



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS. UNR.
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
AREA PARASITOLOGÍA

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Autores:
Dra. Hortensia Magaró
Dr. Antonio Uttaro
Dr. Esteban Serra
Bioq. Patricia Ponce de Leon
Bioq. Claudia Echenique
Bioq. Isabel Nocito
Bioq. María Delia Vasconi
Bioq. Griselda Bertorini
Bioq. Beatriz Bogino
Bioq. Paula Indelman

1. DIAGNÓSTICO DE ENTEROPARÁSITOS

El parásito es un ser vivo que vive a expensas de otro organismo de distinta especie obteniendo de éste sus nutrientes y morada y al cual puede producirle daño. Dentro de los muchos organismos que pueden parasitar al ser humano encontramos a los ENTEROPARÁSITOS cuyo habitat lo constituye el intestino del hombre.

Los parásitos no constituyen flora normal en el ser humano y cuando ingresan a un organismo será considerado como un agente extraño, por lo tanto el individuo parasitado pondrá en juego todos los elementos necesarios para eliminarlos. Por su parte el parásito tratará de sobrevivir en este medio hostil. Se establece entre ellos una RELACIÓN HOSPEDERO-PARÁSITO que termina en. a) una infección parasitaria si el paciente no presenta signos ni síntomas de la enfermedad, b) en una enfermedad parasitaria o c) en una erradicación total del parásito. De acuerdo con esto consideramos a los parásitos como agentes potencialmente patógenos que deben ser eliminados para evitar su propagación en la naturaleza.

El diagnóstico de los parásitos intestinales se realiza por métodos directos que consisten en el hallazgo e identificación de los mismos. Las muestras destinadas a tales fines deben llegar al laboratorio parasitológico en un estado que permita su correcta identificación.

Para diagnosticar los enteroparásitos la muestra a examinarse es la materia fecal, la que puede ser recogida de varias maneras:

- MATERIA FECAL recogida luego de administrar un purgante salino: El paciente debe realizar una dieta que consiste en no ingerir durante 2 días verduras de hoja, cítricos ni legumbres. La noche anterior al día del análisis tomará una purga salina (no oleosa). A la mañana siguiente el paciente deberá recoger la 2° deposición y enviarla rápidamente al laboratorio.
- MATERIA FECAL recogida en forma seriada con conservantes: No es necesario realizar una dieta previa. El paciente debe recoger una pequeña cantidad de materia fecal de todas las deposiciones que realice durante 8 días consecutivos que irá colocando en un frasco con conservante (formol 5%, formol 10%, SAF, etc).
- MATERIA FECAL recogida en forma espontánea: Si el paciente presenta una diarrea muy importante, deposiciones líquidas, heces con moco y sangre y NO está tomando ningún antidiarreico como carbón, crema de Bismuto, hierro, sustancias baritadas, se podrá analizar una muestra de materia fecal que deberá ser remitida lo antes posible al laboratorio. Rara vez se analizan muestras espontáneas de heces formadas.

Cada una de estas formas de recolección presenta ventajas y desventajas que deberán tenerse en cuenta en el momento de elegir cual darle al paciente. Todas son procesadas de la misma forma.

Examen Parasitológico.

Las muestras de materia fecal remitidas al laboratorio deberán homogeneizarse. En el caso de heces formadas puede agregarse agua o solución fisiológica hasta llegar a la consistencia deseada.

Con la materia fecal en estas condiciones se realizará en primer lugar un "Examen microscópico directo" con objetivos de 100x y 400x aumentos para la búsqueda de trofozoítos, quistes, ooquistes,

huevos y/o larvas de enteroparásitos. Esta observación microscópica puede hacerse con o sin coloraciones húmedas como eosina, azul de metileno, lugol, etc.

En segundo lugar se puede agregar un “Enriquecimiento de la materia fecal” con el objeto de concentrar en un volumen menor de la misma elementos parasitarios que se encuentran dispersos en un volumen mayor de heces. Para finalizar el análisis se realiza el “Examen macroscópico” de la materia fecal que consiste en un tamizado de la misma para el hallazgo e identificación de macroparásitos.

Con la materia fecal inicial o la obtenida luego del enriquecimiento se pueden preparar extendidos que serán fijados y teñidos con coloraciones específicas según el parásito que se quiera investigar.

La materia fecal recogida luego de la administración de un purgante salino lleva sólo 2 días de recolección por lo tanto se llega más rápido al diagnóstico, pero presenta el inconveniente que no puede realizarse en personas que presenten dolores intestinales, diarrea y en todos los casos que estén contraindicados los purgantes. Por otra parte la muestra debe ser procesada lo más rápido posible desde su obtención. Tiene como otras ventajas que permite ver la movilidad de los protozoarios y se logra una mejor visualización de los macroparásitos ya que por la dieta en el tamizado aparecen muy pocos restos.

La heces recogidas en forma seriada pueden aplicarse a cualquier tipo de paciente y si tenemos en cuenta que la eliminación de quistes y/o huevos muchas veces no es continua, al recoger durante 8 días aumenta la posibilidad de recuperar los parásitos. Podríamos considerar como desventajas que es tediosa la recolección por parte del paciente y por otro lado al no tener la necesidad de realizar una dieta que contenga pocos residuos, se hace más complicado el tamizado de la materia fecal ya que encontraremos muchos restos que en algunos casos pueden interferir o dificultar la observación de macroparásitos. Por otro lado el formol inmoviliza a los protozoarios y aunque muchos conservan su morfología típica lo cual hace posible su diagnóstico y otros como *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas hominis* la pierden, lo cual hace imposible su identificación en este tipo de muestras.

Para completar el análisis parasitológico es conveniente realizar un HISOPADO ANAL SERIADO. Esta es una técnica específica para la detección de *Enterobius vermicularis* que es un nematelminto cuya hembra coloca los huevos en las márgenes del ano y no en la luz intestinal esto hace que los exámenes micro y macroscópicos de materia fecal presenten una baja sensibilidad para este parásito. Para realizar este tipo de hisopado se entregan aproximadamente 8 gasas estériles y un frasco con conservante (formol 10%), el paciente, a la mañana apenas se levanta y sin higiene previa deberá pasar una gasa seca por la zona perianal y colocarla en el frasco con líquido conservador. Una vez que el material llega al laboratorio el líquido se centrifuga, descartando el sobrenadante hasta agotarlo. En el sedimento se buscarán con 100x y 400x aumentos los huevos del parásito.

Restos no Parasitarios.

Llamamos restos no parasitarios a una gran cantidad de elementos, de origen endógeno o exógeno, que pueden estar presentes en la materia fecal. En algunos casos su presencia es normal y en otros puede estar asociado a determinadas patologías.

En un análisis parasitológico, la importancia de reconocer los restos no parasitarios radica simplemente en no confundirlos con los parásitos.

Entre la gran cantidad de restos que pueden aparecer en una materia fecal encontramos:

Tejido conjuntivo: Al microscopio sus fibras se entrecruzan en una red muy fina. El tejido conjuntivo de la carne cocida es atacado en el estómago y por el jugo pancreático, en tanto que si está crudo sólo es atacado en el estómago. La aparición de fibras intactas en la heces puede estar asociado a una deficiencia gástrica o una evacuación demasiado rápida.

Carne: Las fibras musculares están unidas por trabéculas conjuntivas y su degradación por enzimas proteolíticas sólo es posible después de la degradación de esta cubierta conjuntiva. Las fibras de carne insuficientemente digeridas son de tamaño variable, de forma rectangular de ángulos bien marcados, de color marrón y presentan una neta estriación doble, longitudinal y transversal. Las fibras de carne bien digeridas presentan formas más redondeadas, de color marrón más claro a amarillo pálido y sin estrías. También se pueden observar morfologías intermedias (con algunas esquinas redondeadas y otras en ángulo recto) correspondientes a fibras semi digeridas.

Grasas:

Grasas neutras aparecen como glóbulos muy refringentes.

Acidos grasos aparecen con aspecto de finas agujas a veces agrupadas en masas.

Elementos vegetales:

Almidón: se presenta en células de reserva amilácea constituyendo lo esencial de la masa de los tubérculos y raíces comestibles, así como en los granos de las leguminosas. El grado de digestión del almidón se determina por la coloración que toma con el colorante lugol, que varía del azul oscuro, cuando el almidón está intacto, al rosa pálido, cuando está totalmente digerido, pasando por tonos de marrón para los otros estadios de degradación.

Almidón crudo: se presenta bajo la forma de granos organizados en capas concéntricas alrededor de un hilo excéntrico con gran refringencia.

Celulosa no digerible: su presencia en las heces no indica patología, pero su morfología puede conducir a diagnósticos erróneos. Por ejemplo los **vasos espiralados** de legumbres verdes aparecen como resortes cuando están de perfil y de frente se presentan como elementos redondeados de doble contorno cuyo interior puede estar lleno o vacío.

También encontramos los **pelos vegetales**, alargados, rígidos de paredes gruesas y muy refringentes presentando en el medio un canal medular. Los restos de **pólenes** y **esporas de hongos** con estructuras semejantes a huevos de parásitos de los cuales es importante distinguir. Los **tejidos de revestimiento** de los vegetales aparecen con formas complejas como por ejemplo las células en empalizada.

En material fecal también suelen encontrarse **cristales:**

Cristales de oxalato de calcio cuya presencia en grandes cantidades puede significar una insuficiencia en el ataque gástrico (deficiencia en la secreción o tiempo de permanencia demasiado breve).

Cristales de fosfato amónico-magnésico los que aparecen por contaminación de las heces por orina o putrefacción albuminoide.

Cristales de Charcot-Leyden o agujas de brújula. Proviene de la destrucción de los eosinófilos y testimonian un estado alérgico de la propia mucosa intestinal sin estar necesariamente asociado a una hipereosinofilia sanguínea.

También suelen aparecer **células endógenas** como los leucocitos, los que pueden observarse aislados con morfología conservada o alterados o en grupos denominados picitos. En una materia fecal también se pueden encontrar hematíes y células epiteliales de distinto tipo. Las células del epitelio anal son poliédricas, alargadas, poco refringentes y con núcleo alargado u ovoide y gruesas granulaciones, mientras que otras células de la mucosa intestinal pueden aparecer redondeadas o alargadas.

Sería imposible enumerar y reconocer todos los restos no parasitarios que pueden aparecer en una materia fecal y además muchos de ellos se destruyen apareciendo bajo la forma de detritus. Lo importante es saber que estos restos constituyen el fondo donde vamos a buscar a los verdaderos parásitos.

2. RECOLECCIÓN DE MATERIA FECAL EN CONSERVANTES

La materia fecal puede recolectarse en diferentes conservantes. Los mismos se utilizan cuando las muestras no se pueden procesar inmediatamente después de su eliminación, para facilitar su transporte y para ser conservadas por varios meses. El uso de estas soluciones permite conservar la morfología de protozoarios y previene el desarrollo de huevos y larvas. Las soluciones conservantes son las siguientes:

a) Formol al 10 %.

Formol al 40 %	250 ml
Agua destilada csp	1000 ml

b) Solución merthiolate-iodo-formaldehído (MIF)

Solución I (solución MF)

Glicerina		2 ml
Formaldehído		10 ml
Tintura de merthiolate 1:1000ml.	80 ml	
Agua destilada	100 ml	

Solución II (solución de iodo-lugol)

Iodo cristales		5 g
Ioduro de potasio	10 g	
Agua destilada	100 ml	

El ioduro de potasio se disuelve en agua y el iodo es adicionado lentamente hasta su completa disolución. Se filtra y se mantiene la solución en frasco ambar.

c) Solución de acetato de sodio - ácido acético – formaldehído (SAF)

Acetato de sodio	1.5 g
Acido acético glacial	2.0 ml
Formaldehído 40%	4.0 ml
Agua destilada	92.5 ml

d) Solución fijadora de alcohol polivinílico (PVA)

PVA (polvo)	10 g	
Etanol 95%		62.5 ml
Cloruro de mercurio, sol.acuosa saturada		125 ml (ver fijador de Schaudinn)
Acido acético glacial		10 ml
Glicerina	3 ml	

Mezclar los ingredientes líquidos en un vaso de precipitado adecuado al volumen a preparar. Agregar el polvo de PVA. Cubrir el vaso con papel encerado grueso o metálico y dejar remojar durante toda la noche. Calentar lentamente la solución hasta 75 °C, cuando se alcance dicha temperatura retirar el vaso y agitar la mezcla hasta obtener una solución homogénea ligeramente lechosa (30 segundos). El PVA permanece estable durante largos períodos de tiempo (meses o años) en recipientes cerrados.

e) Fijador de Schaudinn

Cloruro de mercurio saturado	
Cloruro de mercurio (HgCl ₂)	110 g
Agua destilada	1000 ml

Hervir la dilución a baño maría hasta que se disuelva el cloruro de mercurio. Dejar reposar hasta que se formen cristales.

Fijador de Schaudinn (solución stock)

Cloruro de mercurio, solución acuosa saturada	600 ml
Alcohol etílico, 95%	300 ml

Inmediatamente antes de su uso agregue ácido acético glacial, 5 ml por 100 ml de solución stock.

f) Solución de dicromato de potasio.

Dicromato de potasio	2.5 g
Agua destilada	100 ml.

Se conserva en frasco color caramelo.

Es importante tener en cuenta las ventajas y desventajas de cada fijador; la mayoría de los laboratorios seleccionan varios métodos diferentes, diseñado cada uno de ellos para un propósito específico. Por ejemplo: la elección del conservante depende de la posibilidad de realizar frotis para coloraciones permanentes y una examinación completa de los especímenes. También es importante recordar que si se eligen compuestos mercuriales, debe existir una adecuada eliminación de los mismos.

Conservante	Ventajas	Desventajas
Formol al 10 %	<ul style="list-style-type: none">* Fijador multipropósito: buen conservante de la morfología de huevos de helmintos, larvas, quistes de protozoos y coccidios.* Fácil preparación.* Larga duración.* Adecuado para las técnicas de concentración y de la microscopía de epifluorescencia.* Adecuado para coloración ácido-alcohol resistentes (safranina) y Tricrómica modificada.* Compatible con inmunoensayos.	<ul style="list-style-type: none">* Inadecuado para preservar la morfología de trofozoitos como los de <i>Entamoeba histolytica</i>.* No es aconsejado para algunas coloraciones permanentes como tricrómica (TC).* Puede interferir con PCR, especialmente luego de un tiempo prolongado de fijación.* Puede interferir con la capacidad tintorial de <i>Ciclospora cayetanensis</i> y microsporidios intestinales.
MIF	<ul style="list-style-type: none">* Los componentes fijan y colorean al mismo tiempo.* Fácil de preparar.* Util para trabajos de campo.* Vida media prolongada.* Adecuado para técnicas de	<ul style="list-style-type: none">* No es aconsejado para coloraciones permanentes como TC.* Conservante inadecuado para la morfología de trofozoitos.* El yodo interfiere con técnicas

	concentración.	que utilizan colorantes de fluorescencia y puede distorsionar a los protozoos.
PVA	<ul style="list-style-type: none"> * Buen conservante de la morfología de trofozoitos y quistes. * Fácil preparación de frotis para coloraciones permanentes (la solución preserva los organismos y los adhiere al preparado). * Vida media larga a temperatura ambiente. * Las muestras conservadas permanecen estables por varios meses. 	<ul style="list-style-type: none"> * Inadecuada conservación de la morfología de huevos, larvas, coccidios y microsporidia. * Contiene compuestos mercuriales. * Difícil de preparar en el laboratorio y difícil y caro de eliminar. * Menos aplicable para técnicas de concentración. * No es compatible con inmunoensayos. * No es adecuado para coloraciones como safranina
SAF	<ul style="list-style-type: none"> * Fácil preparación. * Fijador multipropósito. * Adecuado para concentración y preparación de coloraciones permanentes. * Vida media larga. * Compatible con coloraciones como TC y safranina. * Compatible con técnicas de inmunoensayos. 	<ul style="list-style-type: none"> * Requiere aditivos como albúmina – glicerina para la adhesión de las muestras al portaobjeto (albúmina de Mayer). * Coloraciones permanentes como TC no son tan buenas como las realizadas en PVA.
Solución de dicromato de potasio	<ul style="list-style-type: none"> * Util para el estudio de coccidios. * Apropiado para la esporulación. * Impide el crecimiento bacteriano. 	<ul style="list-style-type: none"> * No es fijador.
<u>Fijador de Schaudin</u>	<ul style="list-style-type: none"> * Buena conservación de la morfología de trofozoitos y quistes. * Fácil preparación de frotis para coloraciones permanentes. 	<ul style="list-style-type: none"> * Poco adecuado para técnicas de concentración. * Contiene componentes mercuriales. * Inadecuada conservación de la morfología de huevos, larvas, coccidios y microsporidia. * Escasa adhesión de muestras mucosas o diarreicas a portaobjetos.
PVA modificado (cobre o zinc)	<ul style="list-style-type: none"> * Se pueden hacer frotis permanentes y teñidos con TC. * Se prefieren las soluciones con zinc por encima de las cúpricas. * No contiene compuestos mercuriales. 	<ul style="list-style-type: none"> * La coloración no es consistente. * No es buena la morfología que se observa con ambas soluciones y no es comparable con la obtenida con PVA.

3. COLORACIONES

Diagnóstico de Enteroparásitos.

El exámen microscópico de materia fecal consiste en la realización de montajes húmedos. La observación microscópica puede ser directa sin y con coloración y frotis coloreados permanentes.

Montaje húmedo directo

Se usa principalmente para observar las características morfológicas de los protozoarios y detectar la movilidad de los mismos en su forma de trofozoito. El frotis directo se prepara con una pequeña cantidad (una gota) de materia fecal entre porta y cubre, no debe ser ni mayor porque resultaría demasiado espesa para el exámen, ni menor porque disminuiría la posibilidad de encontrar parásitos. La observación se realiza utilizando un objetivo de 10x aumento y ante un elento sospechoso se examina con 40x aumento.

Para poder observar con más detalle la morfología de los protozoarios (especialmente los núcleos) se puede hacer un montaje húmedo coloreado, colocando una gota de colorante en el borde del portaobjeto o se prepara un nuevo montaje. Varios tipos de soluciones de iodo son recomendadas, por ejemplo de Lugol y de Dobell y O' Connor y otras como solución de eosina o azul de metileno.

Los trofozoitos y quistes de protozoarios, huevos o larvas de helmintos y ooquistes de *Isospora belli* pueden ser identificados en el frotis directo. Los ooquistes de *Cryptosporidium* difícilmente son observados, salvo en grandes infecciones, al igual que las esporas de *Microsporidium* que son muy pequeñas y de forma semejante a restos en materia fecal.

Frotis coloreados permanentes

La detección y la correcta identificación de la mayoría de los protozoarios intestinales depende del exámen de estos frotis observados con un aumento de 100x. La utilización de frotis permanentes no solamente nos proporciona un archivo permanente de los protozoarios, sino que pueden ser utilizados, cuando la identificación es dificultosa, para consultar con especialistas

El método más clásico es la hematoxilina férrica de Heidenhain, pero la mayoría de los laboratorios seleccionan técnicas más breves como la coloración Tricrómica.

Es importante mencionar que la mayoría de las dificultades en las coloraciones de trofozoitos y quistes se deben a una fijación inadecuada, al uso de preparados muy densos o por materia fecales muy viejas.

Las coloraciones empleadas para los frotis permanentes son:

Coloración Tricrómica

La técnica Tricrómica de Wheartley es una modificación de la técnica original de Gomori para tejidos. Es un procedimiento rápido y simple para la detección de protozoarios, células humanas (macrófagos, glóbulos rojos, polimorfonucleares) y levaduras.

Estas coloraciones no son recomendadas para huevos o larvas de helmintos debido a que se observan oscuros por la retención de exceso de colorante. Los ooquistes de *Isospora belli* se observan mejor en preparaciones húmedas y los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* y *Cyclospora* generalmente no son reconocidas por la coloración Tricrómica.

Las muestras pueden ser materias fecales fresca fijadas inmediatamente en fijador de Schaudinn o materia fecal conservada en PVA, SAF o MIF. Con una fijación adecuada, el material de base generalmente toma un color verde ya que los protozoarios tienen un citoplasma que va del verde azulado al púrpura y la cromatina nuclear y cuerpos de inclusión se tiñen de color rojo a rojo púrpura.

Coloración hematoxilina férrica

Hematoxilina férrica fue la coloración usada para describir la morfología de protozoarios intestinales hallados en humanos. Aunque existen muchas modificaciones de la técnica solo se describirán dos métodos: Spencer- Monroe y Tompkins-Miller los cuales pueden ser usados con materia fecal fresca o conservada en SAF o PVA.

Las dos técnicas son más prolongadas que la coloración Tricrómica y se diferencian de ésta porque emplean ácido fosfotúngstico para decolorar a los protozoarios, obteniéndose mejores resultados para la diferenciación de los mismos.

Con estas coloraciones el material de base y los microorganismos se tiñen de azul grisáceo negro con estructuras nucleares y cuerpos de inclusión más oscuros que el citoplasma.

La coloración permite la diferenciación de protozoarios, células humanas, cristales de Charcot Leyden, levaduras y no es recomendada para huevos o larvas de helmintos, ni para ooquiste de *I. belli*, *C. parvum* y *Cyclospora*.

Coloraciones especiales para coccidios (especies de *Cryptosporidium*, *Isospora* y *Cyclospora*) y *Microsporidium*

Coloración de Kinyoun modificada

Permite observar los ooquistes de *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e *Isospora sp.* debido al comportamiento ácido resistente de la cubierta quística de estos parásitos. Si bien las esporas de *Microsporidium* también poseen esta propiedad, su tamaño hace difícil su identificación por esta coloración.

Las muestras usadas son materia fecal fresca, concentrada o preservada con formol o SAF (no se recomienda las conservadas en PVA), fluidos duodenales, esputos, lavados broncoalveolares o biopsias.

Los ooquistes de *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e *Isospora sp.* se observan de color rosa a rojo destacándose sobre un fondo azul. La intensidad de la coloración depende del espesor del preparado, del porcentaje de ácido en la decoloración y del tiempo de contacto con el mismo.

Coloración de Ziehl-Neelsen modificada

El fundamento y las indicaciones generales para esta técnica son similares a los de la coloración Kinyoun y solo se diferencia en el calentamiento del extendido previo al uso del colorante.

Coloración de Safranina

Permite colorear ooquistes de *Cryptosporidium* y *Cyclospora*.

Coloración Tricrómica modificada

Se emplea para la búsqueda de esporas de *Microsporidia*. Los cambios con respecto a la técnica anterior son: la temperatura de incubación a 50° C y el tiempo de coloración de 10'.

Diagnóstico de hemoparásitos

El exámen microscópico de sangre es importante para el diagnóstico de *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium* y microfilarias. Si bien algunos parásitos como tripanosoma y microfilarias son detectados por su forma y su movilidad característica en sangre fresca, su identificación específica depende del uso de un colorante permanente.

El rendimiento en la búsqueda de estos parásitos mejora con el uso de distintas técnicas de concentración y la recolección en forma seriada.

Las infecciones parasitarias pueden detectarse con dos tipos de extendidos de sangre: grueso y fino (gota gruesa y gota fina). El primero permite examinar una mayor cantidad de sangre y el segundo permite observar mejor las características morfológicas de los parásitos. Las coloraciones generalmente usadas son: May Grunwald Giemsa y Giemsa diluida.

Diagnóstico de parásitos en esputo, aspirados y material de biopsia.

Distintos parásitos, como protozoos y helmintos, pueden diagnosticarse en materiales como: esputo, aspirados obtenidos de sigmoideoscopia, traqueobronquiales, de material quístico, absceso pulmonar, hepático, material de ganglio, bazo, hígado, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, de úlceras cutaneas y material de biopsia de piel, músculo, etc.

Las técnicas de coloración usadas son:

- Coloración de azul de toluidina y/ o metanamina de plata para *Pneumocystis carinii* en esputos y lavados broncoalveolares.
- Coloración de Ziehl-Neelsen para *Cryptosporidium parvum* en esputo.
- Coloración Tricrómica y/o hematoxilina férrica para *Entamoeba histolytica* en absceso pulmonar o hepático, aspirado de úlceras o bipsias de piel.
- Coloración de Giemsa para microfilarias en biopsias de piel o para diagnosticar tripanosomiasis africana, leishmaniosis o amebiasis en ganglios linfáticos, bazo, higado, médula ósea, etc.

3. TÉCNICAS DE CONCENTRACIÓN O ENRIQUECIMIENTO

La concentración fecal ha llegado a ser un procedimiento de rutina como parte de un examen completo para el diagnóstico de parásitos. La finalidad de la concentración de heces es separar los parásitos de la masa de material de la muestra, (formada por bacterias, alimento no digerido, etc.) y tratar de aumentar la cantidad de microorganismos para favorecer su visualización debido a que los parásitos microscópicos no se multiplican en las heces como lo hacen algunos de ellos en ciertas condiciones de cultivo *in vitro*.

A veces la cantidad de microorganismos en una muestra fecal es escasa. Esto puede suceder por intermitencia en la eliminación (característica de los parásitos), porque algunos parásitos eliminan pocos huevos, quistes u ooquistes durante su ciclo de vida, o bien porque el paciente es portador o ha recibido tratamiento antiparasitario.

Por estas causas se emplean métodos de concentración de heces por sedimentación, flotación o bien una combinación de los dos.

Un método de enriquecimiento siempre debe ir acompañado de una observación directa de la muestra no solo para evaluar la eficacia en el método de concentración empleado sino también porque estas técnicas generalmente no concentran los trofozoítos y en algunos casos puede presentarse esta forma parasitaria únicamente.

Técnicas de Sedimentación

Se basa en la concentración de elementos parasitarios por la acción de la gravedad, y se lleva a cabo suspendiendo las heces en agua corriente, agua destilada o solución salina y dejando que se verifique un asentamiento natural, o bien se puede acelerar el proceso mecánicamente por medio de la centrifugación.

Estos métodos son principalmente útiles para la concentración de quistes, ooquistes y huevos, es decir que son aplicables para casi todos los parásitos fecales y son recomendados de uso general cuando el diagnóstico no está orientado a ningún parásito en particular. La desventaja que tienen con respecto a los de flotación es que a veces la observación microscópica puede dificultarse por la presencia de la concentración de restos no parasitarios.

De seleccionarse una técnica de rutina se sugiere un método de sedimentación por las siguientes ventajas: es más fácil de realizar, está sujeto a menos errores técnicos, no requiere observación microscópica inmediata y es aplicable a la concentración de la mayoría de los parásitos intestinales.

Hay una gran variedad de métodos de sedimentación descritos en la bibliografía, se nombran algunos de ellos (desarrollados en el apéndice)

- 1- Sedimentación espontánea: Método de sedimentación sencilla
 - Método de sedimentación simple de Lumbreras
 - Método de Baermann- Moraes
- 2- Sedimentación por centrifugación: Método de Charles- Batherlemy
 - Método de formol-eter o Ritchie
 - Método de Acetato de Etilo (macro y micro técnicas)

Técnicas de Flotación

Al contrario que en la sedimentación, en la cual los parásitos microscópicos, que son más pesados que las bacterias, y las partículas de alimentos no digeridas van al fondo del recipiente, la flotación utiliza un medio líquido de suspensión más pesado que los parásitos y éstos suben a la superficie y pueden ser recogidos de la película superficial.

El primer método de concentración por flotación fue introducido por Bass (1906) para concentrar huevos de uncinarias en escaso número en las heces.

Para que el método sea útil, no basta con que el medio de suspensión sea más pesado que los objetos que han de flotar, sino que además no ha de producir retracciones en el parásito que impidan el reconocimiento.

La ventaja de estos métodos es que producen una preparación más limpia de deyección que el procedimiento de sedimentación, facilitando mucho su observación microscópica. Las desventajas es que aquellos parásitos con mayor peso específico que la solución empleada no flotarán (que es lo que a veces sucede con huevos infértiles de *Ascaris lumbricoides* o huevos operculados) y que el tiempo en que debe hacerse la observación microscópica es menor debido a que la película superficial puede destruirse y los parásitos caer al fondo del tubo.

Un laboratorio que utilice solo métodos de flotación puede no recuperar todos los parásitos presentes; para asegurar la detección de todos deberá examinar cuidadosamente no solamente la película superficial sino también el sedimento.

En este grupo hay también una gran cantidad de técnicas descriptas . A continuación se nombran las más utilizadas que están desarrolladas en el apéndice.

Método de Faust o de sulfato de Zinc 33%

Método de Willis Molloy o de solución saturada de cloruro de sodio

Método de Sucrosa de Sheather

Técnicas cuantitativas para huevos

Las técnicas de concentración dan oportunidad para la recuperación eficaz e identificación precisa de la mayoría de los parásitos intestinales, aunque no deja de reconocerse la necesidad de técnicas que permitan calcular la intensidad de la infección del paciente por ciertos helmintos, es decir, si ésta es leve, moderada o masiva. Se usan principalmente en ascariasis, tricocefalosis y uncinariasis y se basan en la cuantificación del número de huevos por gramo o miligramo de heces.

Es importante considerar que si bien los niveles de producción de huevos se denominan recuentos de huevos, en realidad son estimaciones que tienen probabilidades estadísticas de error y variación. Incluso la media de varios recuentos hechos en la misma muestra tiene unos márgenes predecibles de variación. Así, un solo recuento de huevos efectuado por el método más preciso y el personal más competente sólo indica de forma aproximada la cuantía de la carga de gusanos. El hecho de que los recuentos de huevos no constituyan realmente más que una estimación aproximada de su producción no significa que estas estimaciones no sean útiles o incluso esenciales para determinadas interpretaciones.

Estos procedimientos se practican en estudios clínicos o epidemiológicos para determinar el grado de infección de las helmintiasis. Sirven también para evaluar la eficacia del tratamiento.

Se han desarrollado métodos por medio del recuento de huevos presentes en las heces (ver apéndice), para el cálculo relativamente preciso del grado de infección

Técnica de Beaver de recuento directo de huevos

Técnica de recuento de huevos por dilución de Stoll- Hausheer

Técnica de Kato- Katz

ANEXO COLORACIONES

Solución de Lugol

Yodo (cristales pulverizados)	5 g
Yoduro de potasio	10 g
Agua destilada	100 ml

Disolver el KI en agua, luego incorporar lentamente los cristales de yodo. Agitar bien. La solución base filtrada se conservará estable por varios meses. Antes de usar, diluir unas cinco veces con agua destilada. Guardar las soluciones en botellas de cristal oscuro.

Solución de Dobell y O' Connor

Yodo (cristales pulverizados)	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Agua destilada	100 ml

Disolver el KI en agua, luego incorporar lentamente los cristales de yodo. Agitar bien. La solución filtrada está lista para usarse. Cuando la solución pierda fuerza pueden agregarse más cristales de yodo para recuperar la capacidad de coloración. Filtrar antes de usar (dos veces) para evitar una sobrecoloración. Guardar las soluciones en botellas de cristal oscuro.

Azul de metileno amortiguado

A 46,3 ml de una solución 0,2 M de ácido acético agregar 3,7 ml de una solución 0,2 M de acetato de sodio. A esta solución de pH 3,6, incorporar una pequeña cantidad de azul de metileno (0,06%).

Colorante eosina

Eosina	1 g
Alcohol 96%	10 ml
Agua destilada	90 ml

Coloración Tricrómica

Colorante tricromo:	
2R cromotropo	0,6 g
SF verde claro	0,3 g
Ac. fosfotúngstico	0,7 g
Ac. acético (glacial)	1 ml
Agua destilada	100 ml

Agregar 1 ml de ácido acético glacial a los componentes secos. Dejar la mezcla en reposo de 15 a 30 minutos para su saturación y luego agregar 100 ml de agua destilada.

Procedimiento:

Alcohol 70%	5 minutos*
Alcohol 70% que contiene solución de Lugol	2 a 5 minutos
Alcohol 70%	5 minutos*
Alcohol 70%	2 a 5 minutos*
Colorante	30 minutos
Alcohol 90% acidificado con ácido acético al 1%	3 segundos
Alcohol absoluto	humedecer
Alcohol absoluto	2 a 5 minutos
Alcohol absoluto	2 a 5 minutos
Xileno	2 pasos de 2 a 5 minutos*

* Pueden mantenerse varias horas o durante toda la noche

Coloración de hematoxilina férrica (Spencer – Monroe)

Colorante:	
Solución I: Hematoxilina	10 g
Alcohol absoluto	1000 ml

Mantenga el colorante en un frasco color caramelo y déjelo madurar en un lugar iluminado naturalmente durante por lo menos una semana.

Solución II: Sulfato ferroso amoniacal	10 g
Sulfato férrico amoniacal	20 g
Cl H concentrado	10 ml
Agua destilada	1000 ml

Solución de trabajo: mezclar partes iguales de las soluciones I y II. Esta solución de trabajo se conserva durante 7 días.

Procedimiento:

Alcohol 70%	5 minutos*
Alcohol 70% más solución de Lugol	2 a 5 minutos
Alcohol 70%	5 minutos
Agua corriente	10 minutos
Colorante	4 a 5 minutos
Agua corriente	10 minutos
Alcohol 70%	5 minutos*
Alcohol 95%	5 minutos*
Alcohol absoluto	5 minutos*
Alcohol absoluto	5 minutos*
Xileno	2 pasos de 5 minutos*

* Pueden mantenerse varias horas o durante toda la noche

Coloración de Kinyoun modificada

Colorante:

Solución A: disolver 4 g de fucsina básica en 20 ml de etanol al 95%.

Solución B: disolver 8 g de cristales de fenol en 100 ml de agua destilada.

Mesclar solución A y B.

Esta solución es estable un año a temperatura ambiente.

Procedimiento:

Cubrir con Carboxifucsina	1 a 5 minutos
Lavar con agua	
Decolorar con H ₂ SO ₄ 1%	1 minuto
Lavar con agua	
Cubrir con azul de metileno 1%	30 segundos a 1 minuto
Lavar con agua y secar	

Coloración de Ziehl Neelsen modificada

Colorante:

Solución A: disolver 0,3 g de fucsina básica en 10 ml de etanol al 95%.

Solución B: disolver 5 g de cristales de fenol en 100 ml de agua destilada.

Mesclar solución A y B.

Esta solución es estable un año a temperatura ambiente

Procedimiento:

Cubrir con carboxifucsina	
Calentar hasta desprendimiento de vapores	5 minutos
Lavar con agua	
Decolorar con H ₂ OS ₄ 1%	1 minuto
Lavar con agua	
Cubrir con azul de metileno 1%	1 minuto
Lavar con agua y secar	

Coloración de Safranina

Procedimiento:

Cubrir con metanol	5 minutos
Cubrir con Safranina al 1%	

Calentar dos veces hasta desprendimiento de vapores 5 minutos
 Lavar con agua
 Decolorar con HCl 3% metanol 5 segundos
 Lavar con agua
 Cubrir con azul de metileno 1% 1 minuto
 Lavar con agua y secar

Coloración May Grunwald Giemsa

Procedimiento:
 Cubrir con May Grunwald 5 minutos
 Agua estabilizada 1/50 2 a 3 minutos
 Cubrir con Giemsa diluido 15 a 20 minutos
 (15 gotas de Giemsa en 10ml de agua estabilizada)
 Lavar con agua

Coloración de Giemsa

Procedimiento:
 Cubrir con Giemsa diluido 30 a 60 minutos
 (1 ml de Giemsa en 20 ml de agua estabilizada o 1 gota c/ ml de agua estabilizada)
 Lavar con agua

Coloración de azul de toluidina

Colorante:
 Azul de toluidina 0,16 g
 (ajustar la cantidad según el contenido de colorante a usar)
 Agua destilada 60 ml
 Acido clorhídrico 2 ml
 Etanol absoluto 140 ml

Disolver el colorante en el agua, agregar lentamente el ácido clorhídrico y finalmente el alcohol. Estable un año.

Reactivo de sulfatación:

Colocar un vaso de Koplín en un recipiente en agua con hielo. Verter 45 ml de ácido acético glacial dentro del vaso y agregar 15 ml de ácido sulfúrico. Mezclar suavemente y cerrar muy bien. Debe prepararse todas las semanas.

Procedimiento:
 Reactivo de sulfatación 10 minutos
 (mezclar inmediatamente y después de 5 minutos)
 Agua corriente 5 minutos
 (absorber el exceso en papel de filtro)
 Azul de toluidina 3 minutos
 (absorber el exceso en papel de filtro)
 Etanol 96° 10 segundos
 Etanol 96° 10 segundos
 Etanol absoluto 10 minutos
 Xileno (dos cambios) 10 segundos
 Secar y colocar bálsamo

Coloración Tricrómica modificada

Procedimiento:
 Metanol 10 minutos
 Colorear con cromotropo a 50° 10 minutos
 Alcohol ácido 14 segundos
 Alcohol 95° 5 minutos
 Alcohol absoluto 10 minutos
 Xileno 10 minutos
 Dejar secar y colocar bálsamo.

ANEXO TECNICAS DE CONCENTRACIÓN

Sedimentación espontánea

Método de Sedimentación sencilla

1. Homogeneizar unos 10 gramos de heces en 10 veces su volumen de agua corriente.
2. Verter la materia fecal en copas de vidrio o vasos de precipitado de 250 a 500 ml.
3. Dejar que sedimente durante 1 hora.
4. Eliminar por sifón los dos tercios superiores, o verterlos con cuidado, para eliminar los detritos.
5. Agregar agua hasta llenar casi el recipiente y resuspender las heces con varilla.
6. Repetir la operación 1 o 2 veces más hasta que el sobrenadante quede relativamente límpido.
7. Eliminar este último líquido y con una pipeta obtener una pequeña porción del sedimento para observación microscópica.

Este método es lento y de poca concentración para los protozoos intestinales. Para los huevos de helmintos, si bien es lento, tiene la ventaja de que sedimentan en el fondo del recipiente en un estado viable y sin deformación.

Método de Lumbreras modificado

Se utiliza para el hallazgo de huevos de *Fasciola hepática* en materia fecal o bilis. Para estos huevos no se puede utilizar un método de centrifugación pues se rompen ni uno de flotación porque son muy pesados.

1. Colocar 2 ml de la muestra (heces o bilis) en una copa de Lumbreras o tubo de centrifuga.
2. Agregar 5 ml de solución detergente al 10% para emulsionar las grasas.
3. Agregar 0,5 ml de alumbre férrico al 1% para favorecer el gradiente de densidad.
4. Homogeneizar suavemente.
5. Dejar en reposo 30 minutos.
6. Sacar con pipeta pasteur una gota del fondo de la copa.
7. Observar microscópicamente.

Método de Baermann- Moraes

Esta técnica es para la separación de larvas, se emplea principalmente en estroñquiloïdiosis, para concentrarlas a partir de heces, cultivos o tierra.

1. Colocar un embudo en un soporte vertical, agregando al vástago del embudo una goma de caucho cerrada con una pinza.
2. Verter agua en el embudo, a temperatura de 37°- 42°, hasta cerca del borde.
3. Colocar sobre el embudo una malla metálica o colador, cubierto con gasa doble de tal forma que haga contacto con el agua tibia.
4. Poner sobre la gasa 8 a 10 gramos de materia fecal, tierra o material de cultivo. Puede ponerse una bolsa con hielo en la parte superior del colador para acelerar el proceso.
5. Dejar de 60 a 90 minutos.
6. Las larvas migran por diferencia de temperatura y sedimentan en la porción de la goma de caucho de donde se colectan en un tubo por apertura de la pinza.

Sedimentación por centrifugación

Método de Charles Barthelemy modificada por Bacigalupo y Rivero

1. Mezclar 10 gramos de heces con 50 ml de solución fisiológica, o agua de la canilla.
2. Tamizar a través de un colador metálico.
3. Filtrar sobre gasa en un embudo.
4. Recoger 10 ml del filtrado en un tubo de centrifuga.
5. Centrifugar 5 minutos a 1500 r.p.m. Descartar el sobrenadante.
6. Repetir esta operación 3 veces o hasta que el sobrenadante quede límpido.
7. Resuspender el sedimento con solución fisiológica o agua de la canilla más 2 ml de éter sulfúrico. Tapar con tapón de goma y agitar vigorosamente para extraer las grasas.
8. Centrifugar 1 minuto a 1500 r.p.m. Descartar el tapón graso de un golpe seco, conservando el sedimento.
9. Examinar microscópicamente el sedimento.

Método de formol- éter o de Ritchie

1. Mezclar 10 gramos de heces con 50 ml de solución fisiológica, o agua de la canilla.
2. Tamizar a través de un colador metálico.
3. Filtrar sobre gasa en un embudo.
4. Recoger 10 ml del filtrado sobre un tubo de centrifuga.
5. Centrifugar 5 minutos a 1500 r.p.m. Descartar el sobrenadante.
6. Repetir esta operación 3 veces o hasta que el sobrenadante quede límpido.
7. Resuspender el sedimento con formol 10%. Dejar 10 minutos en reposo.
8. Agregar 2 ml de éter sulfúrico. Tapar con tapón de goma y agitar vigorosamente para extraer las grasas.
9. Centrifugar 1 minuto a 1500 r.p.m. Descartar el tapón graso de un golpe seco, conservando el sedimento.
10. Examinar microscópicamente el sedimento.

Método de Acetato de Etilo (macro y micro método)

Macro método

1. Mezclar 10 gramos de heces con 50 ml de solución fisiológica, o agua de la canilla.
2. Tamizar a través de un colador metálico.
3. Filtrar sobre gasa en un embudo.
4. Recoger 10 ml del filtrado sobre un tubo de centrifuga.
5. Centrifugar 5 minutos a 1500 r.p.m. Descartar el sobrenadante.
6. Repetir esta operación 3 veces o hasta que el sobrenadante quede límpido.
7. Resuspender el sedimento con formol 10%. Dejar 10 minutos en reposo.
8. Agregar 2 ml de acetato de etilo. Tapar con tapón de goma y agitar vigorosamente para extraer las grasas.
9. Centrifugar 1 minuto a 1500 r.p.m. Descartar el tapón graso de un golpe seco, conservando el sedimento.
10. Examinar microscópicamente el sedimento.

Micro método

1. Colocar en un tubo de eppendorf 0,5 ml de materia fecal.
2. Hacer un lavado por centrifugación con agua destilada o de la canilla a 1500 rpm 5 minutos.
3. Retirar el sobrenadante con pipeta pasteur.
4. Agregar 0,3 ml de acetato de etilo.
5. Tapar el tubo y agitar vigorosamente para extraer las grasas.
6. Centrifugar 1 minuto a 1500 r.p.m. Descartar el tapón graso de un golpe seco, conservando el sedimento.
7. Examinar microscópicamente el sedimento.

Métodos de Flotación

Método de Faust o de sulfato de Zinc 33%

Esta técnica es especialmente útil para quistes, huevos de *Enterobius vermicularis* y huevos de *Hymenolepis nana*. Todos los elementos parasitarios, con excepción de los huevos más pesados que el medio de flotación, se recuperan en altas concentraciones y en condición viable. La concentración de sulfato de zinc más útil para hacer flotar los elementos parasitarios más comunes tiene un peso específico de 1.180.

Phillipson usó sulfato de magnesio ($MgSO_4$) en lugar de sulfato de zinc obteniendo la flotación de huevos de *Clonorchis* y *Opisthorchis* en heces.

1. Mezclar 10 gramos de heces con 50 ml de solución fisiológica, o agua de la canilla.
2. Tamizar a través de un colador metálico.
3. Filtrar sobre gasa en un embudo.
4. Recoger 10 ml del filtrado sobre un tubo de centrifuga.
5. Centrifugar 5 minutos a 1500 r.p.m. Descartar el sobrenadante.
6. Repetir esta operación 3 veces o hasta que el sobrenadante quede límpido.

7. Agregar al sedimento final 2 o 3 ml de solución de sulfato de zinc 33% y homogeneizar con varilla.
8. Completar con sulfato de zinc el tubo de centrifuga sin volver a homogeneizar.
9. Centrifugar 1 o 2 minutos a 1500 r.p.m.
10. Extraer con aro de alambre unas gotas de la película superficial sin retirar el tubo de la centrifuga o haciéndolo con sumo cuidado para evitar que por agitación se destruya la película.

Solución saturada de sulfato de zinc al 33%

Sulfato de zinc puro	333 g
Agua destilada	c.s.p. 1000 ml

Método de Willis Molloy o de solución saturada de cloruro de sodio

Esta técnica no requiere centrifuga y es útil, principalmente, para huevos de uncinarias, Ascaris, Trichuris y de Hymenolepis, que flotan fácilmente, pero también sirve para otros parásitos. Se utiliza con mucha frecuencia en parasitología veterinaria, por la facilidad de realización en el campo.

Los huevos de los helmintos intestinales más comunes, no se dañan por este proceso, pero los de Schistosoma, larvas de uncinarias y Strongyloides, así como los quistes de protozoarios, se contraen bastante. Otra desventaja es que los huevos de Clonorchis, Opisthorchis y otras especies tienen un peso específico mayor que el de la solución saturada y no flotan en ella.

1. Disolver sal de cocina en agua caliente hasta que haya saturación; la solución debe tener como mínimo, una densidad de 1,20.
2. Mezclar aproximadamente 1 gramo de heces con 10 o 20 ml de la solución saturada.
3. Trasladar la mezcla a un tubo o probeta, y llenar con la solución hasta el borde.
4. Tomar 1 o 2 gotas de la película superficial con aro de alambre o pipeta pasteur.
5. Observar al microscopio.

Método de Sucrosa de Sheather

Este método es útil para quistes y huevos livianos, y especialmente se lo recomienda para la concentración de ooquistes de Cryptosporidium sp. pues los ooquistes flotan de manera diferencial a las levaduras en una capa de líquido más arriba que éstas exhibiendo una tonalidad rosada característica que permite su identificación sin necesidad de coloración permanente.

1. Filtrar con gasa la materia fecal.
2. Lavar con agua de la canilla o agua destilada por centrifugación hasta sobrenadante límpido.
3. Agregar 2 o 3 ml de solución de Sheather al sedimento fecal.
4. Mezclar suavemente con varilla de vidrio.
5. Dejar reposar 3 minutos o centrifugar 1 minuto a 1500 rpm.
6. Retirar 1 o 2 gotas de la película superficial.
7. Observar al microscopio.

Solución de sucrosa de Sheather

Sacarosa	500 g
Fenol	6,5 g
Agua destilada	320 ml

Técnicas cuantitativas para huevos

Técnica de Beaver de recuento directo de huevos

Es el más simple y razonablemente seguro cuando es realizado por una persona experimentada. En el método original Beaver utilizó una célula fotoeléctrica calibrada para preparar un frotis de exactamente 2 mg de heces. Para exámenes de rutina éste no resulta práctico, y por consiguiente el procedimiento ha sido modificado de modo que se prepara un frotis directo de heces de aproximadamente 2 mg. Los recuentos de huevos en el frotis son comunicados como huevos por frotis y pueden efectuarse los cálculos apropiados para determinar huevos por gramo de heces.

Técnica de recuento de huevos por dilución de Stoll- Hausheer

Este es el procedimiento más ampliamente usado con el propósito de estimar la carga de gusanos. Se utiliza un matraz con líneas grabadas al nivel de 56 y 60 ml. para facilitar el llenado con hidróxido de sodio y materia fecal.

1. En un matraz calibrado poner 0,1 N de hidroxido de sodio hasta la marca 56 ml.
2. Agregar materia fecal al matraz hasta la marca de 60 ml. Esta cantidad de heces equivale a 4 gramos.
3. Agregar perlas de vidrio y agitar vigorosamente para lograr una suspensión uniforme. Si la muestra es consistente, puede colocarse en la heladera durante la noche antes de agitarlo para facilitar su desmenuzamiento.
4. Con pipeta calibrada retirar rápidamente 0,15 ml. de suspensión y colocarla en un portaobjeto.
5. Contar los huevos en el microscopio sin usar cubreobjeto.
6. Multiplicar el resultado por 100 para obtener la cantidad de huevos por gramo de heces.
7. La estimación (huevos por gramo) obtenida variará según la consistencia de las heces. Los valores de corrección que deben usarse para convertir la estimación son:

- x 1,5 para deposición formada
- x 2 para deposición semiformada
- x 3 para deposición semilíquida
- x 4 para deposición líquida.

Los recuentos de huevos en muestras líquidas generalmente no son seguros; los recuentos más precisos son los obtenidos de muestras formadas o semiformadas

Método de dilución de Stoll modificado

1. Llenar un tubo de centrifuga de 15 ml, graduado, hasta la marca de 14 ml con hidróxido de sodio 0,1 N.
2. Agregar heces hasta alcanzar la marca de 15 ml.
3. Mezclar con varilla.
4. Si la deposición es dura, dejar la suspensión en reposo durante varias horas.
5. Agitar el tubo hasta que el contenido se mezcle por completo y extraer rápidamente 0,15 ml de suspensión.
6. Transferir el material a un portaobjeto, cubrirlo con un portaobjeto y contar los huevos en toda la preparación
7. Multiplicar el número de huevos contados por 100 y aplicar las correcciones como en el método anterior.

Técnica de Kato- Katz

El método es útil para el recuento de huevos de helmintos, pero es poco sensible para infecciones leves.

Se coloca 1 gramo de heces sobre un trozo de papel de aluminio. Sobre la muestra se dispone una malla metálica o plástica fina, y se raspa sobre el tamiz con una jeringa de tuberculina sin punta hasta que la deposición llegue a una marca hecha previamente y que corresponde a un volumen de 35 mm³ (aproximadamente 50 gramos de heces) Para esto existen medidas en el comercio. La deposición se coloca sobre un portaobjeto y se cubre con papel celofán empapado en solución de verde de malaquita (1ml de verde de malaquita al 3% en solución acuosa en 100 ml de agua destilada y 10 ml de glicerina pura 50 ml). El portaobjeto se invierte y sobre una superficie dura se presiona suavemente para extender la muestra. Posteriormente se deja clarificar la preparación durante una hora a temperatura ambiente. Se cuentan los huevos.

El número de huevos se calcula con la siguiente fórmula:

Huevos/ g de heces = Número huevos contados (20x) / factor de consistencia

El factor de consistencia es 1 para deposición sólida, 2 para semisólida y 3 para la líquida.