

Examen coproparasitario. Metodología y empleo. Revisión técnico metodológica

Dr. Roberto Salvatella¹, Tec. Carlos Eirale²

Resumen

El examen coproparasitario es un conjunto de técnicas diagnósticas que constituyen la indicación metodológica para la identificación de la mayoría de las enteroparasitosis motivadas por protozoarios o helmintos. Su eficacia y sensibilidad para establecer un diagnóstico correcto dependen de la adecuada indicación y preparación de la muestra, los datos clínicos y antecedentes de interés que sean aportados al laboratorio y de su correcta y completa ejecución con examen directo microscópico, enriquecimiento y examen macroscópico final. Otras técnicas complementarias (coloraciones, enriquecimientos especiales, etcétera), contribuyen a completar el esquema del examen, en circunstancias específicas (agentes oportunistas, emergentes, exóticos o endémicos). La presente comunicación presenta la metodología y desarrollos en la práctica diaria del Laboratorio de Parasitología de la Repartición Microbiología del Departamento de Laboratorio Clínico de la Facultad de Medicina.

Palabras clave: Enfermedades parasitarias-diagnóstico
Helmintos-microbiología
Helmintiasis-diagnóstico
Protozoarios-microbiología
Infecciones por protozoarios-diagnóstico
Análisis microbiológico

Introducción

Actualmente las enteroparasitosis representan en el mundo un importante problema de salud pública⁽¹⁾. La Organización Mundial de la Salud (OMS)⁽²⁾ estima que la ascariasis produce cuadros clínicos en 214 millones de personas a nivel mundial la tricocéfalosis en 133 y las uncinarias en 96 millones. En el caso de los protozoarios enteroparásitos, sirven como ejemplo: la giardiasis con

una incidencia de 500.000 nuevos casos anuales, así como la infección por *Entamoeba histolytica* que afecta aproximadamente a 50 millones de individuos.

Aunque la mortalidad producida por enteroparasitosis es baja, los números totales a nivel mundial, alcanzan altas cifras como 90.000 decesos para anquilostomiasis, 60.000 por ascariasis y 70.000 por amibiasis. Fuera de estos lamentables efectos, este grupo de afecciones motiva infecciones crónicas con efectos negativos e insidiosos en el crecimiento, nutrición y desarrollo psicofuncional de los niños, con especial repercusión en niñas y mujeres.

En Uruguay, es un grupo de afecciones cuya verdadera entidad se desconoció durante mucho tiempo, hasta que actuales investigaciones detectaron los verdaderos grupos de riesgo en los que las enteroparasitosis alcanzan prevalencias y morbilidad de consideración⁽³⁾.

Aunque se dispone para el diagnóstico de algunos

1. Profesor Adjunto

2. Tecnólogo Laboratorista

Laboratorio de Parasitología. Repartición Microbiología. Departamento de Laboratorio Clínico. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de la República.

Correspondencia: Dr. Roberto Salvatella. Hospital de Clínicas. Departamento de Laboratorio Clínico. Repartición Microbiología. Laboratorio de Parasitología. Av. Italia s/n. Montevideo, Uruguay.

Recibido 16/5/96

Aceptado 22/11/96

agentes, de métodos inmunológicos ⁽⁴⁾, la metodología parasitológica directa, organizada bajo el nombre de examen coproparasitario, constituye el procedimiento de elección para el diagnóstico de la mayoría de estas dolencias ⁽⁵⁾.

El examen coproparasitario posee lejanos antecedentes que van desde el reconocimiento de helmintos enteroparásitos en tiempos de Hipócrates ⁽⁶⁾, hasta la visualización de *Giardia lamblia* (Stiles, 1915) por Leeuwenhoek al observar materias fecales con el primer microscopio de su invención, en la Holanda de 1683 ⁽⁷⁾.

El desarrollo de técnicas concretas es relativamente reciente, con los trabajos de Brumpt y Langeron ⁽⁸⁻¹⁰⁾, disponiéndose en la actualidad de variadas técnicas que se complementan en diversos esquemas, implementados por diferentes grupos de trabajo.

Esta comunicación pretende mostrar los esquemas y métodos de trabajo adoptados por el Laboratorio de Parasitología del Departamento de Laboratorio Clínico del Hospital de Clínicas y profundizar en las técnicas, requerimientos e indicaciones de estos estudios. Se seguirá un orden de exposición lógico y acorde a como avanza la decisión y ejecución diagnóstica.

Indicaciones y solicitud

La indicación del examen coproparasitario, por parte del médico, debe atender al parásito que se sospecha, tomándose en cuenta que esta metodología es realmente útil para aquellos protozoarios, cuyos trofozoítos, quistes u ooquistes, o helmintos, cuyos huevos o anillos se emiten mezclados con las materias fecales. Esta consideración excluye a *Enterobius vermicularis* (oxiuro), dada su característica biológica de oviposición en la margen anal, por lo que su diagnóstico se efectúa mediante el método de espátula adhesiva.

Debe tenerse en cuenta, para efectuar con éxito el examen coproparasitario, la adecuada obtención de tres muestras mínimas de materia fecal, debidamente obtenidas mediante: preparación del paciente, correcta preparación del material y cronograma de obtención ⁽¹¹⁾.

La preparación del paciente pasa por lograr mediante un régimen alimenticio previo (48 horas antes), con la menor cantidad posible de frutas, verduras y grasas, observaciones microscópicas libres de residuos, que obstaculicen el estudio.

Una muestra correcta de materia fecal para el examen coproparasitario debe ser suficiente (más de 50 g), reciente (conservar en heladera hasta 8 horas y aplicar conservadores en plazos mayores), correctamente rotulada (nombre del paciente y fecha de emisión), en frasco de vidrio transparente, limpio, seco y de boca ancha con tapa-rosca y sin mezcla de orina (para evitar deterioro de

parásitos o dificultades para extender frotis de coloración) ⁽¹²⁾.

El cronograma de obtención del material debe considerar: a) que muestras únicas solo permiten diagnósticos positivos en 60% de las materias con parásitos ⁽¹³⁾; b) que los parásitos (protozoarios y helmintos) tienen ciclos de eliminación de huevos y quistes con períodos negativos para la presencia de los mismos en las materias fecales y c) que existen diversos esquemas sobre la secuencia de las muestras recolectables.

Los esquemas de recolección más empleados indican tres muestras en días alternos, colectadas según lo anteriormente expresado.

Una condición fundamental para obtener los más completos y rigurosos resultados es acompañar el material con datos clínicos y antecedentes (personales, familiares y ambientales) del paciente, así como la sospecha que lleva a la búsqueda del diagnóstico coproparasitológico. Datos como inmunodepresión de diverso tipo, procedencia del extranjero, condiciones ambientales del examinado o antecedentes familiares de parasitosis, pueden orientar o adaptar la secuencia de estudios y técnicas que se ejecutarán.

Algoritmo de procesamiento y metodologías

El desarrollo básico del examen coproparasitario debe incluir ineludiblemente tres tiempos: a) examen directo en fresco, b) técnica de enriquecimiento y c) examen macroscópico.

La presencia de nuevas enteroparasitosis emergentes (criptosporidiosis, ciclosporidiasis, etcétera) o la pesquisa de parásitos exóticos para nuestro medio, con requerimientos diagnósticos especiales (anquilostómidos, etcétera) llevan actualmente a la adopción de técnicas complementarias en lo referente a coloraciones y enriquecimientos.

En la figura 1 se detallan los pasos de procesamiento que adopta el Laboratorio de Parasitología del Departamento de Laboratorio Clínico de la Facultad de Medicina.

El material recibido, en correctas condiciones de envío y conservación, pasa a ser procesado en un primer tiempo de observación microscópica directa, en fresco y con tinción por lugol parasitológico. Para la obtención de la muestra se procede a una observación de la materia fecal recibida, tomándose mediante asa bacteriológica muestras de elementos patológicos (moco, pus o sangre) si se los observara, o de cualquier sector aleatoriamente en caso de no identificarse materiales anormales.

La observación se inicia con la suspensión de ese material en una gota de 0,05 ml de solución salina isotónica, sobre portaobjeto, y simultáneamente otra muestra simi-

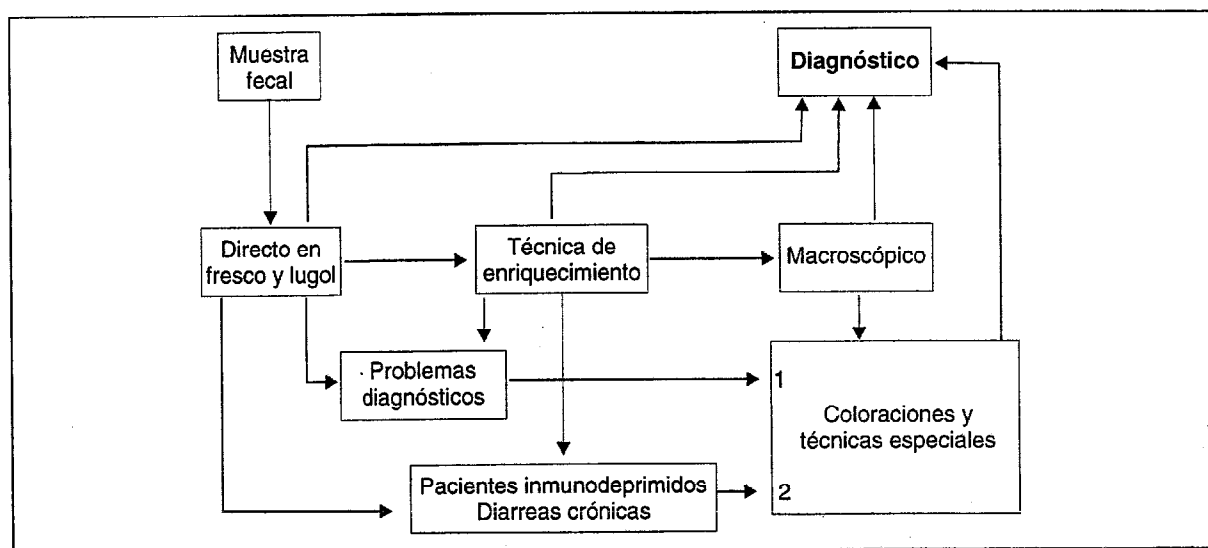


Figura 1. Algoritmo del examen coproparasitario en el Laboratorio de Parasitología del Departamento de Laboratorio Clínico. Técnicas de enriquecimiento: Ritchie o Faust. Coloraciones o técnicas especiales: 1) Negro de Clorazol, Tionina, Tricrómica, Bailenger; 2) Kinyoun, Sheater, WES y Calcofluor, autofluorescencia y fluorescencia directa por anticuerpos monoclonales.

lar será mezclada en 0,05 ml de lugol parasitológico. Este colorante; de gran afinidad por los azúcares complejos, permite obtener coloraciones contrastadas que facilitan la observación de elementos intracelulares.

Los aumentos empleables en el microscopio, se iniciarán por el lente topográfico (30 x), para seguir progresivamente hasta completar la totalidad de objetivos en seco disponibles (generalmente 200 x y 450 x). La búsqueda de huevos o larvas de helmintos requiere especial cuidado; ya que su presencia puede concentrarse en sectores de la laminilla o de la muestra preparada.

Un resultado positivo, en el examen directo, depende del azar o de la presencia de un gran número y concentración de elementos parasitarios en el material observado.

El enriquecimiento es el tiempo del examen coproparasitario que tiene por finalidad la concentración de los elementos parasitarios, aumentando la sensibilidad de la observación cuando su número es escaso y escapa a la detección del examen directo. Existen dos grupos de técnicas de enriquecimiento: a) técnicas de sedimentación y b) técnicas de flotación.

Algunas de las técnicas más conocidas y empleadas son, entre las de sedimentación, Ritchie o Carles y Barthelemy; y entre las de flotación, Willis o Faust ^(14,15).

En la práctica diaria del Laboratorio de Parasitología del Departamento de Laboratorio Clínico, las técnicas de concentración empleadas son el Ritchie, en sedimentación, y el Faust, en flotación (ver anexos 1 y 2).

En relación a técnicas de sedimentación derivadas de la técnica básica de Ritchie, se cuenta con diversas modificaciones como en caso del tiempo de lavado para la ex-

tracción de grasas, utilizándose en lugar de éter sulfúrico el acetato de etilo o el empleo soluciones alcohólicas tamponadas, en los últimos lavados del sedimento ⁽¹⁵⁾.

Existen en la actualidad técnicas de enriquecimiento con equipos comerciales descartables, que poseen la ventaja de un procesamiento en circuito cerrado, hecho que brinda resaltante bioseguridad con gran exactitud diagnóstica, pero estos materiales descartables poseen un costo no siempre posible de absorber por las instituciones ⁽¹⁶⁾.

La tabla 1 detalla las ventajas y utilidades de las técnicas de Ritchie y Faust ⁽¹⁵⁾, que se utilizan en Uruguay desde largo tiempo atrás.

El examen macroscópico se fundamenta en el macerado de la materia remanente sobre un tamiz (malla fina de 0,5 mm) que se coloca debajo de un fuerte chorro de agua de canilla, hasta observar solo restos vegetales o eventuales parásitos macroscópicos. El residuo retenido en la malla fina se depositará para su examen en una bandeja esmaltada de fondo bicolor (campo negro y blanco). Este tiempo del examen coproparasitario es útil en el control de tratamiento de teniasis por *T.saginata/solium* con antihelmínticos, a los efectos de certificar curación por eliminación del escolex, o para detectar otros parásitos de gran tamaño (*Ascaris lumbricoides*, hidatides evacuadas por vía digestiva, etcétera.)

Los tres tiempos básicos (directo, enriquecimiento y macroscópico) constituyen etapas ineludibles del trabajo diagnóstico, que implica un completo examen coproparasitario.

La realización de estas tres etapas junto con la correcta preparación del material a examinar y la recolección se-

Tabla 1. Capacidades comparadas entre las técnicas de enriquecimiento coproparasitológico de Ritchie (sedimentación) y Faust (flotación)

Técnicas	Concentración	Conteo	Identificación huevos	Identificación quistes	Identificación trofozoitos	Preparaciones*
Ritchie	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No
Faust	Sí	No	Sí**	Sí	No	No

* preparaciones permanentes directas. ** no permite recuperar huevos operculados



Figura 2. Ooquistes de *Cryptosporidium sp.*, extendido de material de enriquecimiento, teñido con técnica de Kinyoun.

riada de tres muestras son la garantía de mayor eficacia en el diagnóstico a realizar.

Técnicas especiales y coloraciones

La llegada de nuevos agentes de enteroparasitosis oportunistas emergentes (*Cryptosporidium sp.*, microsporidios, etcétera.), la localización de endemias enteroparasitarias focalizadas o regionales (estrongiloidiasis, uncinariasis, etcétera.), problemas diagnósticos (identificación de agentes, alteración de trofozoitos, etcétera.) o finalidades de docencia e investigación obligan al empleo de técnicas especiales o de diversas coloraciones, muchas de ellas de reciente generalización o descripción, que permiten abordar los problemas y situaciones reseñados.

En la observación directa “en fresco” y del enriquecimiento, la primera, más simple y generalizada coloración

empleada es la utilización del lugol parasitológico (ver anexo 1).

La irrupción de *Cryptosporidium sp.*, como un enteroparásito oportunista emergente, determina la adopción de una técnica de enriquecimiento por flotación: el método de Sheater (ver anexo 3) o flotación en sacarosa, consistente en una flotación simple capaz de obtener una adecuada concentración para los ooquistes de este agente, con coloración identificatoria de estos elementos.

Tanto el sedimento como el sobrenadante del enriquecimiento de rutina, para identificación de *Cryptosporidium sp.*, deben pasar por la coloración identificatoria del Ziehl-Neelsen modificado (técnica de semi ácido resistencia) o de Kinyoun, que utiliza las cualidades tintoriales de semiácido resistencia de los ooquistes⁽¹⁷⁾ (ver anexo 4 y figura 2). El empleo de anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína, disponibles comercialmente, constituye otra alternativa al diagnóstico.



Figura 3. Esporas de microsporidios, extendido de material de enriquecimiento, teñido con técnica de Kinyoun.



Figura 4. Ooquiste de *Cyclospora cayetanensis*, extendido de material de enriquecimiento, teñido con técnica de Kinyoun.

La propiedad de semi ácido resistencia también colabora al diagnóstico de dos nuevos enteroparásitos emergentes: los microsporidios (figura 3) y *Cyclospora cayetanensis* (figura 4).

Los microsporidios (*Enterocytozoon bienersi*, *Septata*

intestinalis, *Encephalitozoon sp.*) se caracterizan por el pequeño tamaño de sus esporas ($1 \times 2 \mu\text{m}$), que poseen propiedades de fluorescencia al utilizar la técnica de Van Gool con el colorante Uvitex 2b O Calcofluor (MR), siendo esta técnica de tinción y observación en microscopio.

pio de fluorescencia el principal elemento de su reconocimiento. Van Gool y colaboradores han empleado, complementariamente, técnicas de concentración especiales para estos parásitos (WES o técnica del Cytospin (MR)(ver anexo 10), que logran aumentar sensiblemente su detección ⁽¹⁸⁾.

C. cayetanensis puede reconocerse por su semi ácido resistencia, unida a un tamaño de ooquistes que alcanza entre las 7 y 9 μ m de diámetros del ooquiste, con fluorescencia propia al ser observados en microscopio de fluorescencia ⁽¹⁹⁾.

La identificación de quistes, ooquistes o trofozoítos de protozoarios enteroparásitos puede necesitar, en circunstancias determinadas, de coloraciones especiales. La hematoxilina férrica de Heindenhein ha sido el método tradicionalmente empleado en nuestro medio, pero su laboriosidad, prolongado tiempo de procesamiento y manejo artesanal de alguna de sus fases (decoloración), han hecho desaconsejable su empleo en los actuales esquemas diagnósticos de rutina.

Por ello, nuevas técnicas de coloración más simples, rápidas y fácilmente reproducibles se han integrado al trabajo en coproparasitología. Una de ellas, la tinción con Negro E de clorazol (ver anexo 5), que permite una rápida solución a la identificación de quistes, con correcta apreciación de detalles morfológicos útiles en la identificación.

A la observación rutinaria de los sedimentos o sobrenadantes, según el enriquecimiento seleccionado, se puede añadir como rutina de extrema utilidad para fines docentes, la observación de una muestra de material con coloración de tionina (ver anexo 6), entre porta y cubreobjeto. Esta simple metodología permite destacar detalles de pared, núcleos y organelos, en casos de difícil observación como *Endolimax nana*, con ventajas sustantivas para actividades de docencia o entrenamiento.

Similar rendimiento y posibilidades posee la coloración de Ballenger (ver anexo 7), aplicable al producto final de un enriquecimiento, para su rápida observación coloreada entre lámina y laminilla.

Otra coloración de utilidad en la observación y obtención de preparaciones duraderas, en extendido sobre portaobjeto, es la técnica de coloración tricrómica (ver anexo 8) que permite observaciones identificatorias de alta calidad con conservación del material observado.

Para la identificación de los helmintos enteroparásitos es el examen coproparasitario la técnica de elección, por medio de la observación microscópica de sus huevos o macroscópica de anillos en el caso de *Taenia sp.* o de helmintos adultos como en el caso de *Ascaris lumbricoides*, siendo *Enterobius vermicularis* (oxiuro) la única excep-

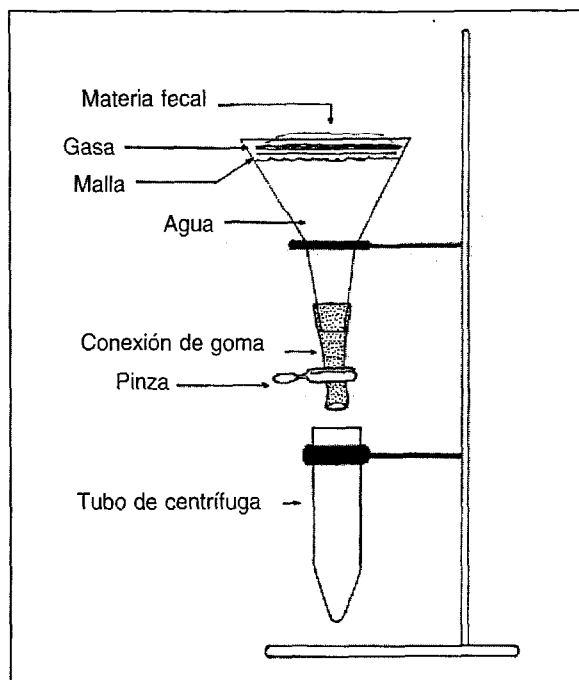


Figura 5. Aparato de Baermann, para diagnóstico de larvas de *S.stercoralis*.

ción, ya que su diagnóstico particular se fundamenta en la técnica de espátula adhesiva en todas sus variantes ⁽²⁰⁾.

Pero en casos especiales, como los nematodos que dispersan larvas y no huevos (*Strongyloides stercoralis* y uncinarias), el empleo de una técnica clásica complementaria, como la de Baermann, complementa el procedimiento del examen coproparasitario (anexo 9).

Conclusiones

El examen coproparasitario es la mayor herramienta diagnóstica disponible en el caso de las enteroparasitosis, y su composición puede ser variada de acuerdo a las necesidades eventuales de un diagnóstico, presencia de nuevas afecciones emergentes o peculiaridades regionales, que impongan el diagnóstico de una endemia local ⁽²¹⁾.

Su eficacia está directamente relacionada a la interacción del clínico con el parasitólogo actuante. Factores como la calidad de la muestra, el aporte de datos clínicos y antecedentes suficientes y la solicitud oportuna y adecuada del procedimiento, harán que el rendimiento diagnóstico alcance su máxima performance.

No debe menospreciarse la prevalencia e incidencia de las enteroparasitosis, ya que en nuestro medio para algunos grupos sociales de riesgo, estas afecciones constituyen un claro motivo de morbilidad.

Summary

Coproparasitary examination constitutes a set of diagnos-

tic technique involving the methodologic indication aimed at the identification of most enteroparasitoses derived from protozoa or helminths. Its effectiveness of responsiveness to the indication and preparation of samples, the clinical data and meaningful background provided for laboratory requirements and its correct, full execution with direct microscopic examination, with enhancement and final macroscopic examination. Other supplementary techniques (staining, special enhancements, etc.) contribute to complete the scheme of the examination, under specific circumstances (opportunistic agents, emergents, exotics or endemics). The present report deals with methodology and development in the daily practice of the Parasitology Laboratory of the Microbiology Section of the Department of Clinical Laboratory of the Faculty of Medicine of Montevideo.

Résumé

L'examen coproparasitaire comprend plusieurs techniques diagnostiques qui permettent d'identifier la plupart des entéroparasitoses causées par des protozoaires ou helminthes. Leurs efficacité et leur sensibilité pour établir un correct diagnostic, dépendent: d'une correcte indication et préparation de l'échantillon, des données cliniques et des antécédents d'intérêt qui soient disponibles au laboratoire, et d'un correct et complet procédé avec un examen microscopique direct et un examen macroscopique final. D'autres techniques complémentaires (telles que la coloration, l'enrichissement spécial), contribuent à compléter le schéma de l'examen, en des circonstances spécifiques (agents opportunistes, émergents, exotiques ou endémiques). Le travail ci-joint, expose la méthodologie et la mise en cours de la pratique quotidienne au Laboratoire de Parasitologie du Département de Microbiologie du Laboratoire Clinique (Faculté de Médecine).

Bibliografía

1. **Organización Mundial de la Salud.** Importance des parasitoses intestinales en santé publique. Bull WHO 1988; 66(1): 23-34.
2. **World Health Organization.** The World Health Report. 1995. Bridging the gaps. Report of the Director-General. WHO: Geneva, 1995.
3. **Zanetta E, Acuña A, Algorta G, Montano A, Méndez V, Murillo N.** Enteroparásitos asociados a diarrea aguda, en niños de la comunidad. Congreso FLAP, 10 y Congreso Uruguayo de Parasitología, 1. Montevideo: 1991.
4. **Long E, Christie J.** The diagnosis of old and new gastrointestinal parasites. Clin Lab Med 1995; 15(2): 307-31.
5. **López Fernández JR, Witkind J, Arroyo L.** Examen parasitológico de materias fecales. In: Mackinnon J. Zooparásitos y animales ponzoñosos. Montevideo: Oficina del Libro AEM, 1965; III: 153-64.
6. **Salvatella R.** Las tenias o solitarias. Almanaque Banco de Seguros 1988; 71: 238-40.
7. **Osimani JJ.** Parasitología médica. Montevideo: Librería Médica, 1982; 1:1-15.
8. **Brumpt E.** Précis de Parasitologie. 3era. ed. Paris: Masson, 1922.
9. **Langeron M, Rondeau M.** Coprologie microscopique. 2a. ed. Paris: Masson, 1930.
10. **Langeron M.** Précis de Microscopie. Paris: Masson, 1949.
11. **Shore L, Ash L.** Diagnóstico parasitológico. Manual de laboratorio clínico. 2a. ed. Buenos Aires: Panamericana, 1983.
12. **Davis C.** Fresh vs. preserved stool specimens for detection of parasites. JAMA 1996; 275(4): 326-7.
13. **Wittner M, Tanowitz H.** Parásitos intestinales en viajeros que ya regresaron. Clín Méd NorteAm 1992; 6: 1491-508.
14. **Melvin D, Brooke M.** Métodos de Laboratorio para diagnóstico de parasitosis intestinales. México: Interamericana, 1971.
15. **Herskovic P.** El diagnóstico de laboratorio de las parasitosis. In: Atías A, Neghme A. Parasitología clínica. 2a. ed. Santiago: Mediterráneo, 1988.
16. **Meridian Diagnostics Inc.** PARA-PAK MACRO-CON. Stool concentration system. Ohio: Meridian Diagnostics, 1989.
17. **Bonifacio R.** Diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. por la técnica de Ziehl-Neelsen modificado. Rev Soc Urug Parasitol 1987; 1(1): 7-14.
18. **Van Gool T, Canning E, Dankert J.** An improved practical and sensitive technique for the detection of microsporidian spores in stool samples. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1994; 88: 189-90.
19. **Ortega Y, Sterling C, Gilman R, Cama V, Díaz F.** *Cyclospora* sp. a new protozoan pathogen of humans. N Engl J Med 1993; 328: 1308-22.
20. **Organización Panamericana de la Salud.** Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud. Washington: OPS, Serie PALTEX, Publicación Científica N° 439. 1983.
21. **Instituto Nacional de Microbiología "Dr.C. Malbrán".** Manual de Técnicas en Coproparasitología. Buenos Aires: Laboratorio de Parasitología, 1994.

ANEXO N°1

Enriquecimiento por sedimentación. Método de Ritchie.

1) Homogeneizado y filtrado.

Mezclar y homogeneizar en un vaso de Bohemia una muestra de materia fecal de 5 g con 25 ml de suero fisiológico salino.

Pasar por embudo con triple filtro de gasa y algodón a un tubo de centrífuga de fondo cónico 8 ml de la suspensión, buscando retener los residuos más voluminosos.

2) Centrifugado y lavado.

La suspensión obtenida en la etapa anterior se centrifuga a 2300 revoluciones por minuto (rpm) durante un minuto.

Se descarta el sobrenadante, y secando el borde del tubo con un hisopo, se vuelve a resuspender el sedimento en suero fisiológico por agitación, volviendo a centrifugar a 2300 rpm durante un minuto la nueva suspensión.

Esta operación se repite hasta obtener sobrenadantes translúcidos, generalmente tres veces.

3) Fijación y eliminación de grasas.

Al sedimento final obtenido se le adiciona 2 ml de formol al 10%, homogeneizándose la muestra por agitación y dejándose reposar por cinco minutos, con fines de fijación. A la suspensión lograda se le agregan 3 ml de éter, agitando vigorosamente el tubo tapado, para extraer grasas.

4) Centrifugado final.

Se centrifuga el tubo a 1500 rpm durante un minuto. Descartamos el sobrenadante, limpiando la boca del tubo con hisopo de algodón.

5) Observación.

El sedimento obtenido está pronto para la observación microscópica, tomándolo con pipeta Pasteur, para suspender en suero fisiológico y lugol parasitológico(*) sobre lámina portaobjeto, cubriéndose ambas muestras con cubreobjetos.

La observación microscópica se efectuará con objetivos en seco a aumentos de 100 x, 200 x y 450 x, sucesivamente.

(*) Lugol parasitológico.

Yodo metálico 2 g
Yoduro de potasio 4 g
agua destilada 100 ml

Se disuelve el yoduro de potasio en el agua destilada y se agrega el yodo metálico, conservándose el colorante preparado en botella color caramelo y fuera de luz solar.

ANEXO N°2

Enriquecimiento por flotación. Método de Faust.

1) Se repiten como en el método de Ritchie las etapas de:

a) homogeneizado y filtrado y b) centrifugado y lavado.

2) El último sedimento se resuspende en una solución de sulfato de zinc al 33% de densidad 1033 g/ml.

3) Esta suspensión se centrifuga a 1500 rpm por un minuto.

4) Del material obtenido se extrae una muestra del material suspendido en el menisco superior de la interfase líquido/aire de donde se extrae mediante asa o pipeta Pasteur.

ANEXO N°3

Método de Sheather o flotación en sacarosa para identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* sp.

1) Se toma un ml del sedimento obtenido por el método de enriquecimiento de Ritchie que se resuspende en 5 ml de solución de Sheather (*).

2) Dejar reposar el material con el tubo en posición vertical durante 3 minutos.

3) Se toma la muestra de la superficie de la suspensión con pipeta Pasteur, colocándose una gota entre portaobjeto y cubreobjeto.

4) Observación de campos con aumento de 40 x en seco. Los ooquistes se observan de color rosa con gran refringencia, membrana bien definida y halo hialino.

(*) Solución de Sheather saturada.

Sacarosa 500 g
Cristales de fenol 6,5 g
Agua Destilada 3200 ml

Calentar el agua destilada a ebullición, retirar el mechero y agregar los restantes componentes, agitando con una varilla hasta completa disolución.

ANEXO N°4

Técnica de Ziehl-Neelsen modificada; de semi ácido resistencia o de Kinyoun, para diagnóstico de *Cryptosporidium* sp.

1) Colocar y extender una gota del sedimento obtenido por enriquecimiento sobre un lámina portaobjeto, dejando secar a temperatura ambiente.

2) Fijar con metanol por 5 minutos.

3) Cubrir el preparado con carbol-fucsina al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente.

4) Lavar con agua destilada suavemente.

5) Breve lavado con alcohol etílico 95%.

6) Lavar con agua destilada suavemente.

7) Etapa de decoloración selectiva con ácido sulfúrico al 10% durante un minuto.

8) Lavar con agua destilada suavemente.

9) Aplicar coloración de contraste con verde malaquita al 0,8% o azul de metileno al 0,3%.

10) Lavar con agua destilada y dejar secar al aire.

11) Observación con lente inmersión de 100 x o aumentos en seco máximos con frotis transparentado con aceite

de inmersión. Los ooquistes, por su condición de semi ácido resistentes se ven de color rojo sobre fondo verdoso (cuando se utilizó verde malaquita) o fondo azul (contraste con azul de metileno).

ANEXO N°5

Colorante "E" de negro de clorazol.

- 1) Mezclar una gota pequeña del material obtenido de un enriquecimiento, con una gota del colorante preparado(*).
- 2) Dejar en cámara húmeda por 24 horas, con cubre, se agregará glicerina fenicada y lutar para su observación con lentes en seco de 450 x.

(*) Mezclar alcohol etílico 170 ml, alcohol metílico 160 ml, ácido acético glacial 20 ml, fenol líquido 20 ml, ácido fosfotúngstico 1% 12 ml, agua destilada 618 ml y Colorante E de clorazol 5 g (molido, se madura un mes).

Filtrar con papel Whatman número 12.

Para obtener preparaciones permanentes pasar por alcohol, luego carbol-xilol, siguiendo por xilol y montaje con Permount.

ANEXO N°6

Coloración de Tionina.

- 1) Se coloca sobre un portaobjeto 20 microlitros del sedimento de un enriquecimiento, con 50 microlitros de colorante de tionina.
- 2) Se cubre con laminilla y se deja 5 minutos para que actúe el colorante.
- 3) Observación al microscopio óptico, en seco, a 10 x y 40 x. El citoplasma de los protozoarios se tiñe de color rojo-azulado obteniéndose una mejor diferenciación del elemento parasitario y sus estructuras internas.

ANEXO N°7

Coloración de Ballenger.

- 1) Se depositan 20 microlitros, del sedimento de materia fecal obtenido por método de enriquecimiento, sobre un portaobjeto al que se le agregan 50 microlitros del reactivo de Ballenger (tomado de la superficie del frasco que lo contiene), cubrir con laminilla.
- 2) Observar al microscopio en seco a 40 x. La coloración es inmediata coloreándose los quistes y las formas vegetativas, con citoplasmas de tono rojo y detalles de las estructuras citoplasmáticas con gran claridad.

ANEXO N°8

Coloración Tricrómica.

- 1) Se realiza un frotis de materia fecal en portaobjeto y sin dejar secarlo, se le agrega fijador de Schaudin, con la finalidad de preservar los elementos celulares, dejándole por un mínimo de 30 minutos o un máximo de 24 horas.
- 2) Se coloca el frotis en etanol al 70 % durante 5 minutos.

- 3) Colocándose posteriormente en etanol al 70% con iodo de D'Antonioni durante 2 a 5 minutos.
- 4) Se continúa con un nuevo tiempo en etanol al 70% durante 5 minutos, dejando escurrir el preparado, repitiendo la operación inicial dejándolo 5 minutos.
- 5) Se agrega el colorante Tricrómico durante 10 minutos.
- 6) A continuación, en la etapa de diferenciación, se agregará alcohol etílico al 90%, acidificado con ácido acético al 1%, durante 3 segundos.
- 7) Efectuar dos nuevos cambios con alcohol absoluto y dejar de 2 a 5 minutos, en etapa de deshidratación.
- 8) Colocar en xilol o tolueno, durante 2 a 5 minutos, en etapa de clarificación.
- 9) Se deja secar para ser observado al microscopio con lente de inmersión a 100 x. La cromatina del núcleo toma una coloración rojiza, con citoplasma en tono verde azulado sobre fondo verde.

ANEXO N°9

Técnica de Baermann

Se trabaja con materias fecales frescas (sin conservadores), en las cuales las larvas posean una importante movilidad. Contando con un aparato de Baermann, como se describe en la figuras, se procede de la siguiente forma:

- 1) El embudo se llena con agua a 40-45°C .
- 2) Sobre el mismo, en una malla metálica se sobreponen dos capas de gasa, en contacto con el agua, sin sumergirse.
- 3) En las gasas se extiende la muestra fecal, que reposa por 3 horas.
- 4) Posteriormente se abre la pinza, recogiendo en el tubo de fondo cónico 10 ml del agua portadora del sedimento acumulado.
- 5) Se centrifuga el material por 5 minutos a 1500 rpm.
- 6) Observar al microscopio el sedimento en busca de larvas (*Strongyloides stercoralis*).

ANEXO N°10

Técnica de detección de microsporidios de Van Gool

- 1) 0,5 g a 1 g de materia fecal fresca se homogeneiza en 8 ml de agua destilada y se filtran por medio de una malla de 300 µm.
- 2) Método WES (agua-éter-sedimentación) se agregan 3 ml de éter a 8 ml de filtrado. Esta mezcla se agita en tubo cerrado por un minuto.
- 3) Se centrifuga a 700 g por dos minutos.
- 4) Se diluye el sedimento en 100 a 150 ml de agua destilada.
- 5) Una gota (10 a 15 µl) de la suspensión se extiende sobre 15 mm² de área.
- 6) Se colorea con Uvitex 2B y se examina a 1250 x en microscopio de fluorescencia.