

EXAMEN PARASITOLÓGICO EN DIFERENTES MUESTRAS

Autor

Dr. Fidel Espinosa Rivero

Servicio

Microbiología

CONTENIDO

- En muestras de heces fecales
- En muestras de líquidos patológicos
- Investigación de *Enterobius vermicularis* (GRAHAM)
- Investigación de *Cryptosporidium*
- Investigación de malaria (gota gruesa)
- Investigación de *Esquistosomiasis mansoni*, *japonicum* e *intercalatum*
- Investigación de *Esquistosomiasis hematobium*
- Búsqueda de microfilarias en sangre venosa
- Investigación de sangre oculta en heces fecales
- Investigación de huevos de *fasciola hepática* (técnica de copa cónica)
- Identificación de larvas de *Strongyloides stercoralis* (método Baerman)

EN MUESTRAS DE HECES FECALES

Objetivos

- Determinar la presencia de quistes y protozoarios, huevos y larvas de helmintos como agentes etiológicos de enfermedades parasitarias del aparato digestivo, en las muestras estudiadas en nuestro laboratorio.

Alcance

- Se le realizará a todas las muestras llegadas al departamento que cumplan con los requisitos correspondientes. Las muestras de heces fecales no deben ser trabajadas con mas de 8 horas de emitidas.

Responsabilidades

- Técnico que trabaja en la sección y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- No procede nada específico, las mismas generales del laboratorio.

Equipos y materiales

- Microscopio óptico
- Centrífuga
- Colorantes eosina y lugol
- Depresores
- Aplicadores
- Láminas portaobjetos
- Cubre-objetos

Operaciones preliminares

- Para el examen directo no procede.
- Para el método de concentración por centrifugación:
 - ⊕ Al frasco que contiene la muestra de heces fecales se le añade agua de la pila y se homogeniza la muestra con un depresor.
 - ⊕ Se pasa 10 mL de la mezcla a un tubo cónico de centrifuga a 2 000 rpm durante 15 minutos. Se formarán tres capas: líquida, una semisólida y el sedimento que es una capa sólida pequeña.
 - ⊕ Decantamos la primera capa con viraje del tubo rápidamente.
 - ⊕ Decantamos la segunda capa después de enjuagar las paredes del tubo con el chorro débil de la pila y con la ayuda de un aplicador, cuidando no arrastrar el sedimento.

Procedimiento

- ***Métodos concentración***
 - ⊕ *Su finalidad* es aumentar el número de parásitos en el volumen de materia fecal que se examina, mediante procedimientos de sedimentación o flotación. Dentro de las técnicas de sedimentación utilizamos la técnica de Ritchie o centrifugación formol-eter y de las técnicas de flotación aplicamos la técnica de Willis con solución saturada con cloruro de sodio.
 - ⊕ Al sedimento descrito se le añaden 2 o 3 gotas de una solución eosina - lugol en igual proporción y se mezcla con un aplicador. Depositamos 1 gota aproximadamente en un porta objetos con ayuda del aplicador y colocamos encima un cubre-objeto.
 - ⊕ A la lámina colocada sobre el sobrenadante se le agrega 2 o 3 gotas de solución eosina-lugol y se cubre con un portaobjetos.
 - ⊕ Para ambas técnicas la observación puede hacerse también utilizando soluciones separadas de eosina y lugol, lo que permitirá definir mejor las estructuras parasitarias, su motilidad, etc.

- ⊞ Se observará toda la preparación al microscopio con ocular 10 y objetivo de 10 y de 40.

Cálculo e Interpretación de los resultados

- Se informarán la cantidad de huevos o protozoarios por preparación. Otros métodos por concentración pueden ser utilizados como el método de formol-salina de Ritchie, Kato Katz, etc.

- ***Examen directo***

- ⊞ Se coloca una gota del colorante (eosina 1 %, lugol) en un portaobjeto, se mezcla una partícula de heces con ayuda de un aplicador.
- ⊞ Colocar el cubreobjeto y observar al microscopio
 - Ocular 10 y objetivo 10 para conteo de larvas y huevos de parásitos.
 - Ocular 10 y objetivo 40 para la observación de protozoarios.

Cálculo e Interpretación de los resultados

- Se informarán la cantidad de huevos o de protozoarios por campo especificando la especie.

EN MUESTRAS DE LÍQUIDOS PATOLÓGICOS

Objetivo

- Determinar la presencia Entamoeba histolytica y otras entidades parasitarias que puedan estar presentes en dichas muestras.

Alcance

- Las muestras de líquidos patológicos serán tomadas en las áreas destinadas a este proceder y traídos al laboratorio lo más rápidamente posible para su observación, de no ser posible debe ser refrigerada no más de 8 horas para su observación.

Responsabilidades

- Técnico que trabaja en la sección y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- No procede nada específico, las mismas generales del laboratorio.

Equipos y materiales

- Centrífuga
- Lámina portaobjeto
- Cubreobjeto

Operaciones preliminares

- Si se trata de líquido, centrifugar y decantar.

Procedimiento

- Observar el sedimento al microscopio con ocular 10 y objetivo de 10 y 40.
- Si se trata de pus ver directamente al microscopio, sin coloración buscando formas negativas de Entamoeba o de los elementos parasitarios solicitados.

Cálculo e Interpretación de los resultados

- Se informan los quistes observados y se sugiere diagnóstico presuntivo de E. histolytica.

Controles

- No procede.

Referencia

- Normas de parasitología.

INVESTIGACIÓN DE ENTEROBIUS VERMICULARES (GRAHAM)

Objetivo

- Determinar la presencia de huevos de Enterobius vermicularis en la región peri anal.

Alcance

- La muestra se tomará por la mañana antes que el paciente haga su deposición habitual, no se realiza limpieza de la región anal.

Responsabilidades

- Técnico que trabaja en la sección y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- No procede

Equipos y materiales

- Cinta transparente adhesiva
- Lámina portaobjeto
- Microscopio óptico

Operación preliminar

- Aplicar la cinta adhesiva en las márgenes del ano o en la región vulvar, retirar y llevar al microscopio. Puede repetirse 2 o 3 veces en un día.

Procedimiento

- Observar al microscopio el sedimento con ocular 10 x con objetivo 10 x

Cálculo e interpretación de los resultados

- Se informará la presencia de huevos característicos o parásito adulto en la preparación.

INVESTIGACIÓN DE CRIPTOSPORIDIUM

Objetivos

- Determinar la presencia de quistes o protozoarios de *Cryptosporidium* sp en las muestras de heces fecales estudiadas.

Alcance

- Se le realizará este proceder a los casos que se les indique por orientación clínica y que cumplan los requisitos de toma y conservación de la muestra.

Responsabilidades

- Técnico y profesional del cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- Las descritas para el laboratorio de Microbiología.

Equipos y materiales

- Microscópio óptico
- Lámina portaobjeto
- Aplicadores
- Metanol
- Fucsina básica
- Etanol
- Ácido sulfúrico
- Verde malaquita
- Fenol

Operaciones preliminares

- Homogeneizar las heces

Procedimiento

- Hacer una extensión de forma rotatoria con aplicador en uno de los extremos de la lámina.
- Fijar con metanol y dejar secar totalmente.
- Poner fucsina solución de trabajo (anexo 1) durante 1 hora.
- Lavar con agua corriente.

- Colocar en ácido sulfúrico 2 % durante 20 seg moviendo constantemente.
- Lavar con agua corriente y colocar en verde malaquita 3 % durante 5 min.
- Lavar con agua corriente, secar y mirar con lente de inmersión buscando criptosporidium, los cuales se observarán como estructuras circulares teñidos de fresa (quistes).

Cálculo e interpretación de los resultados

- ⊕ Se informaran los quistes observados como quistes de *Cryptosporidium* sp. Se utilizaran como controles láminas de casos positivos archivadas en el departamento.

INVESTIGACIÓN DE MALARIA (GOTA GRUESA)

Objetivo

- Demostrar la presencia o no de especies de *Plasmodium* sp en pacientes sintomáticos o asintomáticos

Alcance

- A todos los pacientes a los que se le realice la indicación y que la muestra recogida cumpla con los requisitos orientados para la misma.

Responsabilidades

- Técnico que trabaja en la sección y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- Las mismas generales del laboratorio.

Equipos y materiales

- Microscopio óptico
- Colorantes según la técnica del Dr. Walker (OMS) (Anexo)
- Láminas portaobjetos

Operaciones preliminares

- Se utilizará una lámina limpia, en uno de los extremos de la misma se hará una gota rectangular que debe medir aproximadamente 1,5 cm de ancho por 2 cm de largo y se deja secar (ver folleto de toma de muestra).
- La coloración debe realizarse lo más pronto posible, si permanece más de 7 días sin ser coloreadas no estará apta para el examen.

Procedimiento (coloración según técnica de Walker)

- Se sumerge el portaobjetos por el extremo donde se encuentra la gota gruesa en una solución de fosfato azul de metileno (anexo 2) durante 1 seg.

- Déjese escurrir la lámina en una esponja o almohadilla húmeda, con el fin de eliminar el exceso de azul de metileno.
- Enjuagar con agua amortiguadora (anexo 4). Por lo general 2 inmersiones suaves en solución amortiguadora son suficientes.
- Colocar la lámina con la gota hacia abajo en el fondo de la cubeta de coloraciones y se deja deslizar solución acuosa de Giemsa recién preparada (3 gotas de Giemsa comercial por mL de agua amortiguadora) dejar actuar el colorante durante 7 min.
- Sumérgase brevemente, 2 veces, el portaobjetos en agua amortiguadora. Se deja escurrir y secar.
- Examinar al microscopio con ocular de 7 y objetivo de inmersión de 100 x. Como mínimo se observarán 100 campos de cada lámina ricos en leucocitos, buscando estructuras parasitarias de plasmodium.

Cálculo e Interpretación de los resultados

Si no se observan parásitos se informará **negativo**; si se observan parásitos se informará según la densidad parasitaria de la forma siguiente:

| | |
|------------------------------|-------------|
| • 1 x campo | X |
| • 2-20 x campo | XX |
| • 21-200 x campo | XXX |
| • Más de 200 x campos | XXXX |

- Si el número de parásitos contados en 100 campos fluctúa entre 40 y 60 se informará x/2 seguido de la letra inicial de la especie.
- Cualquier número inferior a 40 en 100 campos debe informarse completamente; por ejemplo, se observan 33 en 100 campos: se informa 33 parásitos en 100 campos.
- Las cruces se acompañan de la primera letra de la especie de Plasmodium; por ejemplo: *si es un Vivas: XXX V; Falciparum XX F; Malariae X M.*

En caso de *P. Falciparum*

- ⊕ F (formas anulares)
- ⊕ -F + G (formas anulares y gametocitos)
- ⊕ FG (gametocitos únicamente)

Controles

- Láminas **positivas** archivadas en el Departamento.

EQUISTOSOMIASIS MANSONI, JAPONICUM E INTERCALATUM

Objetivos

- Demostrar la presencia de huevos de especies de *S. mansonii*, *S. japonicum* y *S. intercalatum*

Alcance

- Se realizará el estudio a los pacientes a los que se les indicó por sospecha clínica o por proceder de áreas endémicas y que se cumplan los requisitos señalados para la toma de muestras.

Responsabilidades

- Técnico que trabaja en la sección y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de Bioseguridad

- Las mismas generales del laboratorio.

Equipos y materiales

- Microscopio
- Tubos de centrifuga de 10 ó 15 mL (preferiblemente plástico)
- Centrifuga
- Colorante lugol
- Depresores
- Aplicadores
- Láminas portaobjetos
- Cubre-objetos

Operaciones preliminares

- Las mismas que se realizan en el método de concentración por centrifugación. En este caso se centrifuga 1500 rpm durante 15 min.

Procedimientos

- El sedimento resultado de la centrifugación le añadimos lugol débil, utilizando una cantidad aproximada de uno a dos goteros de acuerdo al espesor del sedimento (mientras más grueso más lugol débil se le añade). Se mezcla bien la suspensión con la ayuda de un aplicador.
- Se monta una gota de dicha suspensión entre cubreobjeto y portaobjeto.
- Se observan al microscopio con ocular y objetivo 10 (x 100) toda la lámina. Para la observación de miracidium se utilizan dos tubos de centrifuga de 15 mL en los cuales se centrifuga 3 min. a 1500 rpm las heces homogenizadas.

- Se decanta y al sedimento se le agrega agua destilada hasta 10 mL. Se homogeniza y se coloca en la lámpara por espacio de 30 min.
- Se centrifuga nuevamente de la misma manera, se observa al microscopio el sedimento, agregándole una gota de lugol.

Cálculo e interpretación de los resultados

- Se cuentan los huevos de Equistosomas y se especifican si están viables o no y si existen miracidium.
- Si no se observan en el día se conserva el sedimento con 2 ó 3 gotas de lugol, añadiéndole Formol 5 %, en el frío o a temperatura ambiente. Después de conservados, el tiempo de duración es de una semana aproximadamente.
- Si se quiere dar el resultado por la cantidad de huevos por gramos de heces, la técnica se realiza a partir de 1 g de heces fecales pesado en recipiente de vidrio con 10 mL de agua corriente a partir de ahí el procedimiento será el mismo hasta obtener el sedimento al cual se le agrega lugol débil hasta completar 1 mL se mezcla.
- Con una pipeta Ependorf tomamos 0,1 mL (10 µL) observándolo al microscopio entre cubreobjeto y portaobjeto y damos el informe de cantidad de huevos por gramos.
- Si el resultado es negativo se puede remitir al IPK como centro de referencia.

Controles

- No procede.

ESQUISTOSOMIOSIS HEMATOBIMUM

Objetivos

- Determinar la presencia de huevos de *S. haematobium* en muestra de orina en pacientes portadores o asintomáticos.

Alcance

- Se realizará el examen a los casos por orientación clínica o por que procedan de áreas endémicas y que cumplan con los requisitos para la toma, conservación y transporte de la muestra.

Responsabilidades

- Técnico que trabaja la sección y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- Las mismas generales del laboratorio.

Equipos y materiales

- Microscópio
- Tubos de centrifuga
- Centrifuga
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos

Operaciones preliminares

- Las muestras de orina de 24 horas o una muestra dentro del horario 10:00 AM y las 3:00 PM, después de esfuerzo físico del paciente. Se dejan reposar en el frasco durante 1 hora.
- Se decanta y se recoge el sedimento en tubo de centrifuga de 10 mL.

Procedimiento

- Se centrifuga el sedimento a 1 500 rpm durante 3 min y se decanta el sobrenadante.
- Se agita el sedimento y se procede a colocar 1 gota del mismo en un portaobjetos.
- Se observa al microscopio entre cubre y portaobjetos con ocular 7 y objetivo de 10 (x70).

Cálculo e interpretación de los resultados

- Se observa toda la lámina y se informa la cantidad de huevos por lámina y si son viables o no y si existe miracidium.
- Si se observan hematíes y no huevos, se realizará la lectura de 3 láminas más de la misma muestra; informándose entonces el resultado de lo que se encuentre.

Controles

- No procede.

BÚSQUEDA DE MICROFILARIAS EN SANGRE VENOSA

Objetivos

- Determinar la presencia de microfilarias en sangre periférica.

Alcance

- La muestra de sangre será extraída por medio de punción venosa, en horario que se corresponda con la sospecha clínica del tipo de *filaremia* que se sospeche.

Responsabilidades

- Técnico que trabaja la sección y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- Las mismas generales del laboratorio.

Equipos y materiales

- Microscopio - centrífuga
- Tubos de ensayo con tapa preferiblemente de goma
- Citrato de sodio 3,8 % o heparina
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos
- Metanol
- Giemsa comercial
- Solución amortiguadora (anexo 4)

Operaciones preliminares

- Se le administra al paciente previamente a la extracción dietilcarbamacina (dosis 100 mg) oralmente; la extracción se hará pasado una hora de haber administrado el medicamento (después de 2 h no tiene valor la extracción).
- Se recolecta 3 mL de sangre en un tubo de ensayo o frasco con tapa, preferiblemente de goma, que contenga 2 ó 3 gotas de solución de Citrato de sodio 3,8 %, puede utilizarse también heparina, mezclar por inmersión suave.

Procedimiento

- Añadir 10 mL de agua destilada a 2 mL de sangre no coagulada.
- Centrifugar 5 min a 1500 rpm. Decantar.
- Se repite el paso anterior dos veces hasta observar que el sobrenadante quede rosado.
- No deben realizarse lavados en exceso buscando transparencia del sobrenadante ya que corremos el peligro de que se arrastren en ellos los *microfilarios*.
- Colocar una gota del sedimento entre cubre y portaobjetos y observar al microscopio con ocular y objetivo 10 para la localización de *microfilarios* (x100) y después observar con objetivo de inmersión (100) a fin de analizar la presencia o no de vainas.
- Si los microfilarios son envainados se debe proceder a la identificación de especie, para lo cual se realizará una coloración de Giemsa.
- Se hace un frotis de sangre fresca o del sedimento, al paciente que se le detectó microfilarios envainados.

- Se deja secar a temperatura ambiente.
- Se fija con metanol durante 2 min.
- Se le añade Giemsa preparada a razón de dos gotas por mL de H₂O amortiguadora (anexo 4). Se esperan 10 min.
- Se lava con solución amortiguadora (anexo 4) o agua de la pila.

Cálculo e interpretación de los resultados

- Se informa la presencia de microfilarias, con la existencia o no de formas envainadas. El cuadro clínico, el área endémica y la periodicidad y toma de muestra permitirán realizar el diagnóstico.

INVESTIGACIÓN DE SANGRE OCULTA EN HECES FECALES

Objetivos

- Demostrar la presencia o no de sangre oculta en heces fecales, que puede ser un indicador indirecto o no de una enfermedad parasitaria.

Alcance

- Se realizará el examen a todos los pacientes a los que se les realizó la indicación y que cumplan con los requisitos para el procesamiento de esta muestra. La misma no debe exceder las 8 horas de emitida.
- *Los pacientes no deben ingerir carne durante las 24 h previas al examen.*

Responsabilidades

- Técnico que trabaja la sección y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- Las mismas generales del laboratorio.

Equipos y materiales

- Microscopio
- Láminas portaobjetos
- Aplicadores
- Pipeta de 1 mL
- Bencidina
- Agua oxigenada

Operaciones preliminares: No procede

Procedimiento

- Se coloca 1 décima de bencidina encima de una lámina portaobjeto.
- Se le añade una pequeña porción de heces fecales y se realiza un frotis.

- Añadir al frotis 2 ó 3 gotas de agua oxigenada y observar a trasluz.

Cálculo e interpretación de los resultados

- Es positivo cuando toma una coloración azul. Se informa por cruces.
- En caso de que contemos con *kit* diagnósticos (Haemaccuet-Test, Smith K, u otros) proceder según instrucciones y recomendaciones del fabricante.

Controles

- Controlar los reactivos bencidina, agua oxigenada en caso de los *kit*, verificar controles positivos y negativos.

HUEVOS DE FASCIOLA HEPÁTICA (TÉCNICA DE COPA CÓNICA)

Objetivos

- Demostrar la presencia de huevos de Fasciola hepática mediante la aplicación de esta técnica.

Alcance

- Se procesaran todas las muestras solicitadas por los especialistas que así lo indiquen, sean de heces fecales o de contenido duodenal y que cumplan con las condiciones de recogida, transporte y conservación de las mismas.

Responsabilidades

- Técnico que trabaja la sección y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- Las mismas generales del laboratorio.

Equipos y materiales

- Microscopio
- Depresores
- Copa de cristal cónica
- Gasa
- Lámina portaobjeto
- Lámina cubreobjeto

Operaciones preliminares

- Diluir aproximadamente 50 g de heces fecales en agua de la pila y filtros en copa cónica y pasar a través de una gasa las heces diluidas.
- Estirar la gasa y llenar la copa con agua corriente. Dejar sedimentar.

- Decantar el sobre nadante cada dos horas o más llenando de nuevo la copa y agitándolo el sedimento hasta que el líquido sobre nadante sea claro y transparente.

Procedimiento

- Cuando el líquido esté transparente se desecha el sobrenadante y se observa el sedimento al microscopio con objetivo y ocular 10.
- En ocasiones se hace necesario repetir el procesamiento de varias muestras, por la intermitencia en la expulsión de huevos por los parásitos adultos.

Cálculo e interpretación de los resultados

- Se informara la presencia y cantidad de huevos de Fasciola hepática.

LARVAS STRONGYLOIDES STERCORALIS (MÉTODO BAERMAN)

Objetivos

- Aislar e identificar larvas de Strongyloides stercoralis a partir de muestras de heces fecales o aspirado duodenal.

Alcance

- Se realizará el examen a todos los pacientes a los que se le indique y que se cumpla con los requisitos para la toma, conservación y transporte de la muestra.

Definiciones: no procede.

Responsabilidades: técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad: las generales del laboratorio.

Operaciones preliminares

- Debe recogerse una abundante cantidad de materia fecal.

Procedimiento

- Mezclar uno 50 g de materia fecal con carbón estéril y poner esto en agua tibia en un embudo. El material obtenido se mira directamente al microscopio entre cubre y porta, aplicando una gota de lugol.

Informe

- Se informa la presencia y cantidad del número de larvas observadas.

ANEXOS

ANEXO 1

- ✧ Fucsina básica de Ziehl (solución madre)

| | |
|---|----------|
| Fucsina básica | 15 g |
| Etanol..... | 1 000 mL |
| Fucsina básica de Ziehl (solución de trabajo) | |
| Solución madre..... | 10 mL |
| Agua fenicada 5 %..... | 90 mL |

ANEXO 2

- ✧ Solución de fosfato Azul de metileno

| | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Azul de metileno medicinal..... | 1 g |
| Ortofosfato disódico anhidro..... | 3 g (Na_2HPO_4) |
| Ortofosfato monopotásico..... | 1 g (KH_2PO_4) |

Se mezclan en un mortero; se disuelve 1 g de la mezcla en 400 mL de agua destilada y se filtra.

ANEXO 3

- ✧ Colorante de Giemsa (solución alcohólica)

| | |
|-----------------------------------|--------|
| Colorante de Giemsa en polvo..... | 0,75 g |
| Alcohol metílico puro..... | 65 mL |
| Glicerina pura..... | 35 mL |

Si existe colorante de Giemsa comercial no es necesario prepararla.

ANEXO 4

- ✧ Agua amortiguadora

| | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Ortofosfato disódico anhidro..... | 6 g (Na_2HPO_4) |
| Ortofosfato monopotásico..... | 5 g (KH_2PO_4) |
| pH..... | 7,5 |

Se mezcla en un mortero, se disuelve un gramo de la mezcla en 1 000 mL de agua destilada o toda la mezcla para 2 litros de agua destilada. Se conserva en botellones de cristal.