3.1 El personal profesional, técnico/operativo y auxiliar son responsables de seguir las especificaciones contenidas en el presente manual y aplicar los procedimientos indicados.

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

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Calero H.

SECCIÓN 2

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

2.1 RESPONSABILIDADES

El personal involucrado en los diferentes procesos para el diagnóstico parasitológico de las infecciones y/o enfermedades debe cumplir los requisitos y aplicar las medidas establecidas en el Manual de Normas de Bioseguridad de Laboratorio del Hospital San Juan de Lurigancho

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 frescas y de pacientes con VIH.

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

2.2.7 El laboratorio

2.2.8 Neutralización y eliminación del material biológico

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

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Calero H

SECCIÓN 3

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

3.1 CONDICIONES GENERALES

3.1.1 Los parásitos intestinales del hombre son protozoarios y/o helmintos, llamados comúnmente gusanos intestinales. Estos helmintos o gusanos pueden ser cilíndricos (nematodos), anillados o segmentados (cestodos).

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 intestinales eliminan con las heces sus formas evolutivas (trofozoíto, quiste, ooquiste y espora), según la especie involucrada.

3.1.4 Los helmintos intestinales adultos (proglótidos de *Taenia* sp., *Enterobius vermicularis* y *Áscarislumbricoides)* pueden salir al exterior espontáneamente o después del tratamiento.

3.1.5 Los gusanos intestinales se eliminan con las heces.

3.1.6 Los métodos de diagnóstico de los parásitos intestinales pueden ser: directo o por concentración de los elementos parasitarios que se eliminan en las heces.

3.1.7 En las heces podemos encontrar formas adultas y microscópicas (huevos, larvas, trofozoitos, quistes, ooquistes y esporas) de los parásitos intestinales; por ello, es importante obtener una buena muestra fecal, así como la conservación óptima del espécimen.

3.1.8 La muestra debe ser obtenida (entre 3 y 6 gramos) lo más fresca posible (máximo 90 minutos, si se busca *Entamoeba histolytica)*, y depositada en un frasco de boca ancha con tapa rosca y rotulada correctamente con los datos de identificación.

3.1.9 La muestra debe obtenerse antes del uso de medicamentos antiparasitarios, o hasta 2 a 5 días después de su administración.

3.1.10 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 entero parásitos del hombre, larvas de nematodos, huevos de ácaros o insectos, etc.

3.1.11 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 y/o conservador (PAF, PVA, formalina 10%, SAF, acetato de

R. RAMOS M

A. ROJAS

E. SALVEZ C.

A. Calero H

sodio, etc.).

3.2 MUESTRA PARA EXAMEN PARASITOLÓGICO

Comprende las siguientes muestras: heces, bilis o jugo duodenal, esputo, secreción, biopsia o preparaciones histológicas, siendo heces, la más frecuente.

3.2.1 Heces

3.2.1.1 Características de la muestra

a. ancha, con tapa rosca.

b. Cantidad : 3 - 6 g

c. Condiciones óptimas: No estar mezclado con orina, que no exista el antecedente de haber ingerido bario u otros productos de contraste, y llevar la muestra al laboratorio en corto tiempo (de 2 - 4 horas de su obtención).

3.2.1.2 Registro de datos

Se debe consignar la siguiente información: Nombre, edad, sexo, ocupación, síntomas y signos, fecha de inicio de síntomas y diagnóstico presuntivo.

3.2.1.3 Procesamiento de la muestra

a. Debe realizarse lo antes posible y en un lugar apropiado (que no le llegue la luz directa). 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.

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

Escribir el nombre completo de los parásitos, indicando el estadio evolutivo y su densidad en la muestra.

R. RAMOS M

A. ROJAS

SECCIÓN 4

ENVÍO Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

4.1 OBJETIVO

Describir el procedimiento y condiciones para el envío y transporte de las muestras al laboratorio

4.2 CONDICIONES ESPECÍFICAS

Las muestras deben mantenerse en un ambiente fresco y lejos de la luz solar, se deben evitar las temperaturas extremas o el desecamiento, deben contener cantidades óptimas y estar en frascos o contenedores rotulados y con soluciones conservadoras (Tabla Nº1).

Tabla Nº 1. Condiciones del envío de la muestra según el tipo y tiempo de demora en llegar al laboratorio para el diagnóstico parasitológico.

TIPO DE MUESTRA	TIEMPO QUE DEMORA EN LLEGAR AL LABORATORIO		AGENTES PARASITARIOS
	< 24 HORAS	≥ 24 HORAS	
Esputo, secreción biliar	T° ambiente	PAF, SAF, Formalina 10%	Paragonimus, Fasciola, Giardia.
Contenido duodenal	T° ambiente	PAF, Formalina 10%	Giardia, Strongyloides, Paragonimus, Fasciola, Ancylostoma o Necator, Microsporidia y otros.
Frotis perianal	T° ambiente	T° ambiente	Enterobius, Áscaris, *Taenia* y otros.
Secreción vaginal	T° ambiente	Frotis en lámina	*E. Vermicularis.*
Tejidos	4° C	Formol 10%	*E. histolytica*, otros (según el tejido)
Helmintos	T° ambiente	Nematodos en alcohol 70%, Cestodos y Trematodos en formol 10%	Áscaris, Trichuris, Diphyllobothrium, Taenia, Paragonimus y Fasciola, etc.
Suero	4° C	Hielo seco o congelador	*E. histolytica*, Giardia, Paragonimus, Fasciola Y otros.
Heces	T° ambiente	PAF, PVA, Formalina 10%, Cary blair, Bicromato de potasio al 2,5%, MIF	*E. histolytica*, Giardia, Cryptosporidium, Enterocytozoon, Encephalitozoon y otros.

Cerrar herméticamente.
Indicar la posición.
Datos del paciente.
Escribir: Frágil, Material Biológico.
Señalar la T° a mantener.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Cajero H.

4.3 PROCEDIMIENTO

4.3.1 Colocar la muestra elegida en un envase apropiado, rotulado correctamente y en un recipiente secundario (podría ser de plástico u otro material resistente a roturas) (Figura Nº 1).

4.3.2 Enviar la muestra al laboratorio lo antes posible; en caso fuera fresca, dentro de las 2 a 4 horas de obtenida.

4.3.3 Si el envío de la muestra va a demorar más de un día en llegar al laboratorio, debe guardarse en un fijador conservador, aplicando las medidas de bioseguridad correspondientes (Tabla Nº 1).

4.3.4 Si se enviara la muestra a otro laboratorio, el personal responsable del envío debe elegir la forma apropiada para la óptima conservación de ésta.

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 ello, 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 con contaminación.

4.4.2.8 Muestra escasa o seca en el hisopo o 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 casos 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, revisar nuevamente los exámenes realizados.

4.4.4 Tener en cuenta el examen parasitológico por macroscopía.

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Calero H.

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 y/o moco, consistencia, etc.).

5.1.2 Materiales.

5.1.2.1 Suero fisiológico

5.1.2.2 Aplicador (baja lengua).

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 Agregar suero fisiológico en cantidad suficiente para homogeneizar la muestra.

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

5.1.4 Observación.

Observar 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 Nº 2).

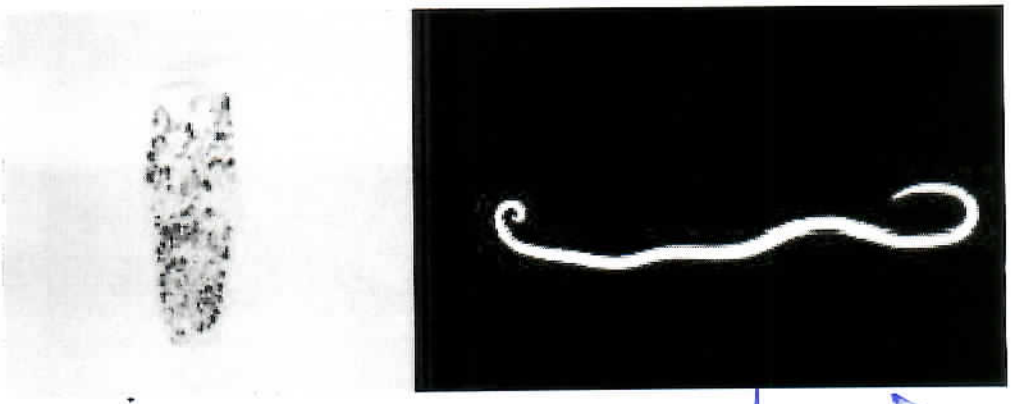


Figura Nº 2. Áscaris lumbricoides **macho adulto (der.) y proglótido grávido de** ***Taenia solium*** **(4X) (izq.), coloración**

R. RAMOS M

A. ROJAS

E. GALVEZ C.

A. CHARO H.

5.1.5 Resultado.

En caso que la muestra no sea normal, es decir, 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.

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

5.2.2 Materiales (Figura Nº 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

5.2.2.7 Solución de lugol

5.2.2.8 Verde brillante

5.2.2.9 Rojo neutro

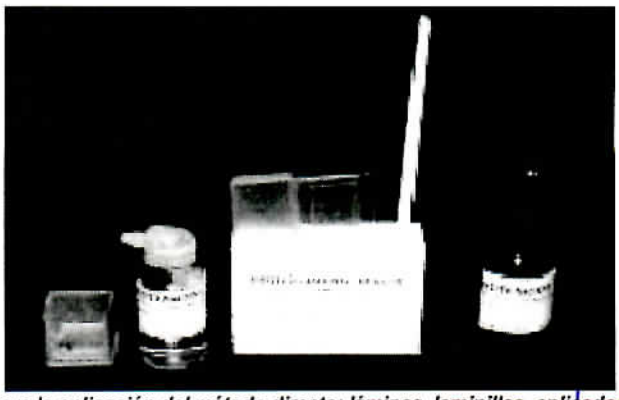


Figura Nº 3. Materiales para la aplicación del método directo: láminas, laminillas, aplicador, solución salina y lugol

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Cuero H.

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

Figura Nº 4. **Trofozoito de *Giardia lamblia* con solución lugol (200X)**

5.3 MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN

Los trofozoitos, quistes, ooquistes, larvas y huevos, pueden concentrarse por diversos procedimientos, lo cual permite corroborar el hallazgo del método directo y conocer la intensidad del entero parasitismo. 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 costeña, 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 (Técnica de concentración por sedimentación, sin centrifugación):

a. *Fundamento.*

Se basa en la gravidez 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, 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. a 22 x 30 mm.).

R. RAMOS M
A. ROJAS
K. GALVEZ C.
A. Calero H.

- Solución fisiológica
- Pipetas de vidrio o plástico.
- Agua destilada, hervida o de lluvia.
- Gasa recortada en piezas de 9 x 9 cm.

c. *Procedimiento.*

- Tomar una porción de heces (1 - 2 g) y homogeneizar con suero fisiológico en un tubo limpio o en el mismo recipiente en que se encuentra la muestra.
- Colocar una gasa, hundiéndola en la abertura del tubo y sujetándola con una liga alrededor de ella.
- Filtrar el homogeneizado a través de la gasa, llenando el tubo hasta la cuarta parte de su contenido.
- Agregar suero fisiológico hasta 1 cm por debajo del borde del tubo.
- Ocluir la abertura del tubo con una tapa, para film o celofán.
- Agitar enérgicamente el tubo por 15 segundos aproximadamente.
- Dejar en reposo de 30 a 45 minutos. En caso que el sobrenadante esté muy turbio, eliminarlo y repetir la misma operación con solución fisiológica o agua filtrada.
- Aspirar la parte media del tubo con una pipeta y colocar 1 ó 2 gotas en una lámina portaobjeto.
- Aspirar el fondo del sedimento con una pipeta y depositar 1 ó 2 gotas del aspirado en los extremos de la otra lámina portaobjeto.
- Agregar 1 ó 2 gotas de solución lugol a una de las preparaciones.
- Cubrir ambas preparaciones con las laminillas de celofán y observar al microscopio

d. *Observación.*

Examinar primero la preparación con solución fisiológica para observar formas móviles y de menor peso específico (trofozoítos, quistes y larvas) 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.*

Informar la presencia de las formas evolutivas de los parásitos

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Calero H.

5.3.1.2 Método de sedimentación rápida (TSR, MSR) (Concentración por sedimentación sin centrifugación) (Lumbreras y col. 1962):

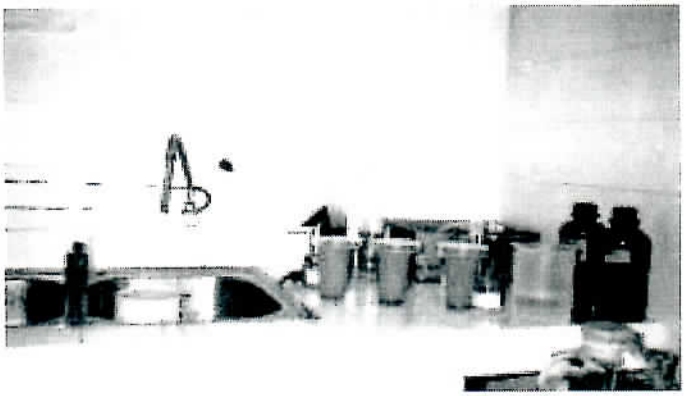


Figura Nº 5. Materiales para la aplicación del método de sedimentación rápida: vasos, gasa, pipeta de transferencia, desinfectada, etc.

a. *Fundamento.*

Se basa en la gravidez 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 plástico.
- Placas Petri o lunas de reloj.
- Aplicador de madera (1/3 de baja lengua).
- Pipeta Pasteur.
- Gasa.
- Agua corriente filtrada.
- Microscopio.

c. *Procedimiento*

- Homogeneizar 3 a 6 g de heces con unos 10 a 20 mL de agua filtrada
- Colocar la coladera y dos capas de gasa en la abertura del vaso y a través de ella, filtrar la muestra.
- Retirar la coladera y llenar la copa con agua filtrada hasta 1 cm. debajo del borde, esto es 15 a 20 veces el volumen de la muestra.
- Dejar sedimentar la muestra durante 30 minutos.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. MARTINEZ C.

A. Cajero H.

- Decantar las 2/3 partes del contenido del vaso y agregar nuevamente agua.

- Repetir los pasos anteriores cada 5 a 10 minutos por 3 a 4 veces, hasta que el sobrenadante quede limpio.

- Transferir el sedimento a una placa petri o luna de reloj, por incorporación o con ayuda de una pipeta Pasteur.

- Observar al estereoscopio o microscopio, a menor aumento.

d. *Observación*

Observar la presencia de huevos. Este método es especialmente útil para la búsqueda de *Fasciolahepática, Paragonimus sp.* Y nematodos como *Áscaris lumbricoides* (huevo fecundado o no fecundado),
Trichuris trichiura, Hymenolepis nana, Diphyllobothrium pacificum, etc.

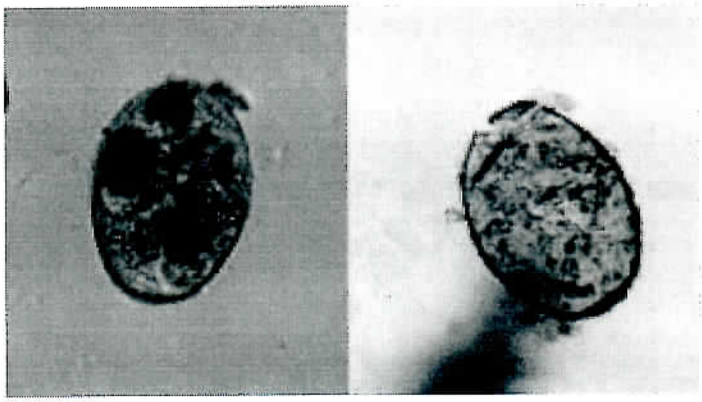


Figura N° 6. **Huevos opérculados de *Paragonimus peruvianus* (izq.) y *Fasciola hepática* (der.) en muestra fresca**

e. *Resultado.*

Informar de la presencia de huevos o larvas de parásitos

5.3.1.3 Técnica de Faust: Método de sedimentación y flotación por centrifugación con sulfato de zinc al 33,3% 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 a 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.

R. RAMOS M

A. ROJAS

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Embudo pequeño de vidrio.
- Baja lengua o bagueta.
- Gasa.
- Sulfato de zinc 33,3%, densidad 1,180
- Solución de lugol

c. *Procedimiento.*

- Colocar 1 a 2 g de la muestra de heces en el tubo de prueba 13 x 100 o 15 x 150 y agregar de 7 a 10 mL de agua filtrada o destilada. Realizar una buena homogeneización con ayuda la baja lengua o bagueta.
- Colocar en el tubo, un embudo con dos capas de gasa y filtrar la muestra homogeneizada hasta alcanzar 1 cm por debajo del borde del tubo (opcional).
- Retirar el embudo y centrifugar de 2 000 a 2 500 r.p.m. de 2 a 3 minutos (opcional).
- Decantar el sobrenadante, adicionar agua al sedimento, homogeneizar y repetir la centrifugación 1 ó 2 veces, hasta que el sobrenadante se observe limpio.
- Eliminar el sobrenadante y agregar la solución de sulfato de zinc (3-4 mL), homogeneizar y completar con la misma solución hasta 1 cm del borde del tubo.
- Centrifugar de 1 a 2 minutos de 2 000 a 2 500 r.p.m.
- Colocar el tubo en la gradilla y agregar, con ayuda de un gotero, la solución de sulfato de zinc hasta formar un menisco en la boca del tubo.
- Colocar una laminilla cubreobjetos sobre el menisco y dejar en reposo de 5 a 6 minutos.
- Depositar una gota de solución lugol en la lámina portaobjeto.
- Retirar la laminilla cubreobjetos, colocarla sobre la gota de lugol o con asa de Kolle colocar 3 ó 4 asadas en la lámina y cubrir con una laminilla cubreobjetos y observar al microscopio.

d. *Lectura.*

Se observan principalmente quistes y huevos de parásitos.

e. *Resultado.*

Informar el nombre y estadio evolutivo encontrado, así como la cantidad de elementos observados por campo **Métodos de concentración por flotación.**

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

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Calero H.

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 saturada de azúcar
- Asa de platino.
- Gradilla para tubos de ensayo.
- Suero fisiológico Embudo de vidrio.
- Gasa.

c. *Procedimiento.*

- Homogeneizar 1 a 2 g de materia fecal en suero fisiológico.
- Colocar un embudo de vidrio con una gasa doblada en la abertura del tubo de ensayo y filtrar el material homogeneizado.
- Centrifugar el tubo con el material homogeneizado a 1 500 r.p.m. durante 2 a 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante, y agregar la solución de azúcar hasta 1 cm del borde del tubo, agitar hasta disolver el sedimento, centrifugar como en el paso anterior, completar con la solución de azúcar hasta el borde y esperar de 2 a 5 minutos la formación de un menisco.
- Con la ayuda del asa de platino, tomar una muestra de la superficie del menisco y colocarla en una lámina portaobjeto, agregar lugol, cubrir con una laminilla y observar al microscopio. En el 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.*

Informar la presencia de las formas evolutivas de los parásitos encontrados y su cantidad, expresado en cruces.

5.3.2.2 Método de Parodi Alcaraz (Método 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 ó 15 x 150.
- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Solución saturada de azúcar (azúcar rubia)
- Formol.
- Aplicador de madera (1/3 de baja lengua).
- Solución de lugol

c. *Procedimiento.*

- Colocar 1 a 2 g de heces en el tubo de ensayo.
- Agregar 3 a 5 mL de la solución sobresaturada de azúcar y homogeneizar con un aplicador.
- Completar el contenido del tubo con la misma solución de azúcar hasta formar un menisco.
- Dejar en reposo por 30 minutos.
- Colocar en contacto con el menisco, una laminilla cubreobjeto que permitirá la adherencia por viscosidad de los quistes y huevos.
- Colocar en la lámina portaobjeto una gota de solución de lugol.
- Retirar la laminilla con sumo cuidado, colocarla sobre la lámina portaobjeto y examinar al microscopio.

d. *Lectura.*

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.*

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Calero H.

Informar los estadios evolutivos de los parásitos encontrados

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.
- Lámina portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Hisopos.
- Solución de formol 10%.
- Solución fisiológica
- Eter etílico.
- Lugol.
- Baja lengua o bagueta.
- Microscopio binocular.

5.3.3.3 *Procedimiento* (Figura Nº 7)

I:
- Colocar en el tubo de ensayo 1 a 2 g de muestra de heces, agregar 8 mL de solución fisiológica, homogeneizar y centrifugar a 2 000 r.p.m. por 2 a 3 minutos.
- Descartar el sobrenadante y repetir varias veces el paso anterior hasta que se observe el sobrenadante limpio.
- Decantar el sobrenadante, agregar al sedimento 6 mL de solución de formol al 10%, homogeneizar y dejar reposar 5 minutos, luego de los cuales se agrega 3 mL de éter.
- Taponar el tubo y agitar cuidadosamente para evitar la salida del material.

II:
- Eliminar las capas formadas de sobrenadante, de ser necesario, con ayuda de un hisopo.

III.
- Retirar la tapa, centrifugar el tubo de 2 000 a 3 000 r.p.m. por 3 minutos.

IV.
- Depositar una gota de lugol en la lámina portaobjeto, y con ayuda de una pipeta Pasteur, tomar

R. RAMOS M

A. ROJAS

R. GALVEZ C.

A. Cabero H.

Una porción del sedimento para mezclarlo con la solución de lugol.

- Cubrir con una laminilla cubreobjetos y observar al microscopio.

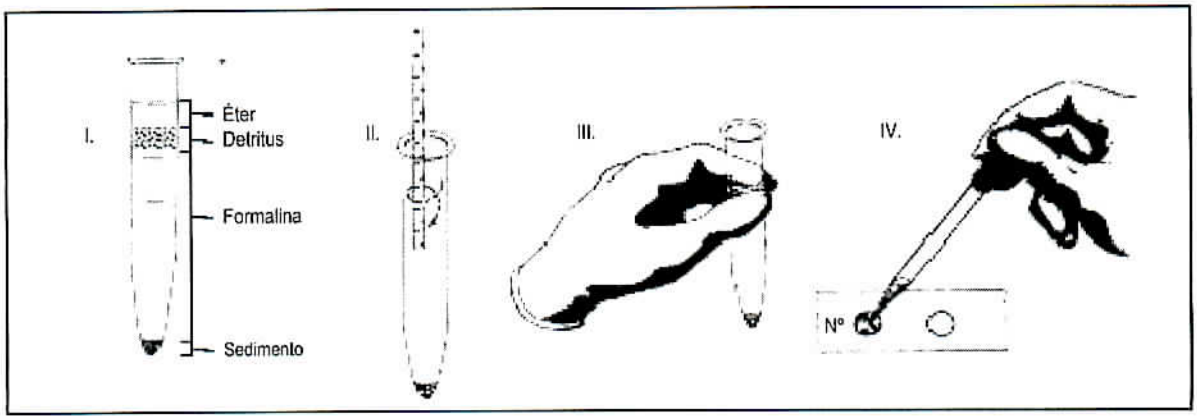


Figura Nº 7. **Aplicación del método de Ritchie**

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.*

Informar el nombre, estadio evolutivo del parásito y la presencia de cristales Suero fisiológico.

Figura Nº 8. **Materiales del método de Baermann: Copa de vidrio, pipetas de transferencia,coladera, láminas y laminillas**

5.3.4.3 *Procedimiento*
De Charcot-Leyden

5.3.4 Método de Baermann (Método de concentración por migración)

5.3.4.1 *Fundamento*

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

5.3.4.2 *Materiales*

- Copas cónicas de 200 a 300 mL.
- Coladera metálica o rejilla.
- Pipetas Pasteur.
- Gasa.
- Láminas cavadas.

- Colocar la coladera o rejilla metálica con la gasa doblada (2 a 3 capas) dentro de la copa (Figura Nº 8).
- Colocar sobre la gasa, 4 a 6 g de la muestra de heces en fresco.
- Verter solución salina a 37ºC en cantidad suficiente por el borde de la copa.
- Dejar a temperatura ambiente o en estufa a 28ºC - 37° C de 30 a 50 minutos.
- Sacar la coladera o rejilla y con ayuda de una pipeta Pasteur obtener 1 mL de sedimento.
- Colocar el sedimento en una luna de reloj o lámina cavada y observar al microscopio o estereoscopio.

5.3.4.4 *Observación.*

Observar trofozoítos y larvas en movimiento. En algunas ocasiones se pueden observar formas adultas de *E. vermicularis* macho.
Para una mejor diferenciación de las larvas de los parásitos, realizar el método de Harada-Mori

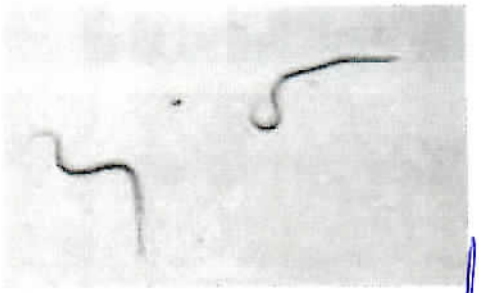


Figura Nº 9. **Larvas de *Ancylostoma/Necator* (100x) en movimiento del método de Baermann**

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

5.3.4.5 *Resultado.*

Informar los estadios evolutivos de los parásitos encontrados

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), cortado de 2 x 3 cm y sumergidos en una solución de glicerina por un periodo no menor de 24 horas.
- Malla metálica, nylon u organza blanca.

Solución glicerinada con verde de malaquita

5.3.5.3 *Procedimiento*

- Tamizar 1 g de la muestra de heces a través de organza, malla metálica o nylon fino
- Extender el tamizado sobre la lámina portaobjeto y cubrir con una laminilla impregnada en glicerina
- Comprimir la muestra con el tapón de jebe sobre la laminilla, secar el exceso de glicerina por 30 minutos y observar al microscopio.

5.3.5.4 *Observación*

Es una técnica apropiada para la observación de huevos de helmintos y algunos protozoarios como
Isospora belli (Figura Nº 10).

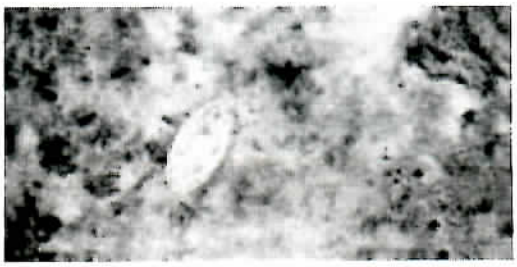


***Figura Nº 10. Isospora belli* con colorante temporal eosina (400x)**

5.3.5.5 *Resultado*

Informar los estadios evolutivos de los parásitos encontrados

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Calero H.

5.4 MÉTODO CUANTITATIVO DE KATO – KATZ (ANÁLISIS CUANTITATIVO = hpg)

5.4.1 Fundamento

5.4.2.1

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

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

5.4.2.6 Malla metálica, nylon u organza de color blanco de 0,09 mm.

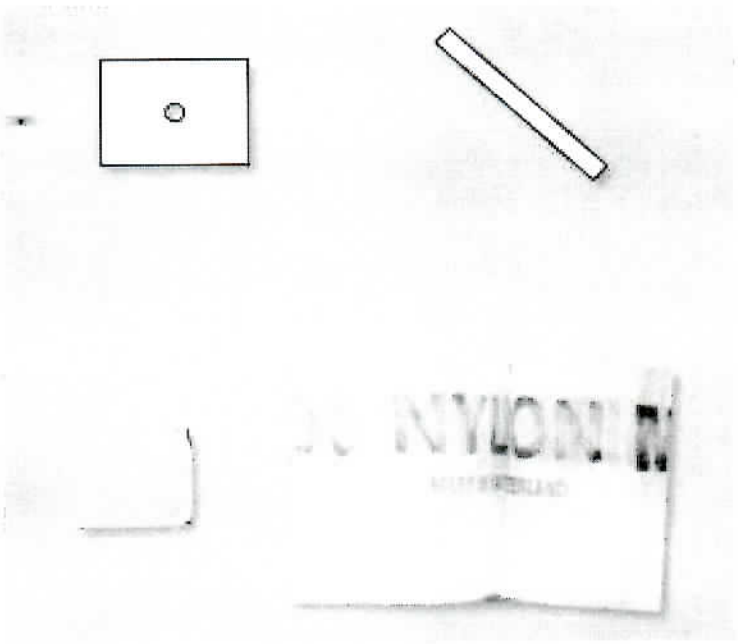


Figura Nº 11. **Materiales del método de Kato - Katz: lámina perforada, aplicador, nylon/organza o malla metálica**

5.4.3 Procedimiento.

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

5.4.3.2 Colocar una malla o nylon de 2 x 3 cm. sobre la muestra.

5.4.3.3 Con el aplicador del kit comprimir la malla para tamizar la muestra.

5.4.3.4 Colocar el molde de plástico sobre la lámina portaobjeto y rellenar la perforación con la muestra tamizada.

5.4.3.5 Levantar el molde dejando el "cilindro" de la muestra en la lámina portaobjeto.

5.4.3.6 Colocar la laminilla glicerinada con verde de malaquita sobre la muestra y con ayuda de un tapón de jebe presionar sobre la laminilla, buscando extender la muestra.

5.4.3.7 Dejar para la diafanización a temperatura ambiente de 30 a 45 minutos.

5.4.4 Observación.

5.4.4.1 Observar los huevos de helmintos, tal como se muestra en la Figura Nº 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 (hpg) (Tabla Nº 2).

5.4.5.2 Deben contarse todos los huevos del preparado.

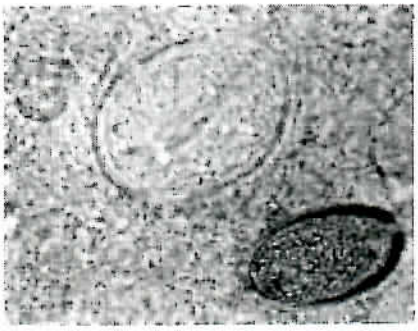


Figura Nº 12. **Huevos *Ancylostoma /Necator* y *Trichuris trichiura* por el método de Kato Katz (400X)**

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Calero H.

Tabla Nº 2. Cálculo del número de huevos por gramo (hpg): Método de Kato - Katz

Nº huevos observados En la lámina	Nº huevos por gramo de heces(hpg)	Nº huevos observados En la lámina	Nº huevos por gramo de heces(hpg)
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 "sueltas" y K/3 para heces diarreicas.

5.4.6 Intensidad de la infección (hpg)

5.4.6.1 El Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica la intensidad

5.4.6.2 Intensidad de la infección por helmintos según los rangos indicados en la Tabla Nº 3.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. CALVEZ C.

A. Calero H.

Tabla Nº 3. Intensidad de las infecciones

AGENTES	LEVE	MODERADA	SEVERA
A. lumbricoides	1 - 4,999	5,000 - 4999	> 50,000
T. trichiura	1 - 999	1,000 - 9,999	> 10,000
A. duodenale *N. americanus*	1 -1,999	2,000 - 3,999	> 4,000

5.5 Método de Graham (cinta adhesiva transparente diagnóstico de Enterobius vermicularis)

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.

MATERIALES

Láminas portaobjetos desengrasadas.

Cinta adhesiva transparente o cinta "scotch" de 1 pulgada de ancho.

Solución salina o tolueno.

Aplicador (bajalengua).

PROCEDIMIENTO

Extender la cinta adhesiva transparente sobre la superficie de la lámina portaobjeto, adheriendo una porción pequeña a ambos extremos, dejando una lengüeta separar la cinta de la lámina portaobjeto cuando se va a tomar la muestra (Figura Nº 27a).

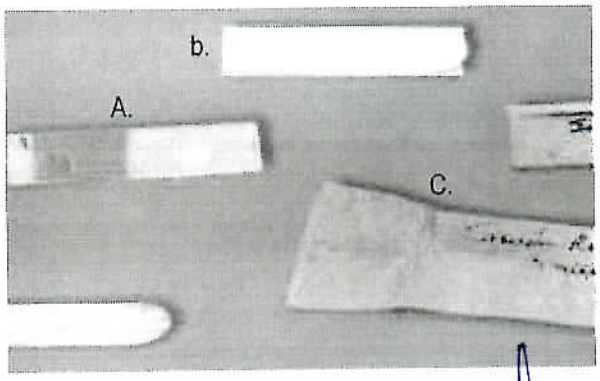


Figura Nº 27. **Preparación de la lámina con cinta adhesiva transparente y baja lenguas, envuelto con papel kraft**

R. RAMOS M

A. ROJAS

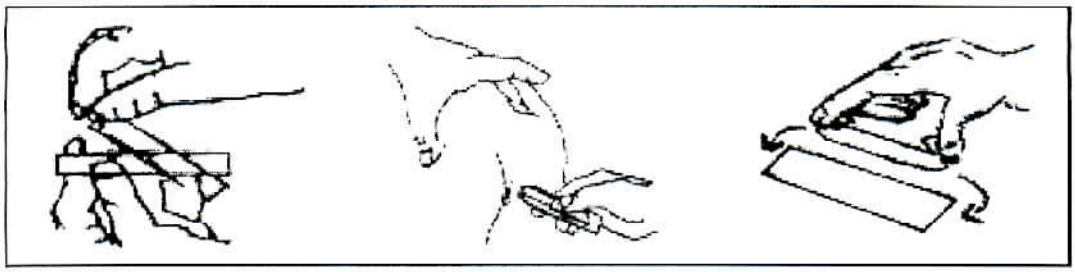
K. SALVEZ C.

A. Calero H.

La obtención de la muestra se realiza en la noche, 2 a 3 horas después que el paciente (generalmente niños) está dormido, o a la mañana siguiente y sin que se haya realizado el aseo de la región perianal.

El paciente debe estar inclinado exponiendo la región glútea, se despega 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 Nº 28 A).

Se adhiere la cinta haciendo toques en la región perianal en sentido horario o anti horario (Figura Nº 28B).



Terminada la aplicación, extender la cinta adhesiva (Figura 28C) y volverla a pegar en la lámina portaobjeto, envolver con el papel y colocar el nombre del paciente.

Microscopía de las láminas.

En el laboratorio, se desprende la cinta engomada del frotis perianal por un extremo, se agrega solución de tolueno, hidróxido de sodio 2% o solución salina, aplicando 1 ó 2 gotas de la sustancia elegida que clarificará la muestra y que permitirá una mejor observación de los huevos y/o adultos de *E.vermicularis.* Es necesario observar la lámina en su totalidad.

En ocasiones, se pueden observar al microscopio, huevos de otros helmintos, principalmente huevos de *Taenia* sp., *Áscaris lumbricoides, Trichuris trichiura* entre otros.

OBSERVACIÓN

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

RESULTADO

Informar el nombre del parásito y su estadio evolutivo (Figura Nº 29).

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Calero H

SECCION 6

BIBLIOGRAFÍA

- **Álvarez B.** Parasitosis intestinales: aspectos diagnósticos. Ginebra: OMS; 1964. Serie de InformesTécnicos.
- **Arruda B, Magallhaes E, Freitas N.** Manual de técnicas para histología normal y patológica. SaoPaulo: EDART; 1976.
- **Ash L, Orihel T.** Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press AmericanSociety of Clinical Pathologist. Chicago: ASCP; 1967.
- **Atías A, Neghme A.** Parasitología clínica. 3ra.ed.; 1991.
- **Beltrán M.** Enteroparásitos. Manual de nivel local. Washington DC: OPS; 1993.
- **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 demuestras (I). 2da. Ed. Lima: INS, 1997. Serie de Normas Técnicas Nº 15.
- **Instituto Nacional de Salud.** Normas de bioseguridad. 2da.Ed.: Lima: INS; 1997. Serie de NormasTécnicas Nº 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 inclinical 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 parasitosisintestinales. Ginebra: OMS; 1995.
- **Organización Panamericana de la 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 helmintology eggs. 3er.ed. Tokio: JAPC; 1986

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. Calero H