

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

**Serie de Normas  
Técnicas N° 37**

**Lima - 2003**



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

**Serie de Normas  
Técnicas N° 37**

**Lima - 2003**

**MINISTERIO DE SALUD**

**Ministro**

Dr. Fernando Carbone Campoverde

**Viceministro**

Econ. Carlos Rodríguez Cervantes

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD**

**Jefe**

Dr. Luis Fernando Llanos Zavalaga

**Subjefe**

Dra. Aída Cecilia Palacios Ramírez

**Centro Nacional de Salud Pública**

Dra. Susana Zurita Macalupú  
Directora General

**Centro Nacional de Alimentación  
y Nutrición**

Dr. Napoleón Chávez Villanueva  
Director General

**Centro Nacional de Control de Calidad**

Dra. Rosa Guevara Ormeño  
Directora General

**Centro Nacional de Producción de Biológicos**

Q. F. Ricardo Valera Sánchez  
Director General

**Subcomité Editor  
Instituto Nacional de Salud**

**Presidente**

Dra. Aída Palacios Ramírez

**Secretario Técnico**

Dr. César Cabezas Sánchez

**Miembros**

Dr. Jorge Alarcón Villaverde  
Q.F. Zulema Arévalo Chong  
Dr. Jorge Barnaby Rodríguez  
Dr. Zuño Burstein Alva  
Lic. Iván Gómez-Sánchez Prieto  
Dra. Ivonne Guerrero Alva  
Dr. Alfredo Guillén Oneeglio  
Dr. César Náquira Velarde  
Dr. Enrique Pérez Ramos  
Lic. Margarita Rodríguez Gutarra  
Dr. Víctor Suárez Moreno  
Dr. Jorge Zegarra Berndt

**Editor**

Dr. Leonid Lecca García

**Portada:** Frontis del local central del Instituto Nacional de Salud.

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

## **ELABORACIÓN:**

**María Beltrán Fabián de Estrada**

*Bióloga*

*Laboratorio de Enteroparásitos*

*División de Parasitología*

*Centro Nacional de Salud Pública*

*Instituto Nacional de Salud*

**Raúl Tello Casanova**

*Médico, Doctor en Medicina*

*Ex miembro del Laboratorio de Enteroparásitos*

*División de Parasitología*

*Centro Nacional de Salud Pública*

*Instituto Nacional de Salud*

**César Náquira Velarde**

*Médico, Doctor en Medicina*

*División de Parasitología*

*Centro Nacional de Salud Pública*

*Instituto Nacional de Salud*

## Catalogación hecha por el Centro de Documentación e Información del INS

Beltrán Fabián de Estrada, María ; Tello Casanova, Raúl ; Náquira Velarde, César  
Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos  
intestinales del hombre / Elaborado por María Beltrán Fabián de Estrada ; Raúl Tello  
Casanova y César Náquira Velarde. — Lima : Ministerio de Salud, Instituto Nacional de  
Salud, 2003.

90 p. : 30 cm. — (Serie de Normas Técnicas; 37)

1. PARASITOSIS INTESTINALES /diagnóstico 2. TECNICAS Y  
PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO /normas

- I. Beltrán Fabián de Estrada, María
- II. Tello Casanova, Raúl
- III. Náquira Velarde, César
- IV. Instituto Nacional de Salud (Perú)
- V. Perú. Ministerio de Salud

ISBN 9972 – 857 – 26 – 3 (O.C.)

ISBN 9972 – 857 – 35 – 2 (N°37)

ISSN 1607 – 4904

Hecho el Depósito Legal N° 1501152003-1288

©Ministerio de Salud, 2003

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

Telf.: 431-0410

©Instituto Nacional de Salud, 2003

Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú

Telf.: 471-9920 Fax 471-0179

e-mail: [postmaster@ins.gob.pe](mailto:postmaster@ins.gob.pe)

Página Web: [www.ins.gob.pe](http://www.ins.gob.pe)

Publicación aprobada con R.J. N° 171-2003-J-OPD/INS

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

**CONTENIDO**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>V</b>
<b>SECCIÓN 1: GENERALIDADES</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivo	1
1.2 Campo de aplicación	1
1.3 Responsabilidades	1
1.4 Documentos de referencia	1
1.5 Definiciones y abreviaturas	2
<b>SECCIÓN 2: MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD</b>	<b>5</b>
2.1 Responsabilidades	5
2.2 Campo de aplicación	5
<b>SECCIÓN 3: OBTENCIÓN DE LA MUESTRA</b>	<b>6</b>
3.1 Condiciones generales	6
3.2 Muestra para el examen parasitológico	7
<b>SECCIÓN 4: ENVÍO Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA</b>	<b>8</b>
4.1 Objetivo	8
4.2 Condiciones específicas	8
4.3 Procedimiento	9
4.4 Rechazo de una muestra	9
<b>SECCIÓN 5: PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO PARÁSITOLÓGICO - HECES</b>	<b>10</b>
5.1 Examen directo macroscópico	10
5.2 Examen directo microscópico	11
5.3 Métodos de concentración	12
5.4 Método cuantitativo de Kato - Katz (análisis cuantitativo = hpg)	23
5.5 Métodos de coloración para protozoarios	26
5.6 Métodos de coloración para helmintos	34
5.7 Fijadores y/o conservadores	37
<b>SECCIÓN 6: CULTIVOS PARASITOLÓGICOS</b>	<b>42</b>
6.1 Medios de cultivo para protozoos	42
6.2 Métodos de desarrollo para helmintos	44
<b>SECCIÓN 7: EXAMEN DE SECRECIONES Y/O FLUIDOS</b>	<b>48</b>
7.1 Espudo	48
7.2 Aspirados, secreciones o jugo duodenal	49
7.3 Secreción, fluido y contenido intestinal	50

<b>SECCIÓN 8:</b>	<b>DIAGNÓSTICO DE <i>Enterobius vermicularis</i> POR EL MÉTODO DE GRAHAM (CINTA ADHESIVA TRANSPARENTE)</b>	<b>51</b>
8.1	Fundamento	51
8.2	Materiales	51
8.3	Procedimiento	51
8.4	Observación	51
8.5	Resultado	51
<b>SECCIÓN 9:</b>	<b>EXAMEN DE BIOPSIAS</b>	<b>53</b>
9.1	Biopsias del tubo digestivo	53
9.2	Recomendaciones	53
<b>SECCIÓN 10:</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>54</b>
10.1	Generalidades	54
10.2	Resultado positivo	54
10.3	Resultado negativo	54
10.4	Formato para entrega de resultados	55
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>56</b>
<b>ANEXOS</b>		
ANEXO A:	PRINCIPALES PARÁSITOS INTESTINALES DEL HOMBRE	57
ANEXO B:	ALGORITMOS PARA EL EXAMEN PARASITOLÓGICO	63
ANEXO C:	PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y COLORANTES	66
ANEXO D:	CLAVES DE IDENTIFICACIÓN DE LOS PROTOZOARIOS (AMEBAS Y FLAGELADOS) Y HELMINTOS	73
ANEXO E:	ELEMENTOS QUE SE PUEDEN CONFUNDIR CON PARÁSITOS INTESTINALES	78
ANEXO F:	REGISTRO DE LOS PARÁSITOS INTESTINALES EN EL LABORATORIO POR MES Y POR AÑO	82
ANEXO G:	FICHA PARA EL ESTUDIO DEL CULTIVO DE <i>Entamoeba histolytica</i> (cepa)	85
ANEXO H:	PARÁSITOS NO INTESTINALES: Paragonimus y Fasciola (Distomatosis pulmonar y hepática)	86
ANEXO I:	MICROMETRÍA	89

## INTRODUCCIÓN

Dentro de los problemas de salud pública que el país debe enfrentar, una en especial ha elevado su tasa de prevalencia convirtiéndose en una grave dificultad en sectores de menores recursos, se trata del parasitismo intestinal, problema que agrava más aún la ya golpeada salud de la población.

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

Los parásitos intestinales, son protozoos o helmintos que en sus estadios evolutivos pueden encontrarse en las heces, secreciones, fluidos y frotis perianal de las personas. Estos parásitos afectan el desarrollo intelectual y nutricional de esta población convirtiéndose en otro factor en contra de su economía.

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

El Instituto Nacional de Salud, a través de la División de Parasitología, ha elaborado el presente manual con la finalidad de brindar una herramienta útil en el proceso de acondicionamiento de los procedimientos de laboratorio.

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

Este manual detalla los procedimientos más apropiados para el diagnóstico de los enteroparásitos descritos en nuestro medio y se espera que sea una ayuda inmediata y sencilla para el personal técnico y profesional de los laboratorios locales, intermedios y regionales de la Red Nacional de Laboratorios en Salud Pública del país.

## SECCIÓN 1

### GENERALIDADES

#### 1.1 OBJETIVO

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

#### 1.2 CAMPO DE APLICACIÓN

Se aplica en laboratorios de establecimientos de salud del sistema de la Red Nacional de Laboratorios en Salud Pública.

#### 1.3 RESPONSABILIDADES

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

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

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

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

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

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

#### 1.4 DOCUMENTOS DE REFERENCIA

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

1.4.2 **Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras (I). Segunda Edición. Lima: INS, 1997. Serie de Normas Técnicas N° 15.

1.4.3 **Instituto Nacional de Salud.** Normas de bioseguridad. Segunda Edición: Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N° 18.

1.4.4 **Instituto Nacional de Salud.** Manual de laboratorio del nivel local. Lima: INS; 1993.

## 1.5 **DEFINICIONES Y ABREVIATURAS**

1.5.1 **AFA:** fijador conteniendo alcohol, formol y ácido acético.

1.5.2 **antígeno:** sustancia generalmente de naturaleza proteica, capaz de provocar una respuesta del sistema inmunitario.

1.5.3 **anticuerpo:** inmunoglobulina que es capaz de reaccionar con antígenos y provocar su neutralización o modificación.

1.5.4 **aplicador:** trozo de madera tipo bajalenguas.

1.5.5 **bioseguridad:** conjunto de medidas de protección contra cualquier tipo de acción que ponga en peligro la salud del ser humano.

1.5.6 **CI:** código internacional.

1.5.7 **cápsula ovígera:** vesícula que contiene huevos.

1.5.8 **céstode:** gusano o helminto platelminto de forma acintada.

1.5.9 **centrifugación:** sedimentación del contenido de una suspensión mediante la fuerza centrífuga.

1.5.10 **colorante vital:** colorante que permite ver la estructura interna del parásito vivo.

1.5.11 **copro-antígeno:** antígeno presente en las heces.

1.5.12 **crystal de Charcot - Leyden:** cristales de proteínas provenientes de los gránulos de eosinófilos, que se destruyen en el intestino.

1.5.13 **diafanizar:** aclarar para facilitar la visualización microscópica

1.5.14 **diagnóstico parasitológico:** demostración directa o indirecta de alguna forma o estadio evolutivo del parásito.

1.5.15 **enteroparásito:** parásito que tiene por hábitat el tubo digestivo, especialmente el intestino.

1.5.16 **espora:** esporoquiste aislado.

1.5.17 **esporoquiste:** quiste con cubierta definida que contiene esporozoítos

- 1.5.18 **estróbila:** porción del cuerpo de las tenias o céstodes formadas por una cadena de proglótidos.
- 1.5.19 **fijación:** conservación de la estructura del parásito.
- 1.5.20 **heces:** mezcla de productos de excreción y secreción que se eliminan por el intestino.
- 1.5.21 **helminto:** ser pluricelular con exoesqueleto flexible, ausencia de apéndices y con movimientos reptantes.
- 1.5.22 **hpg:** número de huevos por gramo de heces.
- 1.5.23 **huevo:** producto de la fecundación con potencialidad de desarrollar un nuevo ser.
- 1.5.24 **herida:** pérdida de piel y potencial puerta de entrada de agentes patógenos.
- 1.5.25 **invasivo(a):** agente infectante que tiene capacidad de invadir tejidos.
- 1.5.26 **larva:** estadio evolutivo de algunos seres vivos como los helmintos y los artrópodos en quienes aún no se han desarrollado los aparatos genitales.
- 1.5.27 **MIF:** fijador que contiene merthiolate, yodo y formol.
- 1.5.28 **montar:** colocar el espécimen entre lámina y laminilla con bálsamo de Canadá para su conservación permanente.
- 1.5.29 **nemátode:** gusano o helminto de forma cilíndrica.
- 1.5.30 **neutralizar:** incorporación de un agente químico a la muestra biológica capaz de eliminar todo agente vivo.
- 1.5.31 **ooquiste:** quiste que contiene el huevo o cigote.
- 1.5.32 **organoléptico:** características orgánicas de una sustancia (consistencia, color, olor, etc).
- 1.5.33 **PAF:** fijador y/o conservador conteniendo fenol, alcohol y formol para muestras con parásitos, sobre todo protozoarios.
- 1.5.34 **PVA:** alcohol polivinílico, fijador para conservar los parásitos en muestras fecales.
- 1.5.35 **parásito:** ser vivo de escala zoológica inferior que vive a expensas de otro de escala superior.
- 1.5.36 **patogenicidad:** capacidad de producir daño.
- 1.5.37 **protozoario:** ser unicelular.

- 1.5.38 **proglótide:** segmento o anillo de la estróbila de las tenias o céstodes y que puede ser inmaduro, maduro o grávido, según el estadio de desarrollo de sus aparatos genitales.
- 1.5.39 **quiste:** forma de resistencia de los protozoos, los cuales se rodean de una membrana dura e impermeable.
- 1.5.40 **solución sobresaturada:** solución en la cual el soluto está en su máxima concentración.
- 1.5.41 **trofozoíto:** forma vegetativa, libre y en movimiento de los protozoos.
- 1.5.42 **tremátode:** gusano aplanado o platelminto, que presenta su cuerpo indivisible.

## SECCIÓN 2

### MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

#### 2.1 RESPONSABILIDADES

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

#### 2.2 CAMPO DE APLICACIÓN

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

##### 2.2.1 Del personal

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

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

##### 2.2.2 Tipos de agentes

2.2.2.1 Considerar como material de alto peligro las muestras frescas y de pacientes con VIH.

##### 2.2.3 La vestimenta

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

##### 2.2.4 Área de examen de las muestras

2.2.4.1 Debe ser una sola dentro del laboratorio.

##### 2.2.5 Envío de muestras al laboratorio

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

##### 2.2.6 En casos de accidentes

##### 2.2.7 El laboratorio

##### 2.2.8 Neutralización y eliminación del material biológico

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

## SECCIÓN 3

### OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

#### 3.1 CONDICIONES GENERALES

- 3.1.1 Los parásitos intestinales del hombre son protozoarios y/o helmintos, llamados comúnmente gusanos intestinales (Anexo A). Estos helmintos o gusanos pueden ser cilíndricos (nematodos), anillados o segmentados (céstodes).
- 3.1.2 Para observar los trofozoítos, quistes u ooquistes de los protozoarios, así como las larvas y huevos de helmintos, se debe usar un microscopio; en cambio, la mayor parte de los gusanos o helmintos adultos son macroscópicos y su morfología puede estudiarse directamente, con ayuda de un estereoscopio o una lupa.
- 3.1.3 Los protozoarios intestinales eliminan con las heces sus formas evolutivas (trofozoíto, quiste, ooquiste y espora), según la especie involucrada.
- 3.1.4 Los helmintos intestinales adultos (proglótidos de *Taenia* sp., *Enterobius vermicularis* y *Ascaris lumbricoides*) pueden salir al exterior espontáneamente o después del tratamiento.
- 3.1.5 Los gusanos intestinales se eliminan con las heces.
- 3.1.6 Los métodos de diagnóstico de los parásitos intestinales pueden ser: directo o por concentración de los elementos parasitarios que se eliminan en las heces.
- 3.1.7 En las heces podemos encontrar formas adultas y microscópicas (huevos, larvas, trofozoitos, quistes, ooquistes y esporas) de los parásitos intestinales; por ello, es importante obtener una buena muestra fecal, así como la conservación óptima del espécimen.
- 3.1.8 La muestra debe ser obtenida (entre 3 y 6 gramos) lo más fresca posible (máximo 90 minutos, si se busca *Entamoeba histolytica*), y depositada en un frasco de boca ancha con tapa rosca y rotulada correctamente con los datos de identificación.
- 3.1.9 La muestra debe obtenerse antes del uso de medicamentos antiparasitarios, o hasta 2 a 5 días después de su administración.
- 3.1.10 Las heces depositadas en el suelo no son las recomendadas para el diagnóstico, debido a que pueden contaminarse con formas biológicas, como por ejemplo: larvas similares a los enteroparásitos del hombre, larvas de nemátodos, huevos de ácaros o insectos, etc.
- 3.1.11 Si el paciente no es regular en la evacuación de sus deposiciones y ha evacuado en la noche anterior al examen, se recomienda guardar la muestra en una refrigeradora o en un lugar fresco no expuesto a la luz solar, para que no se alteren las formas parasitarias. Cuando la muestra va a demorar en llegar al laboratorio varias horas o días, se recomienda adicionarle líquido fijador y/o conservador (PAF, PVA, formalina 10%, SAF, acetato de sodio, etc.).

3.1.12 En algunos parasitismos relacionados al parasitismo intestinal, es necesario el examen de bilis, esputo, secreción, biopsia, tejido de necropsia o frotis perianal.

## **3.2 MUESTRA PARA EXAMEN PARASITOLÓGICO**

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

### **3.2.1 Heces**

#### 3.2.1.1 Características de la muestra

- a. Recipiente o contenedor: boca ancha, con tapa rosca.
- b. Cantidad : 3 - 6 g
- c. Condiciones óptimas: No estar mezclado con orina, que no exista el antecedente de haber ingerido bario u otros productos de contraste, y llevar la muestra al laboratorio en corto tiempo (de 2 - 4 horas de su obtención).

#### 3.2.1.2 Registro de datos

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

#### 3.2.1.3 Procesamiento de la muestra

- a. Debe realizarse lo antes posible y en un lugar apropiado (que no le llegue la luz directa). Las muestras diarreicas y las que contienen sangre, deben examinarse en forma macroscópica y microscópica apenas lleguen al laboratorio.
- b. Se aplicará la metodología correspondiente (Anexo B).
- c. Los reactivos y colorantes empleados en el procesamiento deben estar en envases adecuados, mantenerse fuera de los rayos del sol o luz, etiquetados (con nombre y fecha de preparación), sometidos a un control periódico y con una preparación proporcional a la demanda (Anexo C).

#### 3.2.1.4 Reporte de resultados

Escribir el nombre completo de los parásitos, indicando el estadio evolutivo y su densidad en la muestra (Sección 10).

## SECCIÓN 4

## ENVÍO Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

## 4.1 OBJETIVO

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

## 4.2 CONDICIONES ESPECÍFICAS

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

**Tabla N° 1. Condiciones del envío de la muestra según el tipo y tiempo de demora en llegar al laboratorio para el diagnóstico parasitológico.**

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



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

**Figura N° 1. Requisitos para la remisión de la muestra de heces**

### **4.3 PROCEDIMIENTO**

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

### **4.4 RECHAZO DE UNA MUESTRA**

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

## SECCIÓN 5

### PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO - HECES

#### 5.1 EXAMEN DIRECTO MACROSCÓPICO

##### 5.1.1 Fundamento.

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

##### 5.1.2 Materiales.

5.1.2.1 Suero fisiológico (Anexo C).

5.1.2.2 Aplicador (bajalengua).

5.1.2.3 Pinza de metal.

5.1.2.4 Coladera de plástico o malla metálica.

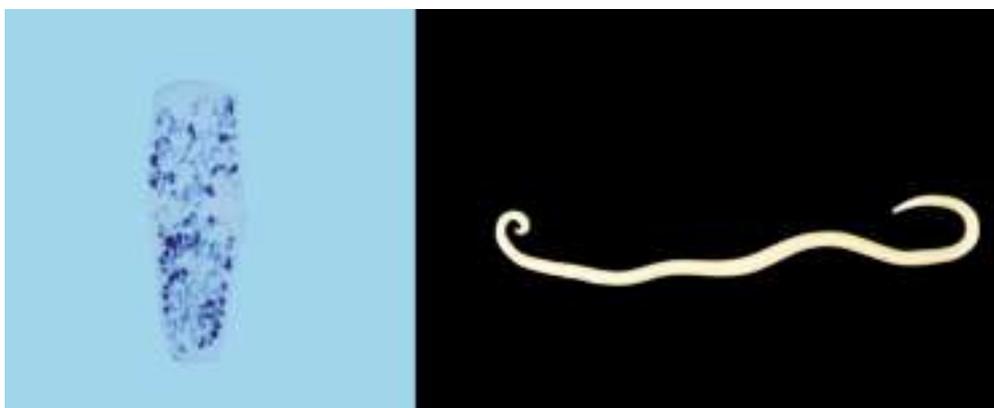
##### 5.1.3 Procedimiento.

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

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

##### 5.1.4 Observación.

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



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

### 5.1.5 Resultado.

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

## 5.2 EXAMEN DIRECTO MICROSCÓPICO

### 5.2.1. Fundamento.

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

### 5.2.2 Materiales (Figura N° 3)

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



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

### 5.2.3 Procedimiento.

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

### 5.2.4 Observación (Figura N° 4)

- 5.2.4.1 Observar al microscopio a 10X ó 40X. No es aconsejable usar objetivo de inmersión (100X), pues se puede ensuciar el microscopio.
- 5.2.4.2 Recorrer la lámina siguiendo un sentido direccional, ejemplo: de derecha a izquierda, o de arriba a abajo.

### 5.2.5 Resultado

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

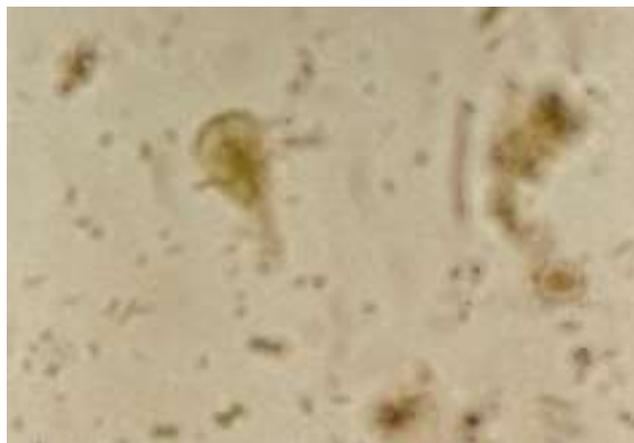


Figura N° 4. Trofozoito de *Giardia lamblia* con solución lugol (200X)

## 5.3 MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN

Los trofozoítos, quistes, ooquistes, larvas y huevos, pueden concentrarse por diversos procedimientos, lo cual permite corroborar el hallazgo del método directo y conocer la intensidad del enteroparasitismo. Estos procedimientos de concentración pueden ser: flotación, sedimentación, o por combinación de

ambos métodos. La elección de cada procedimiento dependerá de las facilidades del laboratorio, el adiestramiento del personal, la procedencia de la muestra (zona geográfica), el conocimiento de la prevalencia de los parásitos (zona costeña, andina y selvática o área rural o urbana), y la especie del parásito que se desea investigar.

### 5.3.1 Métodos de concentración por sedimentación.

#### 5.3.1.1 Técnica de la sedimentación espontánea en tubo (Técnica de concentración por sedimentación, sin centrifugación):

##### a. *Fundamento.*

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

##### b. *Materiales.*

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

##### c. *Procedimiento.*

- Tomar una porción de heces (1 - 2 g) y homogeneizar con suero fisiológico en un tubo limpio o en el mismo recipiente en que se encuentra la muestra.
- Colocar una gasa, hundiéndola en la abertura del tubo y sujetándola con una liga alrededor de ella.
- Filtrar el homogeneizado a través de la gasa, llenando el tubo hasta la cuarta parte de su contenido.
- Agregar suero fisiológico hasta 1 cm por debajo del borde del tubo.
- Ocluir la abertura del tubo con una tapa, parafilm o celofán.
- Agitar enérgicamente el tubo por 15 segundos aproximadamente.
- Dejar en reposo de 30 a 45 minutos. En caso que el sobrenadante esté muy turbio, eliminarlo y repetir la misma operación con solución fisiológica o agua filtrada.

- Aspirar la parte media del tubo con una pipeta y colocar 1 ó 2 gotas en una lámina portaobjeto.
- Aspirar el fondo del sedimento con una pipeta y depositar 1 ó 2 gotas del aspirado en los extremos de la otra lámina portaobjeto.
- Agregar 1 ó 2 gotas de solución lugol a una de las preparaciones.
- Cubrir ambas preparaciones con las laminillas de celofán y observar al microscopio

d. *Observación.*

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

e. *Resultado.*

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

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



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

a. *Fundamento.*

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

b. *Materiales*

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

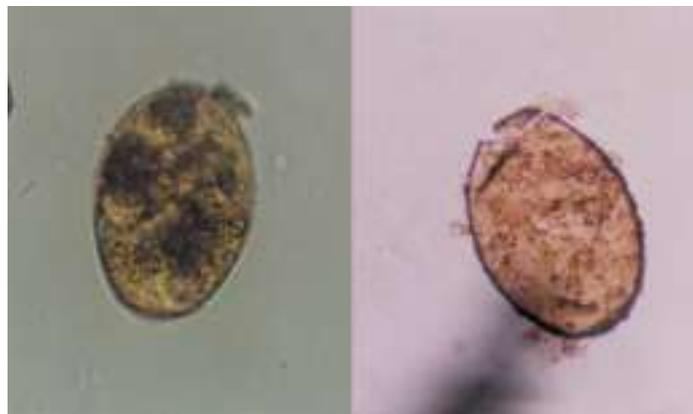
- Pipeta Pasteur.
- Gasa.
- Agua corriente filtrada.
- Microscopio.

c. *Procedimiento*

- Homogeneizar 3 a 6 g de heces con unos 10 a 20 mL de agua filtrada
- Colocar la coladera y dos capas de gasa en la abertura del vaso y a través de ella, filtrar la muestra.
- Retirar la coladera y llenar la copa con agua filtrada hasta 1 cm. debajo del borde, esto es 15 a 20 veces el volumen de la muestra.
- Dejar sedimentar la muestra durante 30 minutos.
- Decantar las 2/3 partes del contenido del vaso y agregar nuevamente agua.
- Repetir los pasos anteriores cada 5 a 10 minutos por 3 a 4 veces, hasta que el sobrenadante quede limpio.
- Transferir el sedimento a una placa petri o luna de reloj, por incorporación o con ayuda de una pipeta Pasteur.
- Observar al estereoscopio o microscopio, a menor aumento.

d. *Observación*

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



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

e. *Resultado.*

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

5.3.1.3 Técnica de Faust: Método de sedimentación y flotación por centrifugación con sulfato de zinc al 33,3% y densidad 1180:

a. *Fundamento*

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

b. *Materiales.*

- Gradilla para tubos de ensayo.
- Tubos de prueba 15 x 150.
- Tubos de prueba 13 x 100.
- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Embudo pequeño de vidrio.
- Bajalengua o bagueta.
- Gasa.
- Sulfato de zinc 33,3%, densidad 1,180 (Anexo C).
- Solución de lugol (Anexo C).

c. *Procedimiento.*

- Colocar 1 a 2 g de la muestra de heces en el tubo de prueba 13 x 100 o 15 x 150 y agregar de 7 a 10 mL de agua filtrada o destilada. Realizar una buena homogeneización con ayuda del bajalengua o bagueta.
- Colocar en el tubo, un embudo con dos capas de gasa y filtrar la muestra homogeneizada hasta alcanzar 1 cm por debajo del borde del tubo (opcional).
- Retirar el embudo y centrifugar de 2 000 a 2 500 r.p.m. de 2 a 3 minutos (opcional).
- Decantar el sobrenadante, adicionar agua al sedimento, homogeneizar y repetir la centrifugación 1 ó 2 veces, hasta que el sobrenadante se observe limpio.
- Eliminar el sobrenadante y agregar la solución de sulfato de zinc (3-4 mL), homogeneizar y completar con la misma solución hasta 1 cm del borde del tubo.

- Centrifugar de 1 a 2 minutos de 2 000 a 2 500 r.p.m.
- Colocar el tubo en la gradilla y agregar, con ayuda de un gotero, la solución de sulfato de zinc hasta formar un menisco en la boca del tubo.
- Colocar una laminilla cubreobjeto sobre el menisco y dejar en reposo de 5 a 6 minutos.
- Depositar una gota de solución lugol en la lámina portaobjeto.
- Retirar la laminilla cubreobjeto, colocarla sobre la gota de lugol o con asa de Kolle colocar 3 ó 4 asadas en la lámina y cubrir con una laminilla cubreobjeto y observar al microscopio.

*d. Lectura.*

Se observan principalmente quistes y huevos de parásitos.

*e. Resultado.*

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

### **5.3.2 Métodos de concentración por flotación.**

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

*a. Fundamento.*

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

*b. Materiales.*

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

c. *Procedimiento.*

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

d. *Observación.*

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

e. *Resultado.*

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

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

a. *Fundamento.*

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

b. *Materiales*

- Tubos de 13 x 100 ó 15 x 150.
- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Solución saturada de azúcar (azúcar rubia) (Anexo C).
- Formol.

- Aplicador de madera (1/3 de baja lengua).
- Solución de lugol (Anexo C).

c. *Procedimiento.*

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

d. *Lectura.*

Es conveniente la observación inmediata a 10X y 40X, pues los quistes y/o huevos suelen deformarse si la densidad de la solución es demasiado alta.

e. *Resultado.*

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

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

#### **5.3.3.1 Fundamento.**

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

#### **5.3.3.2 Materiales.**

- Gradilla de tubos de ensayo.
- Tubos de ensayo 13 x 100.
- Pipetas Pasteur.
- Lámina portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Hisopos.
- Solución de formol 10%.

- Solución fisiológica (Anexo C).
- Eter etílico.
- Lugol.
- Bajalengua o bagueta.
- Microscopio binocular.

#### 5.3.3.3 Procedimiento (Figura N° 7)

- I:
- Colocar en el tubo de ensayo 1 a 2 g de muestra de heces, agregar 8 mL de solución fisiológica, homogeneizar y centrifugar a 2 000 r.p.m. por 2 a 3 minutos.
  - Descartar el sobrenadante y repetir varias veces el paso anterior hasta que se observe el sobrenadante limpio.
  - Decantar el sobrenadante, agregar al sedimento 6 mL de solución de formol al 10%, homogeneizar y dejar reposar 5 minutos, luego de los cuales se agrega 3 mL de éter.
  - Taponar el tubo y agitar cuidadosamente para evitar la salida del material.
- II:
- Eliminar las capas formadas de sobrenadante, de ser necesario, con ayuda de un hisopo.
- III.
- Retirar la tapa, centrifugar el tubo de 2 000 a 3 000 r.p.m. por 3 minutos.
- IV.
- Depositar una gota de lugol en la lámina portaobjeto, y con ayuda de una pipeta Pasteur, tomar una porción del sedimento para mezclarlo con la solución de lugol.
  - Cubrir con una laminilla cubreobjeto y observar al microscopio.

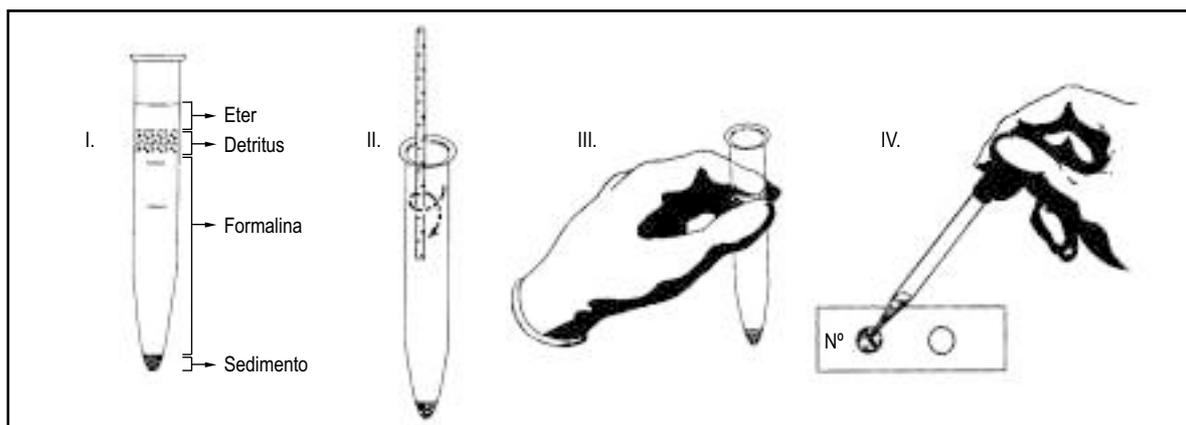


Figura N° 7. Aplicación del método de Ritchie

#### 5.3.3.4 Observación.

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

5.3.3.5 *Resultado.*

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

**5.3.4 Método de Baermann (Método de concentración por migración)**

5.3.4.1 *Fundamento*

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

5.3.4.2 *Materiales*

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



**Figura N° 8. Materiales del método de Baermann: Copa de vidrio, pipetas de transferencia, coladera, láminas y laminillas**

5.3.4.3 *Procedimiento*

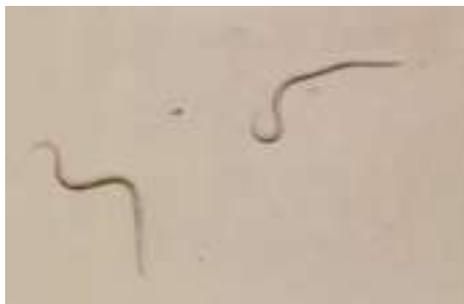
- Colocar la coladera o rejilla metálica con la gasa doblada (2 a 3 capas) dentro de la copa (Figura N° 8).
- Colocar sobre la gasa, 4 a 6 g de la muestra de heces en fresco.

- Verter solución salina a 37°C en cantidad suficiente por el borde de la copa.
- Dejar a temperatura ambiente o en estufa a 28°C - 37°C de 30 a 50 minutos.
- Sacar la coladera o rejilla y con ayuda de una pipeta Pasteur obtener 1 mL de sedimento.
- Colocar el sedimento en una luna de reloj o lámina cavada y observar al microscopio o esteroscopio.

#### 5.3.4.4 Observación.

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

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



**Figura N° 9.** Larvas de *Ancylostoma/Necator* (100x) en movimiento del método de Baermann

#### 5.3.4.5 Resultado.

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

### 5.3.5 Método cualitativo: Técnica de Kato o método de concentración por tamizado

#### 5.3.5.1 Fundamento.

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

#### 5.3.5.2 Materiales.

- Láminas portaobjeto.
- Aplicador.
- Papel celofán (humectante especial), cortado de 2 x 3 cm y sumergidos en una solución de glicerina por un período no menor de 24 horas.
- Malla metálica, nylon u organza blanca.
- Solución glicerinada con verde de malaquita (Anexo C).

#### 5.3.5.3 Procedimiento

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

#### 5.3.5.4 Observación

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



**Figura N° 10. *Isospora belli* con colorante temporal eosina (400x)**

#### 5.3.5.5 Resultado

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

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

#### 5.4.1 Fundamento

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

#### 5.4.2 Materiales (Figura N° 11)

- 5.4.2.1 Láminas portaobjetos 2,5 x 7,5 cm.
- 5.4.2.2 Papel absorbente (toalla o periódico).
- 5.4.2.3 Aplicador.
- 5.4.2.4 Papel de celofán impregnado con glicerina y verde de malaquita (Anexo C).
- 5.4.2.5 Molde de plástico con perforación central de 6 mm de diámetro.
- 5.4.2.6 Malla metálica, nylon u organza de color blanco de 0,09 mm.



Figura N° 11. Materiales del método de Kato - Katz: lámina perforada, aplicador, nylon/organza o malla metálica

### 5.4.3 Procedimiento.

- 5.4.3.1 Con un aplicador (bajalengua) transferir la muestra fecal (0,5-1g) sobre el papel absorbente.
- 5.4.3.2 Colocar una malla o nylon de 2 x 3 cm. sobre la muestra.
- 5.4.3.3 Con el aplicador del kit comprimir la malla para tamizar la muestra.
- 5.4.3.4 Colocar el molde de plástico sobre la lámina portaobjeto y rellenar la perforación con la muestra tamizada.
- 5.4.3.5 Levantar el molde dejando el "cilindro" de la muestra en la lámina portaobjeto.
- 5.4.3.6 Colocar la laminilla glicerina con verde de malaquita sobre la muestra y con ayuda de un tapón de jebes presionar sobre la laminilla, buscando extender la muestra.
- 5.4.3.7 Dejar para la diafanización a temperatura ambiente de 30 a 45 minutos.

### 5.4.4 Observación.

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

### 5.4.5 Resultado.

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

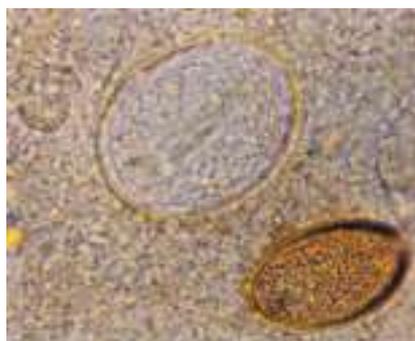


Figura N° 12. Huevos *Ancylostoma /Necator* y *Trichuris trichiura* por el método de Kato Katz (400X)

Tabla N° 2. Cálculo del número de huevos por gramo (hpg): Método de Kato - Katz

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

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

#### 5.4.6 Intensidad de la infección (hpg)

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

**Tabla N° 3. Intensidad de las infecciones**

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

### 5.5 MÉTODOS DE COLORACIÓN PARA PROTOZOARIOS

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

##### 5.5.1.1 *Fundamento.*

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

##### 5.5.1.2 *Materiales.*

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Soporte de varillas de vidrio para coloración de láminas portaobjeto.
- Estiletes o pinzas punta curva.
- Fuscina fenicada (Anexo C).
- Verde de malaquita o azul de metileno acuoso (Anexo C).

- Metanol.
- Hidróxido de sodio al 4%.
- Alcohol ácido (Anexo C).

#### 5.5.1.3 *Procedimiento.*

- Colocar las láminas portaobjetos sobre el soporte de las varillas de vidrio.
- Con el estilete o pinza curva hacer un frotis de heces en la lámina portaobjeto y dejar secar.
- Fijar la lámina con alcohol metílico de 2 a 5 minutos y dejar secar.
- Agregar hidróxido de sodio sobre el preparado por un minuto, eliminar el exceso y lavar con agua.
- Cubrir la lámina con la fucsina fenicada (previa agitación del frasco) por 5 minutos, diluida previamente en agua al tercio (1 mL colorante y 2 mL de agua).
- Lavar suavemente la lámina portaobjeto con agua corriente.
- Decolorar con alcohol-ácido, cubriendo el portaobjeto por unos segundos hasta quitar el colorante.
- Lavar suavemente el portaobjeto con agua.
- Colocar como colorante de contraste verde de malaquita 1% o azul de metileno 1-1,4% durante 5 minutos, diluidas previamente al tercio.
- Lavar la lámina suavemente con agua corriente y dejar secar a temperatura ambiente.
- Realizar el montaje con cytoseal, bálsamo de Canadá o Permout, usar una laminilla cubreobjeto y observar el microscopio.

#### 5.5.1.4 *Observación.*

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



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

5.5.1.5 *Resultado.*

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

**5.5.2 Coloración Gram y coloración tricrómica (para microsporidios).**

5.5.2.1 *Fundamento.*

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

5.5.2.2 *Materiales.*

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

5.5.2.3 *Procedimiento.*

- Preparar el set de placas petri 10 x 150 mm.
- Realizar un frotis fino en una lámina o laminilla y dejar secar.
- Fijar el frotis pasándolo 3 veces por una llama, un segundo de tiempo por vez.
- Agregar el colorante cristal violeta y esperar 1 minuto.
- Enjuagar en agua corriente y eliminar totalmente el agua.
- Adicionar el yodo de Gram por 30 segundos, remover el exceso con el decolorante y enjuagar con agua.
- Agregar el colorante chromotrope por 5 minutos de 50°C a 55°C.
- Pasar por el decolorante (alcohol 90% y ácido acético 1%) de 1 a 3 segundos.
- Pasar por alcohol 95% y por alcohol etílico absoluto por 1 minuto.
- Pasar un minuto por xilol buscando que la coloración sea adecuada para visualizar el parásito.
- Realizar el montaje y observar al microscopio.

5.2.4 *Observación.*

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

Se observan las esporas de *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Nosema*, etc., que aparecen de un color rosado o rojo tenue o fucsia sobre el fondo verde o azul.

5.2.5 *Resultado.*

Informar los parásitos encontrados (Sección 10).

**5.5.3 Coloración Trichrome (Gomori Wheatley).**

5.5.3.1 *Fundamento.*

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

5.5.3.2 *Materiales (Figura N° 14)*

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Asa de platino.
- Estilete curvo o pinza curva .
- Agua destilada.
- Tintura de Yodo (Anexo C).
- Cytoseal o bálsamo de Canadá.
- Alcoholes 85%, 90% y 95% y absoluto.
- Xilol.
- Colorante chromotrope (Anexo C).
- Acido acético.
- Solución Schaudinn (Anexo C).
- Frascos coplin o placas Petri.



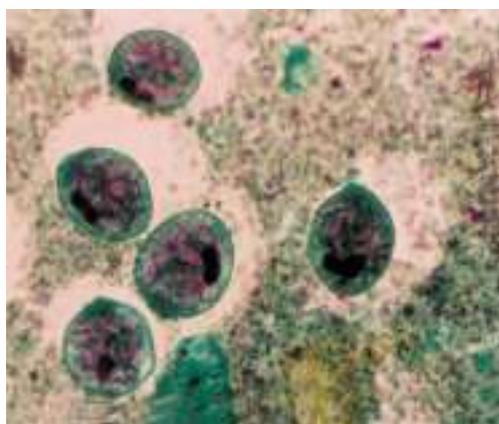
**Figura N° 14.** Materiales para la coloración tricrómica: colorante, pinza, porta-laminillas (tapón de jebe), laminillas y placas petri

#### 5.5.3.3 Procedimiento.

- Preparar un set de placas Petri 15 x 150 mm con los reactivos correspondientes, sujetar la laminilla con el porta-laminillas y con el estilete o pinza curva hacer el frotis fino de la muestra sobre la laminilla.
- Fijar la muestra con solución Schaudinn por 2 a 5 minutos.
- Pasar por alcohol 70% con 2 ó 3 gotas de tintura de yodo.
- Pasar por un minuto por alcohol 70%.
- Pasar por el colorante chromotrope de 8 a 15 minutos.
- Pasar por alcohol 90% con ácido acético al 1% de 10 a 15 segundos y ver tono de coloración.
- Pasar por alcohol 95% y alcohol absoluto durante 3 minutos.
- Pasar por xilol de 1 a 5 minutos. No debe verse opaco.
- Realizar el montaje con cytoseal, bálsamo de Canadá o Permout.

#### 5.5.3.4 Observación.

Observar con objetivo de inmersión 100X. El citoplasma de los parásitos se tiñen de color verde y el núcleo de color rosado (Figura N° 15).



**Figura N° 15.** Trofozoítos de *Balantidium coli* con macronúcleo, con coloración tricrómica (200X). Observar los macronúcleos visibles

5.5.3.5 *Resultado.*

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

**5.5.4 Coloración de May Grünwald.**

5.5.4.1 *Utilidad.*

Colorea protozoarios, principalmente flagelados.

5.5.4.2 *Materiales.*

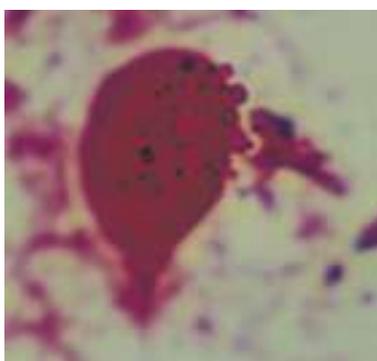
- Láminas portaobjetos.
- Láminillas cubreobjetos.
- Estilete o pinza curva.
- Colorante May Grünwald (Anexo C).
- Alcohol metílico.
- Bálsamo de Canadá.

5.5.4.3 *Procedimiento.*

- Con la ayuda de un estilete o una pinza curva, realizar el frotis de la muestra fresca en la lámina o laminilla y dejar secar.
- Fijar el frotis con unas gotas de alcohol metílico, cubriendo la muestra por 5 minutos.
- Cubrir el frotis con el colorante (diluido al  $\frac{1}{2}$  ó  $\frac{1}{3}$  con agua destilada) durante 15 minutos.
- Lavar con agua corriente y dejar secar.
- Realizar el montaje con cytoseal o bálsamo de Canadá y observar al microscopio.

5.5.4.4 *Observación.*

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



**Figura N° 16.** Trofozoito de *Giardia lamblia* coloreado con May Grünwald (1000X)

5.5.4.5 *Resultado.*

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

**5.5.5 Coloración de hematoxilina férrica de Heidenhain.**

5.5.5.1 *Utilidad.*

Colorea protozoarios, principalmente amebas y flagelados.

5.5.5.2 *Materiales (Figura N° 17)*

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



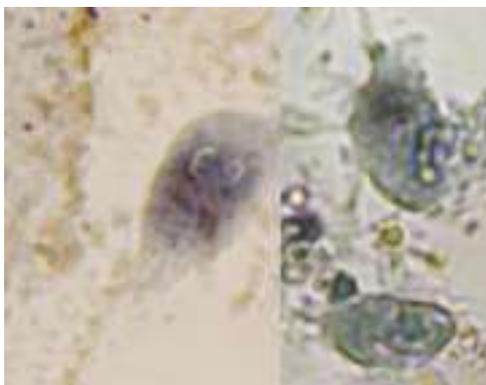
**Figura N° 17. Materiales para la realización de la coloración hematoxilina férrica de Heidenhain: colorante, bicloruro de mercurio, porta-laminillas (tapón de jebe), pinza punta curva y placas petri**

#### 5.5.5.3 Procedimiento.

- Preparar un set de placas petri 100 x 150 mm o el frasco Coplin con los reactivos correspondientes, y con ayuda de un estilete o pinza curva hacer un frotis fino en la lámina o la laminilla, esta última sujeta al porta-laminilla.
- Si la muestra es dura, hacer una emulsión previa en solución fisiológica, realizar el frotis y pasar en solución Schaudinn por 3 a 5 minutos.
- Pasar por alcohol 70% más 1 a 2 gotas de tintura de yodo por 5 minutos.
- Pasar por alcohol 70% y 50% de 5 a 10 minutos cada vez.
- Pasar por agua corriente por 5 a 10 minutos.
- Pasar por la solución mordiente 2% de 5 a 10 minutos y enjuagar con agua corriente.
- Pasar por colorante por 5 a 10 minutos (1 mL de solución colorante hematoxilina y 9 mL de agua).
- Lavar con agua y pasar por una segunda solución de mordiente al 2% para decolorar, observando la intensidad de la coloración.
- Lavar con agua corriente a chorro continuo de 10 a 15 minutos.
- Deshidratar pasando por alcohol 70%, 85%, 95% y absoluto, de 10 a 15 minutos cada uno.
- Aclarar con xilol agitando el frotis, montar con cytoseal o bálsamo de Canadá y observar al microscopio.

#### 5.5.5.4 Observación.

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



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

5.5.5.5 *Resultado.*

Informar el nombre del parásito y el estadio evolutivo (Sección 10)

**5.6 MÉTODOS DE COLORACIÓN PARA HELMINTOS**

**5.6.1 Coloración Carmín clorhídrico.**

5.6.1.1 *Utilidad.*

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

5.6.1.2 *Materiales (Figura N° 19).*

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



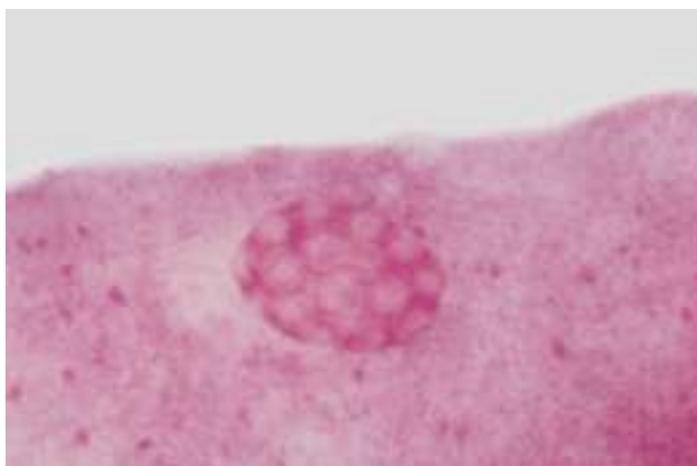
**Figura N° 19.** Materiales para la coloración Carmín clorhídrico: colorante, especímenes aplanados, placas petri y pinza

#### 5.6.1.3 Procedimiento.

- Los proglótidos de céstodos y los adultos de tremátodos son lavados y aplanados, colocándolos entre dos láminas, sujetándolos con pabilo o usando pesas sumergiéndolos en formol al 10%.
- En caso de estar fijados en formol 10%, se lavan con agua corriente durante 10 a 30 minutos y luego se realiza el aplanamiento del vermex o gusano.
- Colocar el gusano en alcohol 70% durante 10 a 20 minutos.
- Pasar por el colorante Carmín durante 5 a 10 minutos.
- Pasar por alcohol ácido controlando la coloración al estereoscopio.
- Deshidratar el espécimen pasando por alcohol 85%, 95% y absoluto, durante 10 minutos en cada uno.
- Pasar por la creosota o xilol, controlando al estereoscopio o microscopio la coloración apropiada.
- Secar el exceso de creosota con papel filtro y realizar el montaje con bálsamo de Canadá.

#### 5.6.1.4 Observación.

La observación y estudio de la morfología del ejemplar se realiza macroscópicamente e incluso sólo usando el estereomicroscopio (Figura N° 20).



**Figura N° 20.** Huevos de *Dipyliidium caninum* en cápsula ovígera paquetes coloreados con Carmín clorhídrico (40X)

#### 5.6.1.5 Resultados.

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

### 5.6.2 Coloración de Bonilla, Naar y Beloy.

#### 5.6.2.1 Utilidad.

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

#### 5.6.2.2 *Materiales.*

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

#### 5.6.2.3 *Procedimiento*

- Preparar un set de placas Petri 60 x 90 mm conteniendo los reactivos correspondientes y colocar las larvas en alcohol 25% - 30% con unas gotas de solución de rojo de Congo por 20 a 30 minutos.
- Controlar por la observación microscópica el color de las larvas.
- Deshidratar la muestra, pasándola por alcohol 70%, 85%, 95% y absoluto, de 20 a 30 minutos en cada uno.
- Colocar en solución de salicilato de metilo durante 3 minutos.
- Colocar los especímenes en cytoseal, bálsamo de Canadá o Permount y observar al microscopio.

#### 5.6.2.4 *Lectura*

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

#### 5.6.2.5 *Resultado*

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

### **5.6.3 Coloración hematoxilina férrica de Delafield**

#### 5.6.3.1 *Utilidad*

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

#### 5.6.3.2 *Materiales*

- Láminas portaobjetos.
- Laminillas cubreobjetos.
- Alcohol de 25%, 30%, 70%, 85% y 95%.
- Hematoxilina férrica.
- Bálsamo de Canadá o cytoseal.
- Pipeta Pasteur.
- Placas Petri 150 x 100 mm conteniendo los alcoholes.

#### 5.6.3.3 *Procedimiento*

- Preparar un set de placas Petri 60 x 90 mm o 100 x 150 mm conteniendo los reactivos correspondientes, dependiendo de los especímenes a colorear.
- Los tremátodes y céstodes fijados con formol 10% se lavan en agua corriente.
- Diluir el colorante stock de 8 a 10 gotas en agua destilada y colocar los especímenes (35 mL por placa) por 12 horas.
- Lavar con agua corriente y pasar por agua (segundos), dependiendo del espécimen.
- Pasar por alcohol 50%, 30% y 10% por 10 minutos en cada uno y pasar por agua corriente el tiempo necesario para sacar el exceso de colorante.
- Deshidratar en alcohol 10%, 30%, 50%, 70%, 85%, 95% y 100% cada uno, por 10 minutos.
- Pasar dos veces por xilol, montar con bálsamo de Canadá y observar al microscopio.

#### 5.6.3.4 *Lectura*

La observación de los especímenes se realiza en forma microscópica o con el uso del microscopio estereoscopio.

#### 5.6.3.5 *Resultado*

Informar el nombre del parásito y su estadio evolutivo.

### 5.7 **FIJADORES Y/O CONSERVADORES**

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

## **5.7.1 PAF (phenol-alcohol-formol).**

### *5.7.1.1 Utilidad.*

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

### *5.7.1.2 Materiales.*

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

### *5.7.1.3 Procedimiento.*

- La muestra de heces se mezcla con el fijador en un recipiente en la proporción 1:1.

Para la observación microscópica:

- Mezclar bien la muestra fijada en PAF y con ayuda de un embudo y una gasa doblada en un tubo de 15 mL, colar de 3 a 4 mL del material fijado.
- Agregar solución salina hasta un volumen de 12 mL y centrifugar a 1800 r.p.m. por 3 minutos.
- Decantar el sobrenadante y obtener un sedimento de 0,5 mL; si es menor, agregar de la muestra filtrada una cantidad suficiente y volver a centrifugar para obtener el volumen del sedimento deseado.
- Decantar el sobrenadante y completar 12 mL con solución fisiológica, emulsionar con el aplicador y centrifugar a 1800 r.p.m. por 3 minutos.
- Repetir el centrifugado y lavar de 2 a 3 veces más.
- Agregar 2 mL de solución fisiológica al sedimento final, emulsionar y obtener una gota del sedimento con una pipeta Pasteur y colocarla en una lámina portaobjetos.

- Agregar una gota del colorante tionina o azure A, cubrir con una laminilla cubreobjetos y examinar al microscopio.

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

- Al sedimento emulsionado y sobrante del procedimiento anterior, agregar 10 mL de solución fisiológica y una gota de Triton NE.
- Mezclar, agregar 2 mL de éter, tapar con un tapón de jebe o de corcho, agitar suavemente y destapar.
- Centrifugar a 2 000 r.p.m. por 3 minutos, decantar y eliminar los detritus de las paredes del tubo mediante un aplicador cubierto de algodón.
- Agregar al sedimento 1 ó 2 gotas de solución fisiológica, mezclar y obtener del fondo del tubo con una pipeta Pasteur una gota que se colocará en una lámina portaobjeto.
- Agregar una gota de colorante tionina o azure A, cubrir con una laminilla y observar al microscopio

#### 5.7.1.4 *Observación.*

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

#### 5.7.1.5 *Resultado.*

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

### 5.7.2 **PVA (Polivinil alcohol = alcohol polivinílico).**

#### 5.7.2.1 *Utilidad.*

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

#### 5.7.2.2 *Materiales.*

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

#### 5.7.2.3 *Procedimiento.*

- Colocar en una lámina portaobjetos 1 ó 2 mg de muestra, secar el frotis, agregar 2 ó 3 gotas de PVA y secar o guardar hasta por 3 meses para colorearlos, o
- Agregar al frasco que contiene la muestra v/v 1 a 4 mL. Generalmente se puede preservar por meses y cuando se considere conveniente se realizará la coloración con Trichrome Gomori Wheatley.

### **5.7.3 MIF (merthiolate - yodo - formol).**

#### *5.7.3.1 Utilidad.*

Fija y colorea simultáneamente los quistes y huevos de parásitos, permitiendo la observación inmediata de la muestra.

#### *5.7.3.2 Materiales*

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

#### *5.7.3.3 Procedimiento.*

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

#### *5.7.3.4 Observación.*

Observar los parásitos teñidos de color amarillo oro.

#### *5.7.3.5 Resultado.*

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

### **5.7.4 Fijadores para preservar y enviar helmintos adultos.**

#### *5.7.4.1 Utilidad.*

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

#### *5.7.4.2 Materiales necesarios.*

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

5.7.4.3 *Procedimiento.*

a. Colección y lavado de los helmintos:

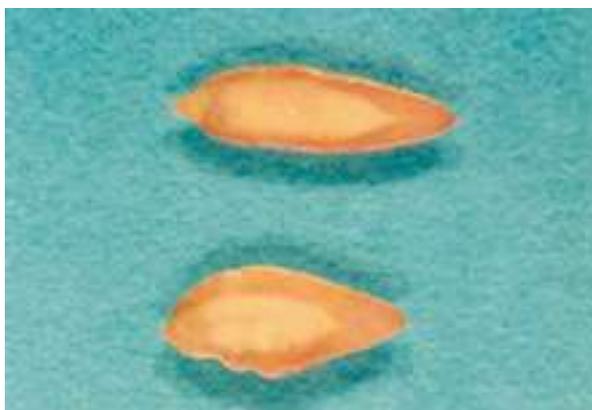
- Todo espécimen aislado del hospedero debe mantenerse fresco (agua o suero fisiológico) en un frasco con tapa.
- Los adultos colectados son lavados varias veces con solución fisiológica, para eliminar la mucosidad y otras sustancias adheridas al cuerpo del helminto.
- Finalmente, se lava con agua para permitir el relajamiento del parásito
- Calentar a 55°C de temperatura, alcohol de 70%, formol 10% ó AFA, para que con la fijación los ejemplares queden estirados y pueda observarse sus estructuras internas.

b. Fijación:

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

c. Aplanamiento:

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



**Figura N° 21. *Fasciola hepatica* adulto después del aplanamiento**

## SECCIÓN 6

### CULTIVOS PARASITOLÓGICOS

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

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

#### 6.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA PROTOZOOS

Los medios de cultivo para protozoos más usados son: medio Pavlova, medio Diamond y medio de Tanabe y Chiba modificado para *Entamoeba histolytica*.

##### 6.1.1 Medio Pavlova.

###### 6.1.1.1 Constituyentes.

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

Adicionar:

1. 37,5 mL de suero de caballo, inactivado a 56°C por 30 minutos.
2. 2,75 g de almidón de arroz estéril.
3. 1000 UI/mL de penicilina G sódica.
4. 50-100 ug/mL de estreptomina.

**6.1.2 Medio Diamond.**6.1.2.1 *Constituyentes.*

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

6.1.2.2 *Procedimiento.*

- Ajustar el pH con hidróxido de sodio 1N a 6,8 – 7,0, distribuir en cada tubo 9 mL, autoclavar a 120°C por 15 minutos y almacenar a 4°C hasta su uso (máximo un mes).
- Agregar a cada tubo en el momento de la siembra, 1 mL de suero sanguíneo estéril, penicilina G potásica 1000 UI/mL y sulfato de estreptomicina 1 mg/mL.
- Llevar el registro en una ficha (Anexo G).

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

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

6.1.3.2 *Procedimiento*

- Juntar los constituyentes y disolver en baño maría.
- Repartir 3 mL en tubos de 15 x 150 mm, autoclavar a 100° C por 30 minutos y dejar solidificar en plano inclinado.
- Agregar a cada tubo 0,5 a 1 mL de solución Ringer al que se le ha añadido previamente suero de caballo 1%.

6.1.3.3 *Solución Ringer*

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

Autoclavar a 15 libras de presión por 15 minutos y almacenar a 4°C hasta el momento de su uso.

## **6.2 MÉTODOS DE DESARROLLO PARA HELMINTOS**

### **6.2.1 Placas de agar.**

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

#### *6.2.1.1 Constituyentes.*

Agar ..... 2,00 g  
Cloruro de sodio ..... 0,50 g  
Agua destilada ..... 100,00 mL

#### *6.2.1.2 Procedimiento.*

- Mezclar los reactivos, disolver y autoclavar.
- Repartir en placas petri (o en láminas portaobjetos), dependiendo de la densidad parasitaria, agregar la muestra en el centro de la placa, incubar a 37°C de 1 a 9 días y controlar diariamente el desarrollo de larvas.

### **6.2.2 Agar carbón.**

#### *6.2.2.1 Constituyentes.*

Agar ..... 2,00 g  
Carbón ..... 0,50 mg  
Agua destilada ..... 100,00 mL

#### *6.2.2.2 Procedimiento.*

- Homogeneizar o licuar y repartir en tubos de 13 x 100 mm o placas Petri 10 x 150 mm, inocular la muestra y seguir el mismo procedimiento anterior (Podría utilizar el microcultivo usando el agar en lámina portaobjeto).

#### **6.2.2.3 Método de Harada-Mori.**

##### *6.2.3.1 Utilidad.*

Técnica que permite el desarrollo de huevos a estadios larvales de los nemátodos permitiendo su diferenciación morfológica. Es útil, principalmente, para la obtención de larvas rabbitiformes y filariformes de anquilostomídeos y estrogiloides.

##### *6.2.3.2 Materiales.*

- Tubos 13 x 100, 16 x 150 o 16 x 180 mm.
- Papel filtro.
- Agua corriente estéril.

- Pinza curva con aplicador.
- Tapón de goma o corcho.
- Parafilm o cinta adhesiva.
- Solución fisiológica (Anexo C).
- Alcohol 30%.
- Formalina 5%.

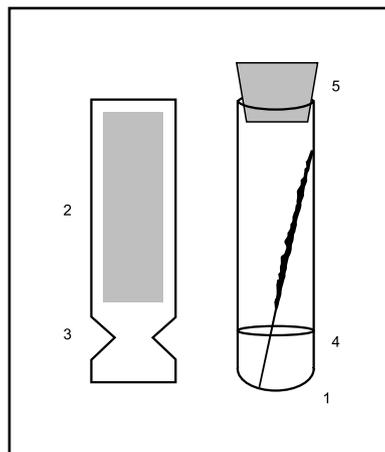
### 6.2.3.3 Procedimiento

#### a. Preparación del tubo:

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

#### b. Extendido de la muestra:

- Con el aplicador, extender la muestra de heces (0,5 a 1 g) sobre la superficie del papel, dejando libre los extremos.
- Colocar cuidadosamente el papel filtro dentro del tubo, evitando el contacto de las heces con el líquido (Figura N° 22:4).
- Tapar el tubo y rotular con los datos del paciente (Figura N° 22:5).
- Incubar a 27°C - 37°C por 4 a 10 días (En la selva, a temperatura ambiente).



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

6.2.3 Observación.

- Durante la incubación, con ayuda de una lupa o con el microscopio (estereoscopio), se puede observar el desarrollo de larvas en el medio líquido.
- Para estudiar las larvas se elimina el papel filtro, se toma una gota del líquido del fondo del tubo, se coloca en una lámina portaobjeto o lámina excavada y se observa al microscopio.
- La diferenciación morfológica se hará siguiendo la clave (Anexo D y Figuras N° 23-25).
- Las larvas pueden conservarse fijándolas en alcohol 25% ó 30% o formalina 5%.



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

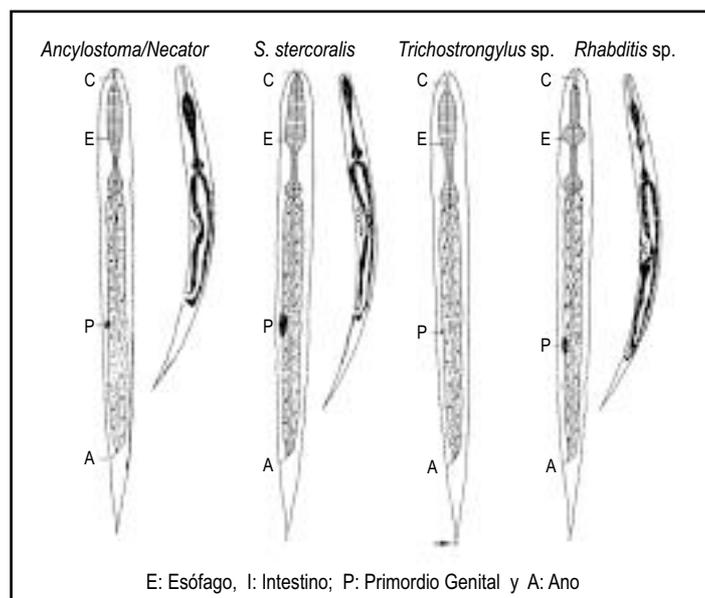
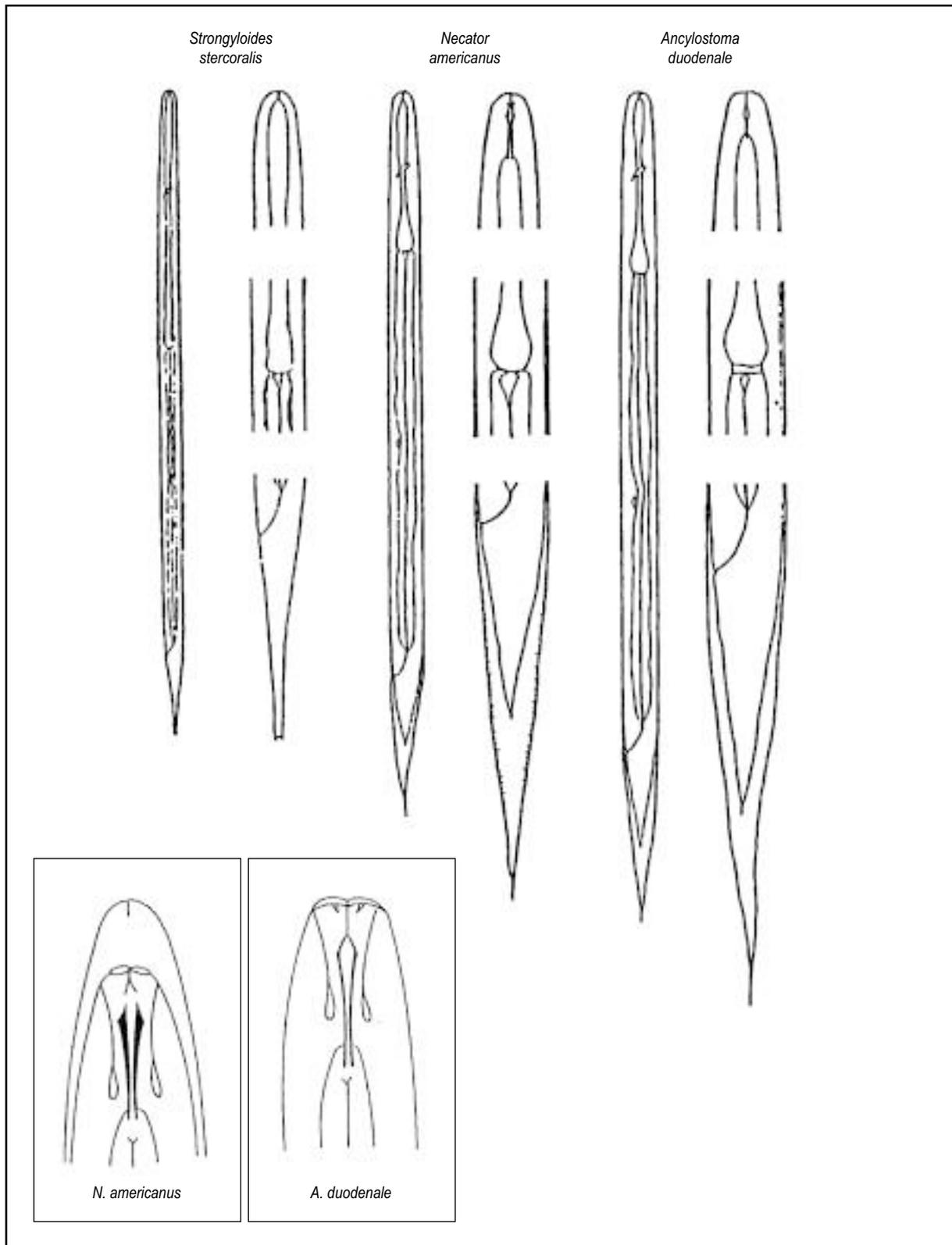


Figura N° 24. Diferenciación de las larvas rabbitiformes: *Strongyloides stercoralis*, *Necator/Ancylostoma*, *Trichostrongylus* y *Rhabditis* sp



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

## 6.2.4 Método de Harada - Mori modificado por María Beltrán Fabián

### 6.2.4.1 Procedimiento

- La preparación del tubo es similar al ítem 6.3.1.3; pero, además de la solución salina o agua, se le adiciona al tubo el colorante vital tionina o verde de malaquita 0,001%.
- El extendido de la muestra también es similar al ítem 6.3.1.3.

### 6.2.4.2 Lectura

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



**Figura N° 26.** Larvas de *Necator americanus* en movimiento coloreado con tionina y verde de malaquita (100X).  
Desarrollo en el método de Harada - Mori modificado por María Beltrán Fabián

## SECCIÓN 7

### EXAMEN DE SECRECIONES Y/O FLUIDOS

#### 7.1 ESPUTO

##### 7.1.1 Utilidad

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

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

##### 7.1.2 Materiales

7.1.2.1 Láminas portaobjetos.

7.1.2.2 Laminillas cubreobjetos.

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

7.1.2.4 Coladera o rejilla metálica.

7.1.2.5 Pipetas Pasteur.

7.1.2.6 Solución de hidróxido de sodio 2% al 4%.

7.1.2.7 Gasa.

7.1.2.8 Microscopio óptico.

##### 7.1.3 Obtención de la muestra

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

##### 7.1.4 *Strongyloides stercoralis*

###### 7.1.4.1 *Procedimiento*

- Usar el método de Baermann, reemplazando únicamente la muestra de heces por la de esputo.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur, obtener el sedimento, colocar en una luna de reloj o placa Petri y observar al estereoscopio o microscopio.

###### 7.1.4.2 *Observación*

Observar las larvas en movimiento.

### 7.1.5 ***Paragonimus spp.***

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

- Agregar al frasco con la muestra (4 a 8 mL) 20 a 30 mL de hidróxido de sodio 2% - 4% y, a través de un colador con gasa, vaciar a un tubo cónico de 50 mL.
- Centrifugar a 2500 r.p.m. de 5 a 10 minutos, eliminar el sobrenadante, agregar hidróxido de sodio 2% al sedimento hasta llenar el tubo y dejar en reposo de 45 a 60 minutos.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur, obtener 1 ó 2 gotas de sedimento, colocarlo en una luna de reloj o placa Petri y observar al estereoscopio o microscopio.

7.1.5.2. *Observación.*

Observar huevos operculados caracterizados por presentar una cubierta externa ondulada (Figura N° 6).

## 7.2 **ASPIRADOS, SECRECIONES O JUGO DUODENAL**

### 7.2.1 **Utilidad.**

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

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

7.2.1.3 La obtención del contenido duodenal ha mostrado ser útil en la búsqueda de *Giardia lamblia*, *Isoospora belli*, *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma* o *Necator* y *Fasciola hepatica*, cuyos adultos se localizan en las vías biliares.

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

### 7.2.2 **Materiales.**

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

- Cuerda encapsulada.
- Guantes.
- Vaso de bebida.
- Papel pH.
- Placas petri o lunas de reloj.
- Láminas portaobjetos.
- Láminas de vidrio cavadas.

- Laminillas cubreobjetos.
- Microscopio binocular.

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

### **7.2.3 Procedimiento.**

- 7.2.3.1 El método de la cuerda encapsulada o Enterotest requiere que el paciente esté en ayunas.
- 7.2.3.2 Un extremo de la cuerda se fija con una cinta adhesiva en la mejilla del paciente y se le hace deglutir la cápsula, en cuyo interior está enrollada una cuerda de nylon, la que se va desenrollando a medida que desciende por el estómago y duodeno.
- 7.2.3.3 A las 4 ó 5 horas se retira la cuerda, observándose el extremo que llegó al duodeno de color amarillo
- 7.2.3.4 Se exprime el extremo en una lámina excavada o lámina portaobjeto.
- 7.2.3.5 El material obtenido por la sonda duodenal se deposita en un tubo de centrífuga. Una pequeña porción se deposita en una lámina excavada o portaobjeto.

### **7.2.4 Examen microscópico.**

- 7.2.4.1 Las gotas de bilis o contenido duodenal depositadas en las láminas excavadas o portaobjetos se observan directamente al estereomicroscopio y/o microscopio y luego con tinción de lugol.
- 7.2.4.2 Al resto del contenido duodenal obtenido con sonda se le agrega una solución de hidróxido de sodio 2%, se trasvasa a un tubo de 13 x 100 ó 15 x 150 dependiendo de la cantidad, se mezcla tapando el tubo y, por agitación se liberan las formas parasitarias del mucus duodenal.
- 7.2.4.3 Dejar reposar de 30 a 45 minutos, eliminar el sobrenadante y observar el sedimento directamente o con tinción de lugol.

### **7.2.5 Observación.**

Se observa al estereoscopio o microscopio.

### **7.2.6 Resultado.**

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

## **7.3 SECRECIÓN, FLUIDO Y CONTENIDO INTESTINAL**

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

## SECCIÓN 8

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

#### 8.1 FUNDAMENTO

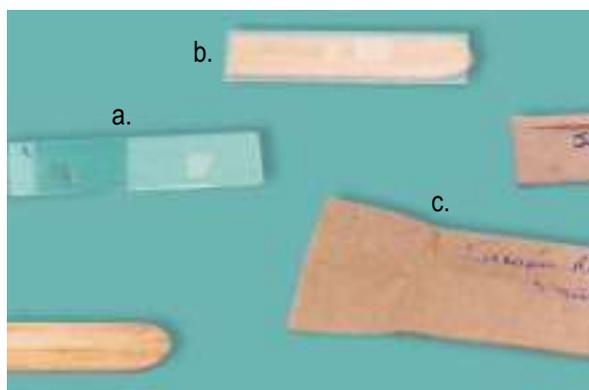
La hembra de *Enterobius vermicularis* deposita sus huevos en las márgenes del ano durante la noche. La técnica de Graham tiene por objeto adherir estos huevos a la cinta adhesiva transparente o cinta "scotch", la que se extenderá posteriormente en una lámina portaobjeto para su observación microscópica.

#### 8.2 MATERIALES

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

#### 8.3 PROCEDIMIENTO

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



**Figura N° 27. Preparación de la lámina con cinta adhesiva transparente y bajalenguas, envuelto con papel kraft**

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

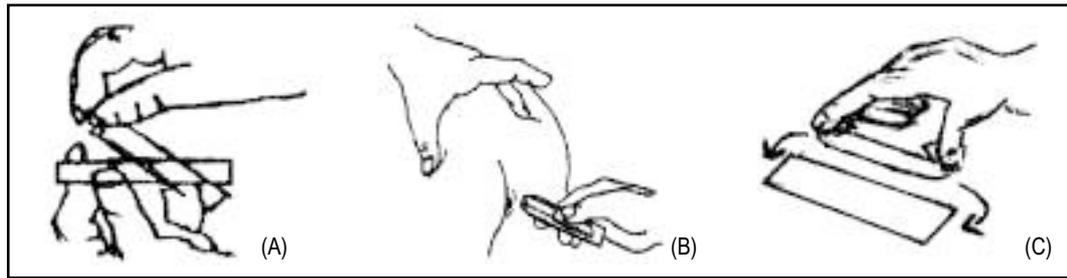


Figura N° 28. Procedimiento de recolección de la muestra

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

### 8.3.6 Microscopía de las láminas.

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

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

## 8.4 OBSERVACIÓN

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

## 8.5 RESULTADO

Informar el nombre del parásito y su estadio evolutivo (Figura N° 29).



Figura N° 29. Huevos de *Enterobius vermicularis* (izq.) y *Ascaris lumbricoides* (der.) obtenidos por el método de Graham (100X)

## SECCIÓN 9

### EXAMEN DE BIOPSIAS

#### 9.1 BIOPSIAS DEL TUBO DIGESTIVO

- 9.1.1 Las biopsias que son útiles para la búsqueda de parásitos son las obtenidas del antro pilórico, duodeno y recto mediante endoscopías.
- 9.1.2 Los parásitos diagnosticados frecuentemente en biopsias del antro-pilórico y del duodeno son *Strongyloides stercoralis* y *Giardia lamblia*, menos frecuente es la observación de coccidias intestinales como *Cryptosporidium* y *Cyclospora*.
- 9.1.3 Las biopsias de ulceraciones del intestino grueso muestran *Entamoeba histolytica* o *Balantidium coli*.
- 9.1.4 Las piezas operatorias que son objeto de examen histológico pueden demostrar la presencia de parásitos intestinales, por ejemplo: *Enterobius vermicularis* adultos en la luz del apéndice o *Ascaris lumbricoides* en una obstrucción mecánica de intestino, vías biliares o conducto pancreático.

#### 9.2 RECOMENDACIONES

- 9.2.1 La búsqueda de parásitos intestinales en cortes histológicos obtenidos por biopsia o necropsia no requiere, en general, de técnicas de coloración especiales.
- 9.2.2 La coloración de hematoxilina-eosina es útil, aunque generalmente no es posible reconocer la morfología del parásito, pues el corte microscópico afecta su integridad.
- 9.2.3 Las piezas anatómicas pueden conservarse en formol al 10% para ser usadas como piezas de museo o muestras de referencia.

## SECCIÓN 10

### RESULTADOS

#### 10.1 GENERALIDADES

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

#### 10.2 RESULTADO POSITIVO

- 10.2.1 El informe debe contener el nombre del paciente, los agentes observados y su estadio o forma evolutiva: quistes (q), ooquistes (o), trofozoítos (t), esporas (e), huevos (h) o larvas (l).
- 10.2.2 La intensidad parasitaria puede expresarse cualitativa o semicuantitativamente:
- 10.2.2.1 *Cualitativamente:*
- Escaso, regular o buena cantidad, según sea el grado de facilidad o dificultad para ubicarlos.
- 10.2.2.2 *Semicuantitativamente:*
- Contando las formas parasitarias:
- Si se observan 1 ó 2 elementos en toda la lámina, escribir el nombre del agente y su estadio evolutivo
- (+) Si se observan de 2 a 5 elementos por campo microscópico 10X ó 40X.
- (++) Si se observan de 6 a 10 elementos por campo microscópico 10X ó 40X.
- (+++ Si se observan >10 elementos por campo microscópico 10X ó 40X.

#### 10.3 RESULTADO NEGATIVO

- 10.3.1 Informar que no se observaron quistes, trofozoítos, ni huevos de parásitos.

## 10.4 FORMATO PARA ENTREGA DE RESULTADOS

	<b>MINISTERIO DE SALUD</b> <b>INSTITUTO NACIONAL DE SALUD</b> <b>CENTRO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA</b> <b>LABORATORIO DE ENTEROPARÁSITOS</b>			
	<b>INFORME DE RESULTADOS</b>			
Establecimiento : CONSULTORIO PARTICULAR		Dr(a): CONSULTORIO PARTICULAR		
Referencia : BOLETA DE VENTA N°. xxx-xxxxxxx		LIMA                      LIMA                      LIMA		
Fecha recep. INS : 09/12/2002		Médico solíc. :	Fecha de emisión :	
Fecha recep. Lab. :		DIVISIÓN DE PARASITOLOGÍA		
N° Muestra	Tipo de Muestra	Paciente	Prueba Realizada	Resultado
12-42075-2002	HECES	XXX XXX XXXX	DIAGNÓSTICO DE ENTEROPARÁSITOS POR MÉTODO DIRECTO CONCENT.	<i>Blastocystis hominis (t)</i> <i>Chilomastix mesnili (t)</i>
12-42220-2002	HECES	XXX XXX XXXX	DIAGNÓSTICO DE ENTEROPARÁSITOS POR MÉTODO DIRECTO CONCENT.	<i>Blastocystis hominis (t)</i> <i>Chilomastix mesnili (t)</i>
t = trofozoitos				
<b>Personal responsable</b>				
_____ Jefe(a) de División		_____ Jefe(a) de Laboratorio		

## BIBLIOGRAFÍA

- **Alvarez B.** Parasitosis intestinales: aspectos diagnósticos. Ginebra: OMS; 1964. Serie de Informes Técnicos.
- **Arruda B, Magalhães E, Freitas N.** Manual de técnicas para histología normal y patológica. Sao Paulo: EDART; 1976.
- **Ash L, Orihel T.** Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press American Society of Clinical Pathologist. Chicago: ASCP; 1967.
- **Atías A, Neghme A.** Parasitología clínica. 3<sup>ra</sup>. ed.; 1991.
- **Beltrán M.** Enteroparásitos. Manual de nivel local. Washington DC: OPS; 1993.
- **Botero D., Restrepo M.** Parasitosis humanas. Colombia: CIB; 1990.
- **Instituto Nacional de Salud.** Guía de procedimientos diagnósticos de las parasitosis intestinales. Lima: INS; 1998.
- **Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras (I). 2<sup>da</sup>. Ed. Lima: INS, 1997. Serie de Normas Técnicas N° 15.
- **Instituto Nacional de Salud.** Normas de bioseguridad. 2<sup>da</sup>. Ed.: Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N° 18.
- **ISO** (International Standard Organization = Cumplimiento de normas del sistema de calidad) 15189. Montevideo: Instituto Uruguayo de Normas Técnicas; 1993.
- **Moura H.** Cram - Chromotrope a new technique that enhances detection of microsporidial spores in clinical samples; 1997.
- **Organización Mundial de la Salud.** Infecciones Intestinales por protozoos y helmintos. Ginebra: OMS; 1981. Serie Informes Técnicos.
- **Organización Mundial de la Salud.** Métodos básicos de laboratorio en parasitología. Ginebra: OMS; 1991.
- **Organización Mundial de la Salud.** Medios auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales. Ginebra: OMS; 1995.
- **Organización Panamericana de la Salud.** Manual de laboratorio nivel local. Washington: OPS; 1993.
- **Shore L, Lawrence R.** Diagnostic Parasitology. Manual of clinical laboratory. C.V Mosby Co.; 1975.
- **Spencer FM, Monroe LS.** The color atlas of intestinal parasites. Illinois; Ch Thomas Publisher. Springfield 1961.
- **Suzuki N.** Color atlas of helminthology eggs. 3<sup>er</sup>. ed. Tokio: JAPC; 1986.

## ANEXO A

## PRINCIPALES PARÁSITOS INTESTINALES DEL HOMBRE

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

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

Protozoarios intestinales: Amebas



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



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

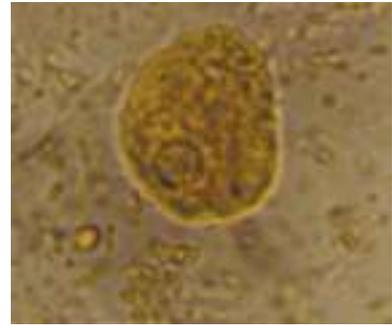


Figura A1.3. Trofozoito de *Entamoeba histolytica*, coloración lugol (400X)

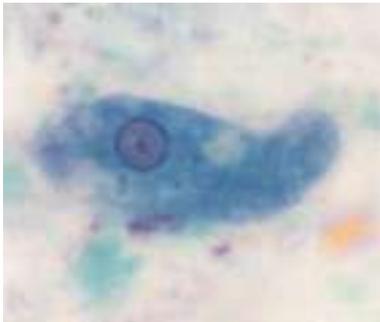


Figura A1.4. Trofozoito de *Entamoeba histolytica* con coloración tricrómica (1000X)

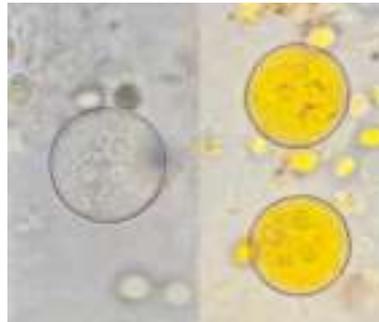


Figura A1.5. *Entamoeba coli* con solución salina (izq.) y lugol (der.)

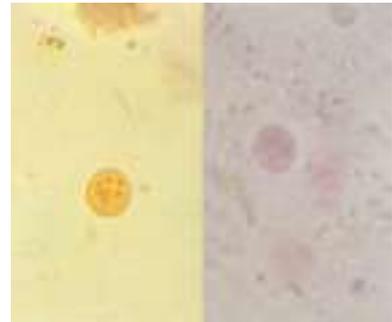


Figura A1.6. Quiste de *Endolimax nana* con 4 núcleos. Coloración lugol (izq.), Coloración MIF (der.)



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

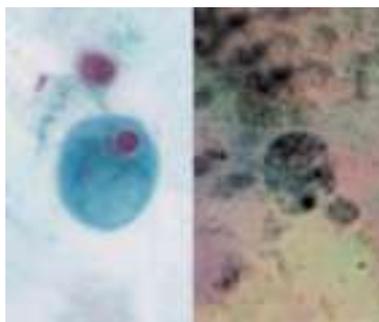


Figura A1.8. *Iodamoeba bütschlii* con coloración tricrómica férrica



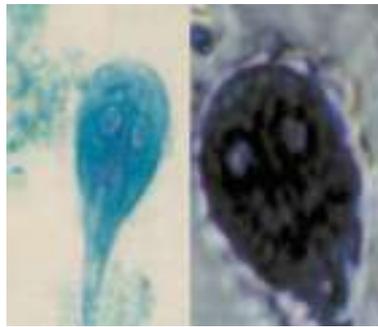
Figura A1.9. Trofozoito de *Blastocystis hominis*, Coloración: Azul de metileno (400X).

Fuente: Láminas WHO 1994, Figuras A1.3 y A1.9 fotografías originales.

### Protozoarios intestinales: Flagelados, ciliados y coccidios



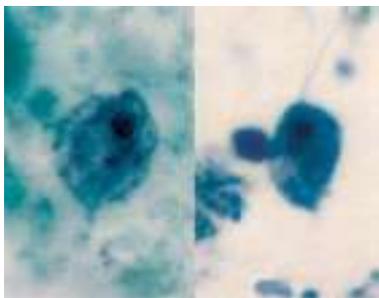
**Figura A1.10.** Quistes de *Giardia lamblia*, (lugol)



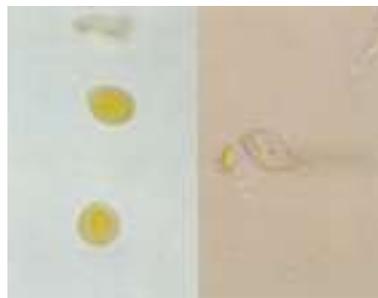
**Figura A1.11.** Trofozoito de *Giardia lamblia*, con coloración tricrómica y hematoxilina férrica (1000x)



**Figura A1.12.** Trofozoito de *Giardia lamblia*, con tiónina (200x)



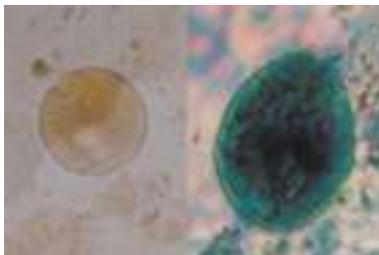
**Figura A1.13.** *Trichomonas hominis* con coloración tricrómica (1000x)



**Figura A1.14.** Quistes y trofozoítos de *Chilomastix mesnili*, Solución salina (200x)



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



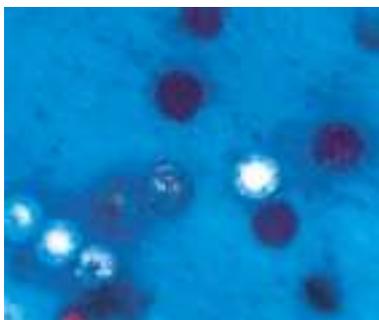
**Figura. A1.16.** Quistes y trofozoítos de *Balantidium coli*, coloración tricrómica (100x)



**Figura. A1.17.** *Isospora belli* en formalina



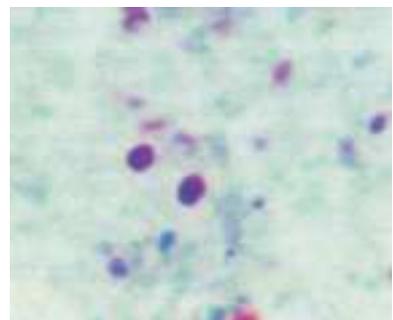
**Figura A1.18.** *Cryptosporidium parvum*, coloración: Ziehl-Neelsen (1000X)



**Figura A1.19.** *Cyclospora cayatanensis* con coloración Ziehl-Neelsen



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



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

Fuente: Láminas WHO 1994, Figuras A1.11, A1.12, A1.13, A1.14, A1.16 y A1.18 fotografías originales.

Tabla A2. Helmintos: formas evolutivas de diagnóstico, tipo de muestra y patogenicidad

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

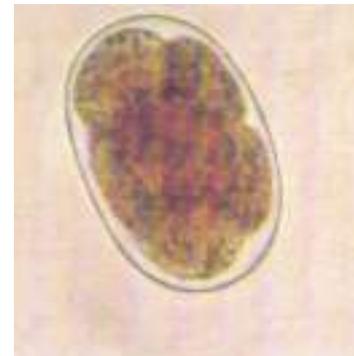
### Helmintos: Nemátodos



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



**Figura A2.2.** Huevo de *Ancylostoma duodenale* con tiónina



**Figura A2.3.** Huevo de *Necator americanus*



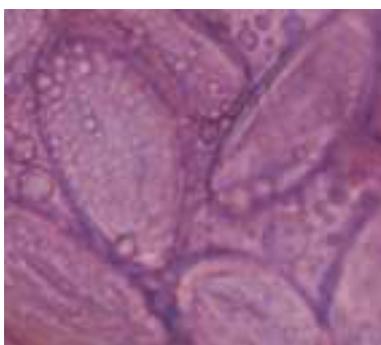
**Figura A2.4.** *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y *Ancylostoma/Necator* (solución salina)



**Figura A2.5.** *Necator americanus* (N) y *Ancylostoma duodenale* (A) (larvas filariformes), coloración tiónina (200X)



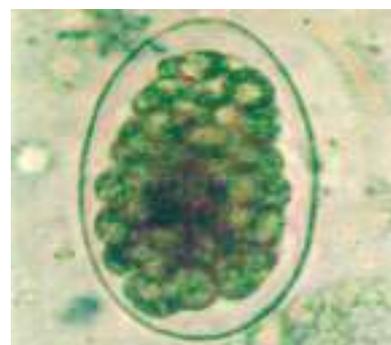
**Figura A2.6.** *Strongyloides stercoralis* en solución de lugol



**Figura A2.7.** Huevos de *Enterobius vermicularis* con eosina (400X)



**Figura A2.8.** *Meloidogyne* sp. (arriba) y *Enterobius vermicularis* (abajo) en solución salina (400X)



**Figura A2.9.** *Trichostrongylus* sp., coloración verde de malaquita (400X)

Fuente: Láminas WHO 1994, Figuras A2.1, A2.2, A2.3 y las otras fotografías originales.

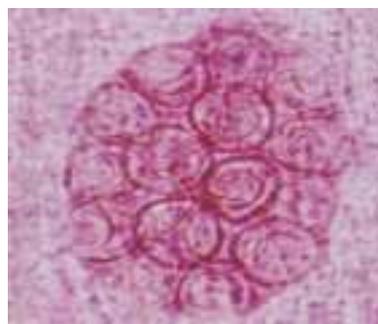
**Helmintos: Platelminos (céstodos y tremátodos)**



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



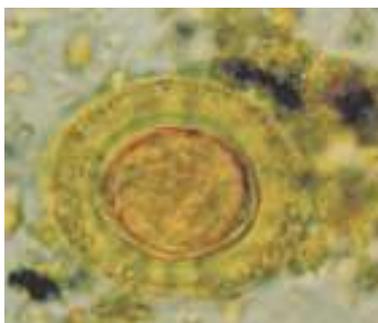
**Figura A2.11.** Huevo de *Diphylobothrium pacificum*, coloración lugol (100X)



**Figura A2.12.** Huevos de *Dipylidium caninum* en cápsula ovígera, coloración eosina (200X)



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



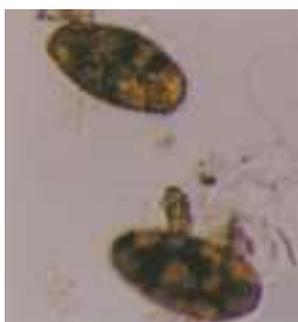
**Figura A2.14.** Huevo de *Hymenolepis diminuta* con solución de lugol (400X)



**Figura A2.15.** Huevos de *Fasciola hepatica*, solución salina (200X)



**Figura A2.16.** Huevos de *P. mexicanus* = *Paragonimus peruvianus* (400X)



**Figura A2.17.** Huevos de *Paragonimus peruvianus* = *P. mexicanus* (100X)

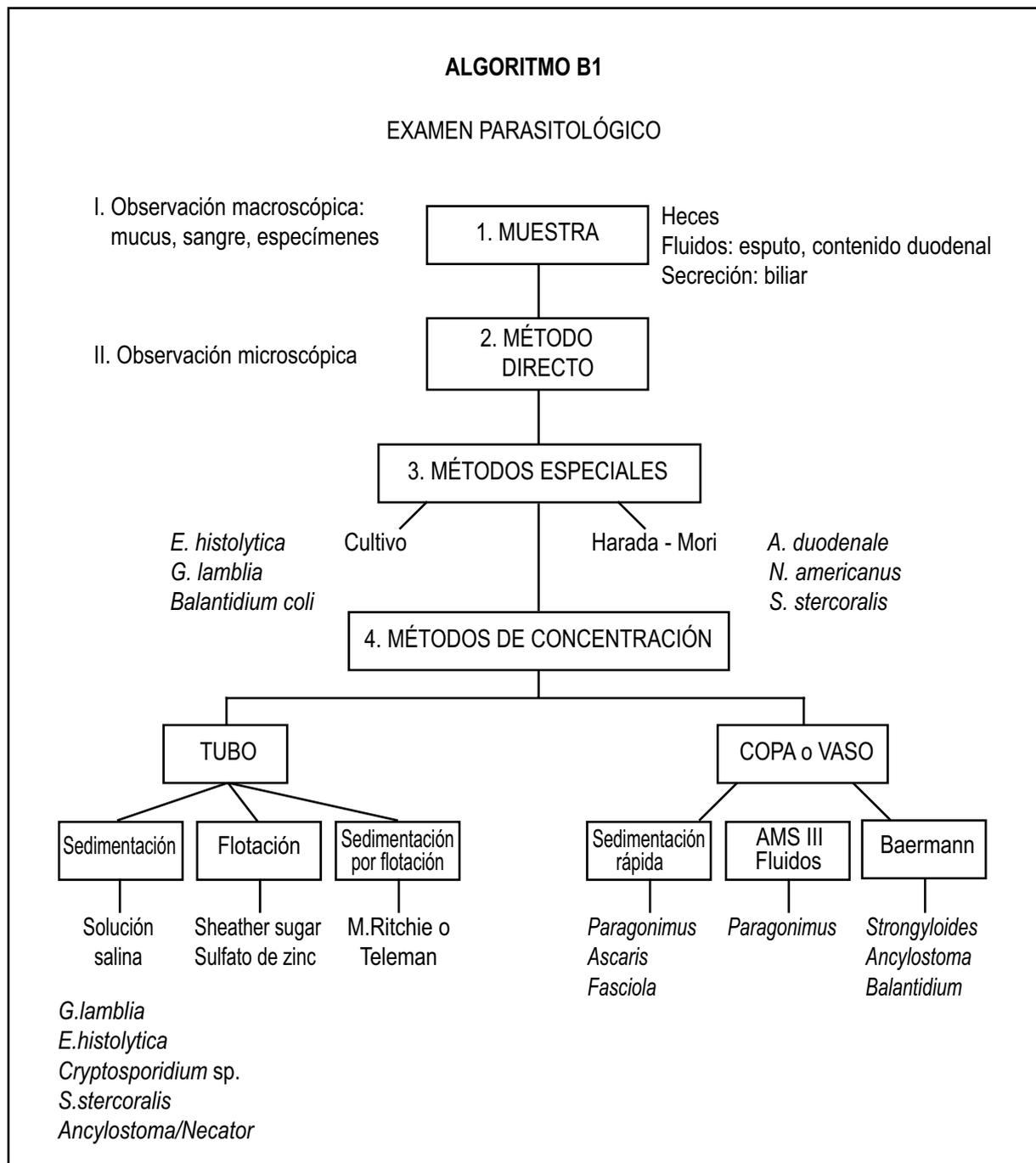


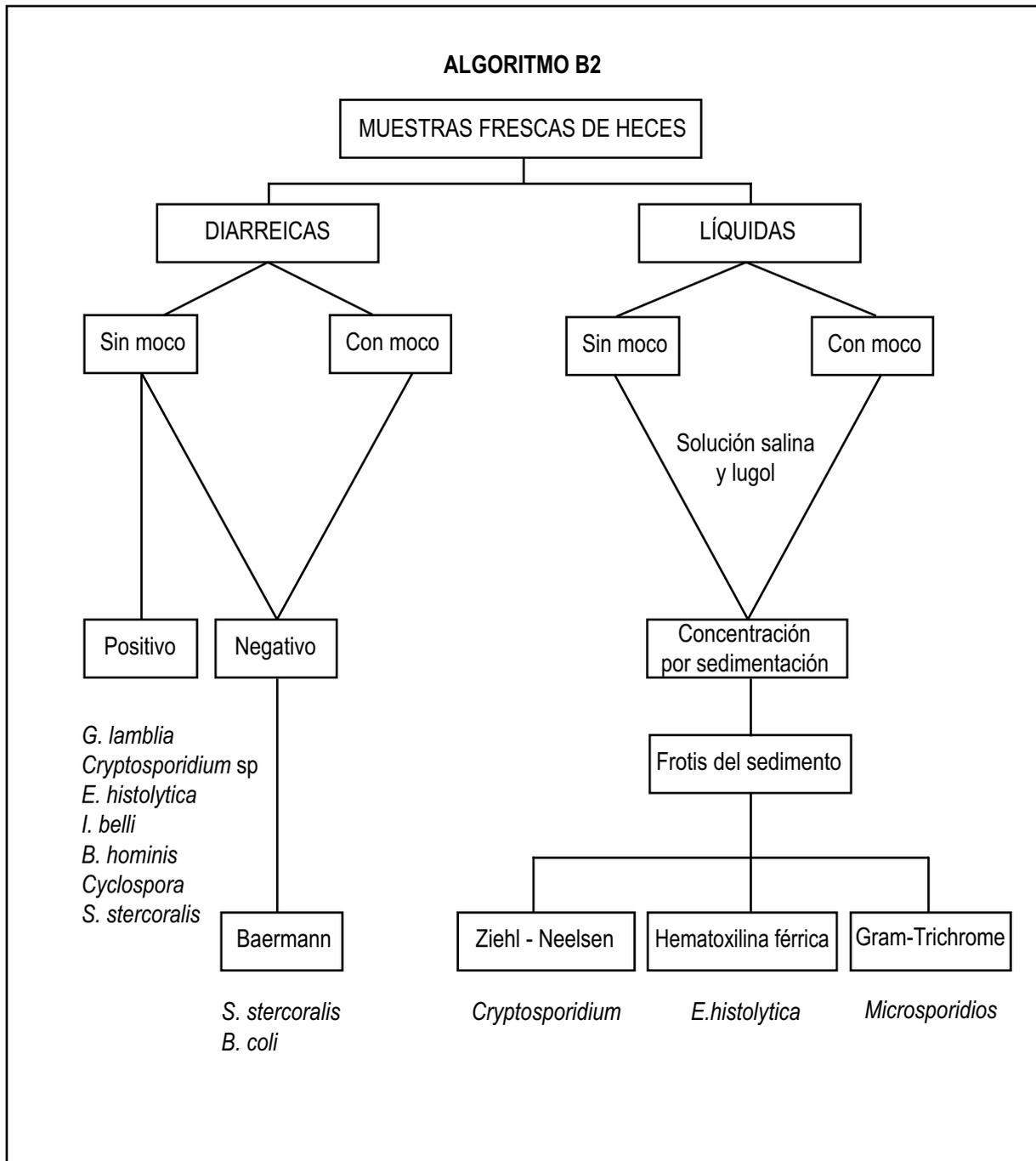
**Figura A2.18.** *Clonorchis sinensis* con solución (400X)

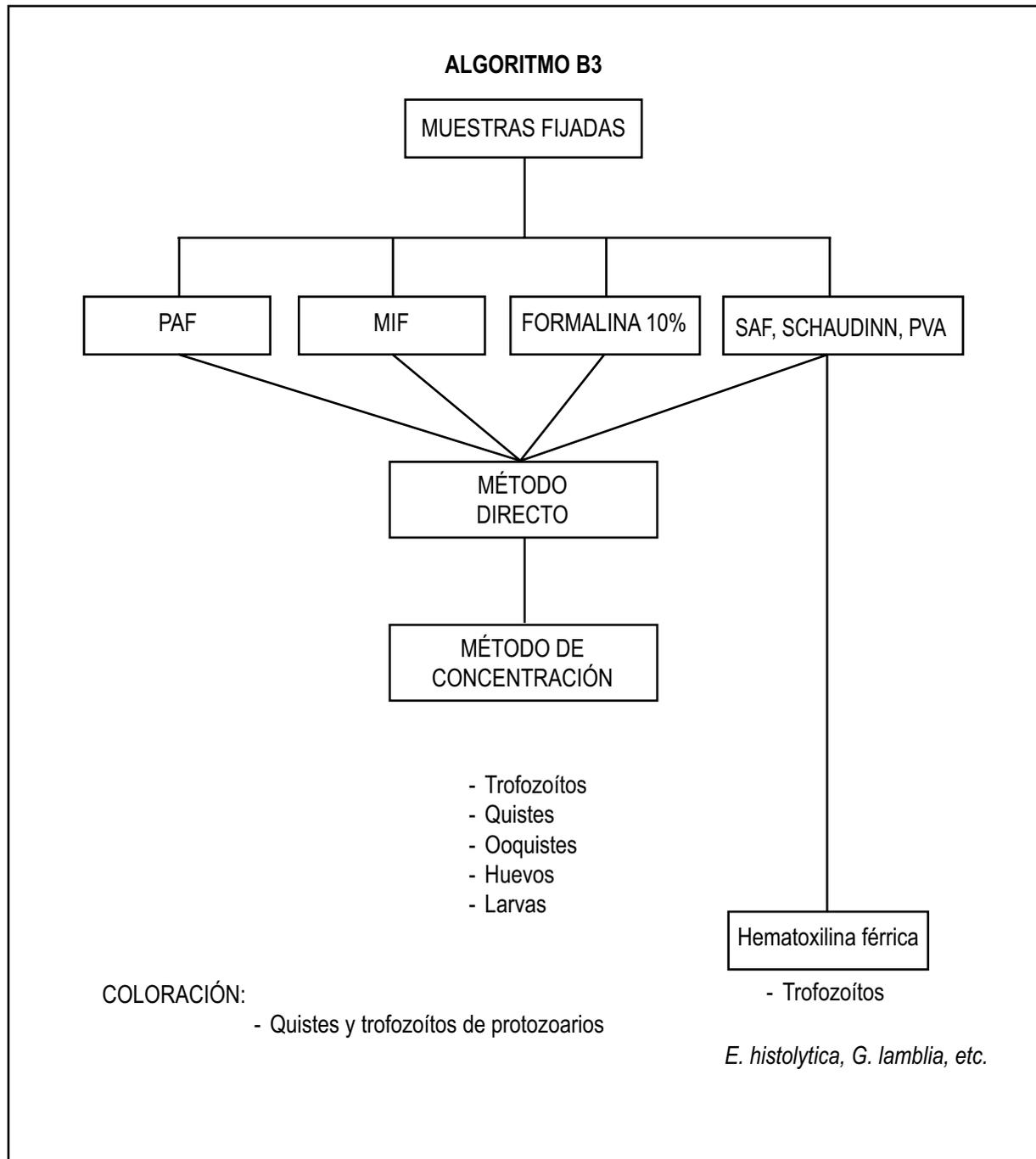
Fuente: Fotografías originales.

## ANEXO B

### ALGORITMOS PARA EL EXAMEN PARASITOLÓGICO







## ANEXO C

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y COLORANTES

#### C1 COLORANTES

##### C1.1 Para Protozoarios

###### C1.1.1 *Chromotrope*

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

###### C1.1.2 *May Grunwald*

May Grunwald .....	0,24 g
Alcohol absoluto .....	100,00 mL

###### C1.1.3. *Hematoxilina férrica (Solución Stock)*

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

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

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

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

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

###### C1.1.5 *Verde de malaquita para Cryptosporidium*

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

###### C1.1.6 *Azul de metileno*

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

## **C1.2 Para microsporidios**

### *C1.2.1 Coloración Gram*

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

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

### *C1.2.2 Chromotrope 2R*

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

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

## **C1.3 Para helmintos**

### *C1.3.1 Carmín clorhídrico*

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

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

### *C1.3.2 Hematoxilina Delafield*

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

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

**C1.3.3** *Rojo de Congo 1%*

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

**C1.3.4** *Tionina*

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

**C1.3.5** *Azure A*

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

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

Glicerina comercial ..... 100,00 mL  
Agua destilada ..... 100,00 mL  
Verde de Malaquita 0.3% ..... 1,00 mL (1 g + alcohol de 95% 100 mL)

**C1.3.7** *Eosina 1%*

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

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

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

**C2. COLORANTES VITALES**

**C2.1 Para protozoarios**

Rojo neutro ..... 0,1%  
Verde brillante ..... 0,1%  
Azul de cresil brillante ..... 0,2%

Diluir en solución salina.

**C2.2 Para helmintos**

Azul de cresil brillante ..... 0,02%  
Azul de metileno ..... 0,02%  
Rojo neutro ..... 0,02%

**C3 FIJADORES O CONSERVADORES**

**C3.1 PAF**

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

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

**C3.2 PVA**

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

*Solución 1:*

Acido acético glacial .....	5,00 mL
Glicerol .....	1,50 mL
Solución Schaudinn .....	93,50 mL (o hidróxido de sodio 4,00 g)

*Solución 2 (Solución Schaudinn):*

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

**C3.3 MIF**

*Solución A :*

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

*Solución B:*

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

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

**C3.4 AFA**

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

**C3.5 SAF**

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

**C3.6 Formol al 10%**

1. Formaldehído (40%) ..... 100,00 mL  
Agua destilada ..... 900,00 mL
2. *Formalina 10%*  
Formol ..... 10,00 mL  
Solución salina 0.85% ..... 90,00 mL  
PBS 0,01 M pH 7,2

**C3.7 Solución Schaudinn**

- Bicloruro de mercurio (6%) ..... 20,00 mL  
Alcohol 95% ..... 10,00 mL  
Acido acético glacial ..... 1,50 mL

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

- Solución A (Ácido clorhídrico) ..... 4,50 mL  
Agua destilada ..... 100,00 mL  
Solución B (Sulfato de sodio) ..... 9,60 g  
Agua destilada ..... 100,00 mL

Mezclar la solución A y B v/v y agregar 2 mL de éter.

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

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

**C3.9.2 Formol comercial ..... 5,00 mL**

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

**C4 SOLUCIONES****C4.1 Suero fisiológico**

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

**C4.2 Solución de sulfato de zinc**

- Sulfato de zinc ..... 33,30 g  
Agua destilada ..... 1000,00 mL

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

**C4.3 Solución de lugol**

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

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

**C4.4 Solución de Sheather Sugar**

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

**C4.5 Solución saturada de azúcar**

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

**C4.6 Solución mordiente**

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

**C4.7 Solución de salicilato de metilo**

**C4.8 Solución de alcohol-ácido 3%**

Ácido clorhídrico concentrado ..... 3,00 mL  
Etanol al 95% ..... 97,00 mL

**C4.9 Solución de hidróxido de sodio**

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

**C4.10 Tintura de yodo (solución madre)**

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

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

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

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

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

Acido fénico (qp) .....	1,00 g
Acido láctico .....	1,00 mL
Glicerina .....	2,00 mL
Agua destilada .....	1,00 mL

**C4.13 Solución de colorante (coloración tricrómica)**

Acido Acético glacial al 1% .....	1,00 mL
Alcohol 90% .....	99,00 mL

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

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

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

*C4.14.2 Hipoclorito de sodio*

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

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

Fenol .....	3,00 ó 4,00 g
Agua .....	100 mL

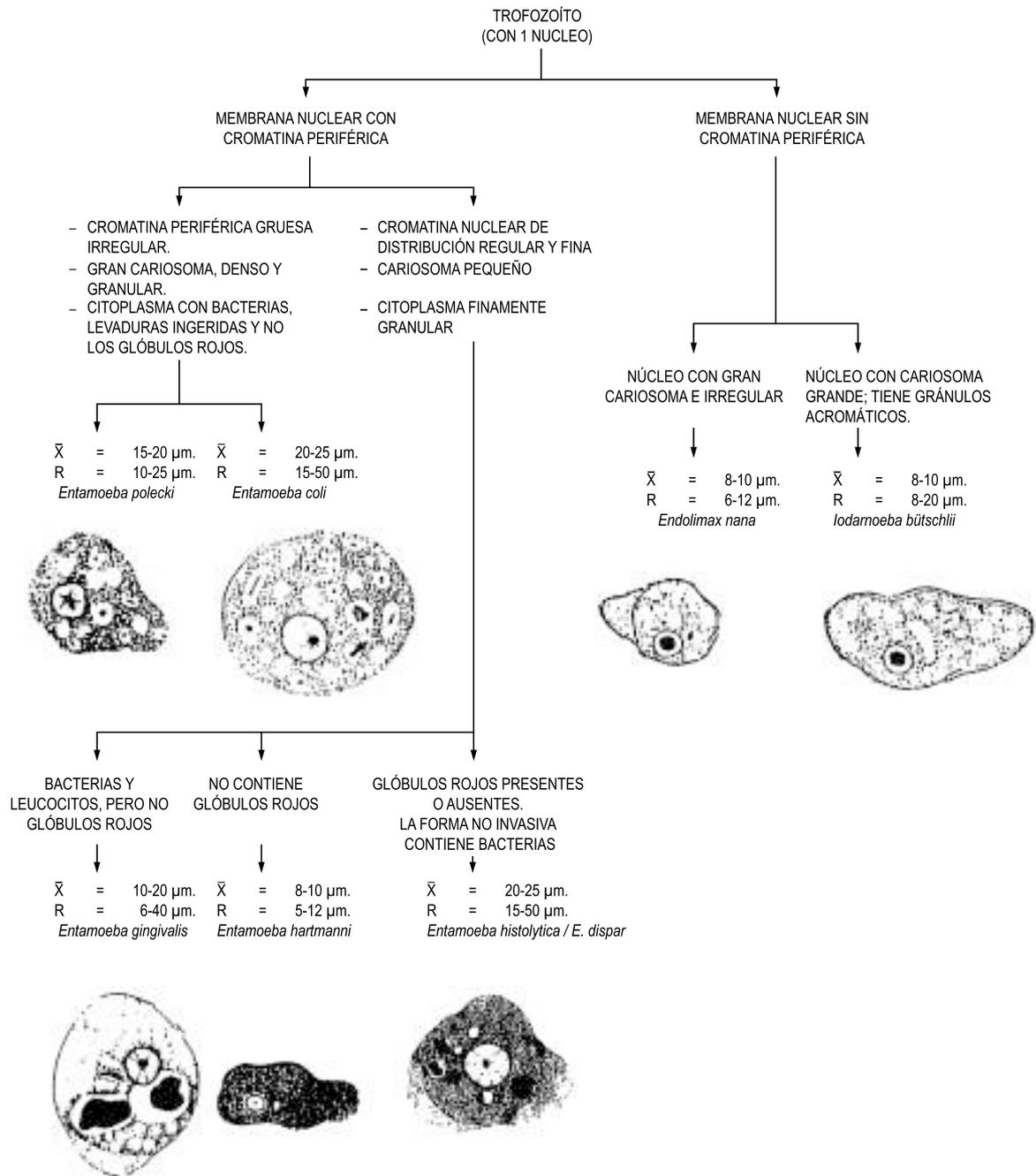
**C5. MEDICAMENTOS O PRODUCTOS QUE NO DEBEN INGERIRSE PREVIO AL EXAMEN PARASITOLÓGICO**

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

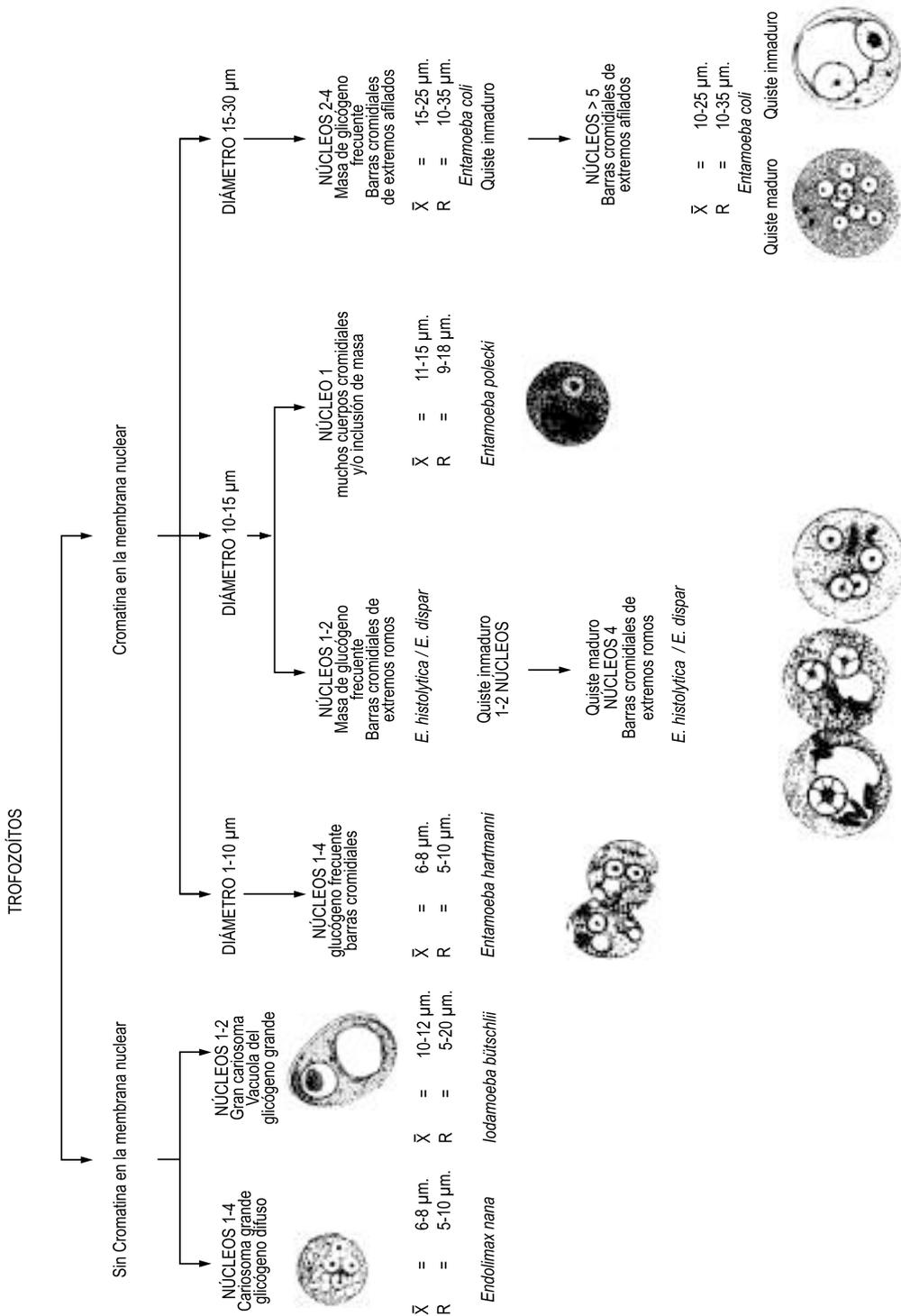
## ANEXO D

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

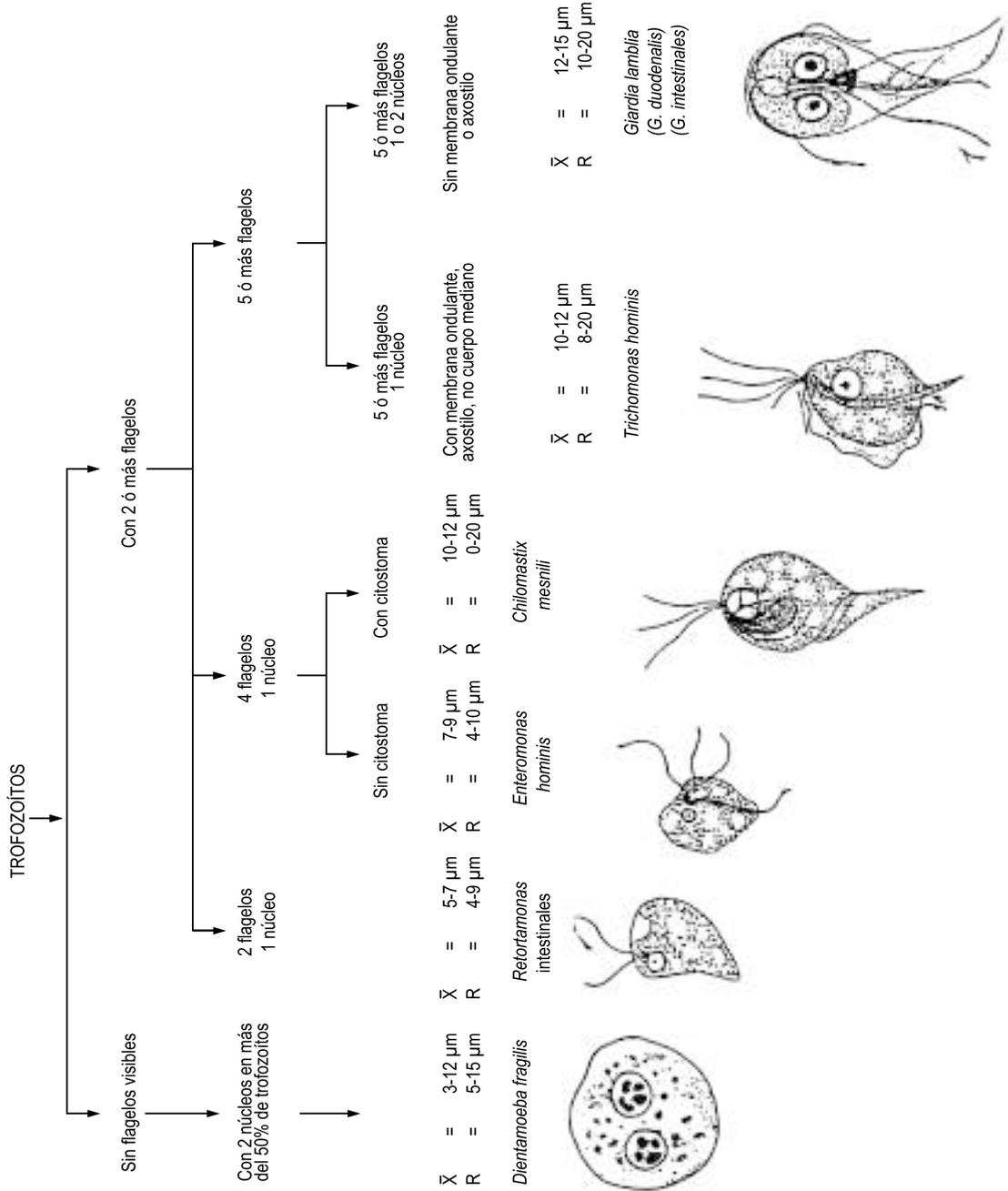
#### D1. CLAVE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AMEBAS (EXAMEN EN FRESCO O TINCIÓN)



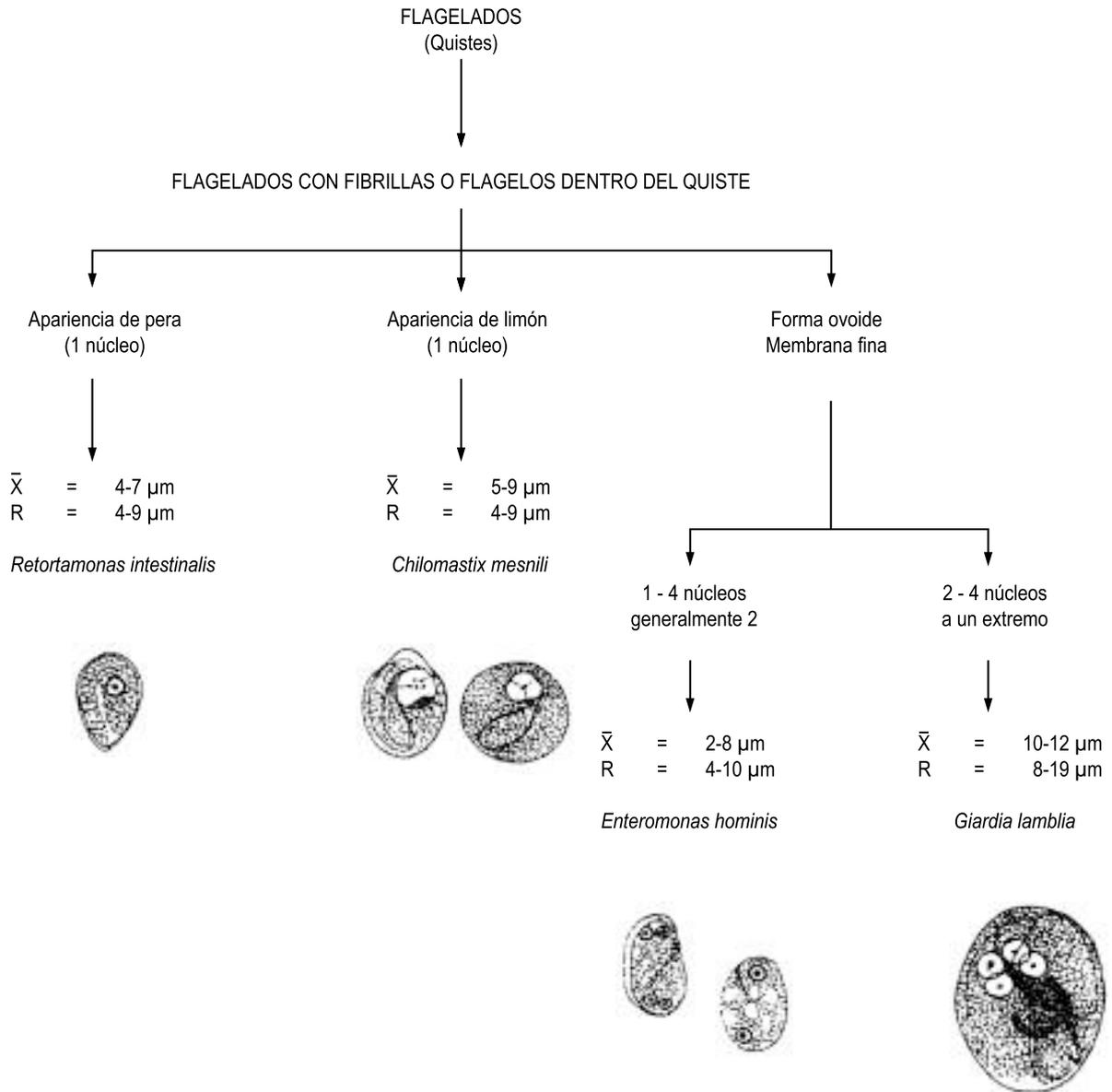
## D2. CLAVE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE QUISTES DE AMEBAS (EXAMEN EN FRESCO Y CON TINCIÓN)



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



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



**D5. CLAVE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HUEVOS DE HELMINTOS**

- a. Huevo no operculado, esférico, con 6 ganchos, embrionados ..... b  
 Huevo semejante al de ..... e
- b. Huevos separados ..... c  
 Huevos en paquetes 12 ó más ..... *Dipylidium caninum*
- c. Huevo de membrana gruesa con radiaciones conteniendo embrión con ganchos ..... *Taenia* spp  
 Huevo de membrana fina, separado del embrióforo por una matriz gelatinosa ..... d
- d. Filamentos ocupa el espacio entre el embrióforo y la membrana externa ..... *Hymenolepis nana*  
 Sin filamentos entre el embrióforo y la membrana externa ..... *H. diminuta*
- e. Huevo operculado ..... f  
 Huevo no operculado ..... j
- f. Huevo < 35mm *Clonorchis, Opistorchis, Heterophyes, Metagonimus* .....  
 Huevo > 38mm ..... g
- g. Huevo 38-45 mm ..... *Dicrocoelium*  
 Huevo > 60mm ..... h
- h. Huevo con opérculo sobresaliente ..... *Paragonimus*  
 Huevo sin opérculo sobresaliente ..... i
- i. Huevo > 85 mm ..... *Fasciola, Fasciolopsis, Echinostoma*  
 Huevo < 75 mm ..... *Diphyllobothrium*
- j. Huevo > 75 con espina ..... k  
 Huevo < 75 sin espina ..... m
- k. Espina terminal ..... *Schistosoma haematobium*  
 Espina postterminal ..... l
- l. Espina lateral inconspicua o ausente ..... *S. japonicum*  
 Espina lateral prominente ..... *S. mansoni*
- m. Huevo con gruesa membrana y mamelonada ..... *A. lumbricoides*  
 Huevo sin la membrana mamelonada ..... n
- n. Huevo con apariencia de barril con 2 tapones operculares ..... o  
 Huevo sin la apariencia de barril, sin opérculos ..... p
- o. Membrana no estriada ..... *Trichuris trichiura*  
 Membrana frecuentemente estriada ..... *Capillaria* sp
- p. Huevo plano en un lado ..... *Enterobius vermicularis*  
 Huevo simétrico ..... q
- q. Huevo grande c/aire en extremos ..... *Heterodera, Meloidogyne*  
 Huevo sin glóbulos polares (aire) ..... r
- r. Huevo con blastómeros, de extremos redondeados 56-76  $\mu$ m ..... *Ancylostoma* o *Necator*  
 Huevo con numerosos blastómeros, los 2 extremos más o menos afilados de 73-95  $\mu$ m ..... *Trichostrongylus* sp

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

- 1.a. Esófago casi igual a la longitud total del cuerpo. Cuerpo corto y delgado, mide cerca de 0.5 mm de longitud, cola de extremo romo y a veces bifurcado ..... *Strongyloides stercoralis*
- 1.b. Esófago cerca de la longitud total del cuerpo, más grande o más extendido. .... 2
- 2.a. El cuerpo más grande entre las 4 especies, cerca de 0,75 mm, la luz intestinal no es recta, sino en zigzag; extremo de la cola (no de la envoltura) redondeado y como una perilla *Trichostrongylus orientalis*
- 2.b. Cuerpo más corto y luz intestinal recta, cola con extremos afilados ..... 3
- 3.a. Cuerpo corto y extendido, en forma de huso; mide cerca de 0,59 mm y la envoltura cerca de 0,66 mm de longitud, cabeza redondeada, los estiletes de igual grosor y más apreciable, la porción anterior del intestino más o menos tan ancha como el bulbo esofágico, el primordio genital situado por delante de la mitad del intestino, la terminación de la cola forma un ángulo más ancho con extremo afilado; envoltura claramente estriada ..... *N. americanus*
- 3.b. Cuerpo largo y delgado, más o menos de forma cilíndrica mide cerca de 660 mm y la envoltura cerca de 720 mm de longitud, cabeza aplanada, estiletes de desigual grosor y poco apreciables, intestino de menor diámetro que el esófago, el primordio genital situado detrás de la porción media del intestino, extremo terminal de la cola estrecho y alargado, con punta menos redondeada, la envoltura no tan claramente estriada ..... *A. duodenale*

## ANEXO E

### ELEMENTOS QUE SE PUEDEN CONFUNDIR CON LOS PARÁSITOS INTESTINALES

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

#### E1. ELEMENTOS O CÉLULAS HUMANAS

##### E1.1 Macrófagos

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

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

##### E1.2. Neutrófilos polimorfonucleares (PMNS)

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

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

### **E1.3 Eosinófilos**

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

### **E1.4 Cristales de Charcot-Leyden**

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

### **E1.5 Glóbulos rojos**

Los glóbulos rojos tienen un diámetro de 7,5  $\mu\text{m}$ . Su presencia en las heces puede indicar ulceración a nivel del tacto intestinal u otro problema hemorrágico.

### **E1.6 Células epiteliales**

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

## **E2. ELEMENTOS VEGETALES O ANIMALES**

### **E2.1 Levaduras**

Células ovoides de 4 a 6  $\mu\text{m}$  y que pueden encontrarse en forma de levaduras o hifas.

### **E2.2 Pelos o tricomas**

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

### **E2.3 Célula vegetal**

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

### **E2.4 Fibra muscular no digerida**

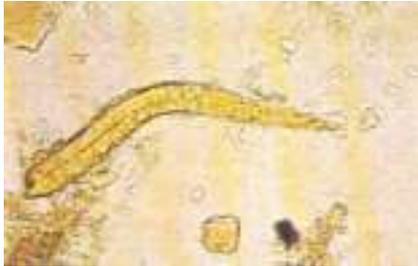
Se reconoce por las estrías (Figuras E5 y E6).

### **E2.5 Célula coloidal o de grasa**

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

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

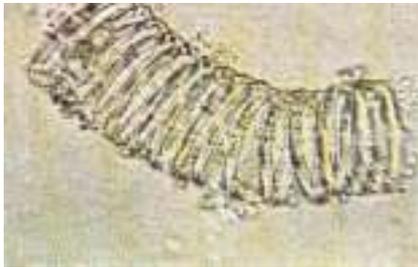
## ESTRUCTURAS SEMEJANTES A LOS PARÁSITOS



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



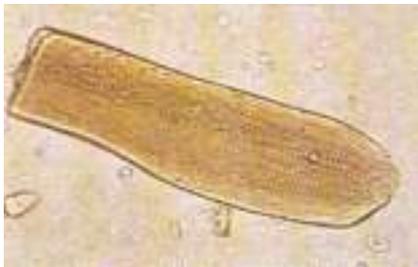
**Figura E2.** Parénquima de célula vegetal no digerida. Coloración lugol



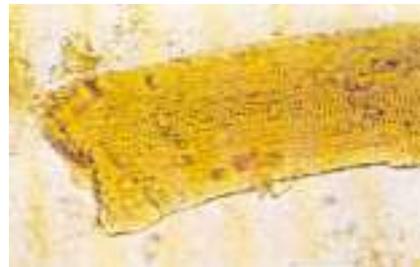
**Figura E3.** Vaso espiralado (solución salina)



**Figura E4.** Célula vegetal de vainas, más o menos homogénea. Coloración lugol



**Figura E5.** Fibra vegetal no digerida. Coloración lugol



**Figura E6.** Fibra muscular estriada con yodo. (lugol)

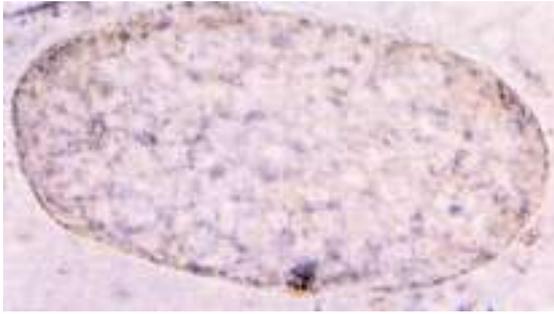


**Figura E7.** Gránulo, con yodo, deformado al calor del microscopio. Coloración lugol



**Figura E8.** Célula coloidal, refráctil y amorfa. Coloración lugol

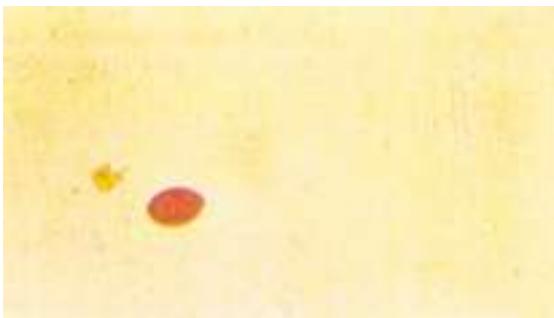
Fuente: Spencer FM, Monroe LS. The Color Atlas of Intestinal Parasites; 1961.



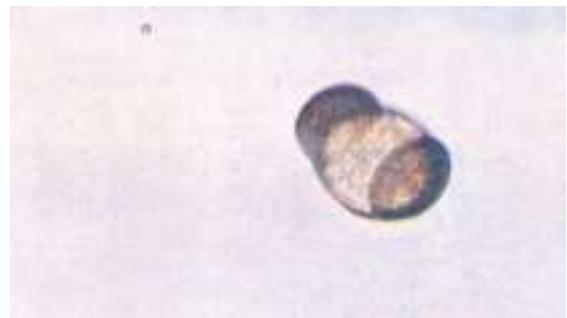
**Figura E9.** Material semejante a *Fasciola hepatica*, pero sin opérculos. Coloración lugol



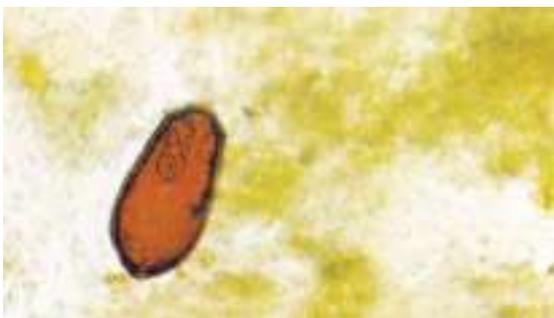
**Figura E10.** Material semejante a céstodes y estructuras larvarias. Coloración lugol



**Figura E11.** Material vegetal periforme semejante a *Metagonimus*. Coloración Lugol



**Figura E12.** Resto vegetal semejante a grano de polen. Coloración lugol



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



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

Fuente: Suzuki N. Color Atlas of Human Helminth Eggs; 1986.

## ANEXO F

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

#### FICHA N°1

Título: Registro de los parásitos intestinales en el laboratorio por mes por año.

La identificación del establecimiento y el año correspondiente se escribe en la parte superior.

La ficha consta de dos partes:

##### Primera parte.

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

##### Segunda parte.

Contiene: Código Internacional, nombre del agente, registro por mes y por año.

#### FICHA N°2

Título: Registro de los parásitos intestinales en el laboratorio por mes por año.

La identificación del establecimiento y el año correspondiente se escribe en la parte superior.

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

##### Primera parte.

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

##### Segunda parte.

Contiene: monoparasitismo y poliparasitismo o la asociación parasitaria.

##### Tercera parte.

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

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

FICHA N° 1

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

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

CI AGENTES:

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

\* Se localiza en el pulmón.

\*\* Se localiza en el hígado.

CI = Código Internacional .

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

FICHA N° 2

**REGISTRO Y CONTROL DE MENSUAL DE LOS ENTEROPARÁSITOS**  
**AÑO.....**

Establecimiento \_\_\_\_\_ Responsable \_\_\_\_\_

Grupo / Parásito / Mes	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SET	OCT	NOV	DIC	TOTAL
Protozoarios N°													
	%												
Helmintos N°													
	%												
Protozoarios/Helmintos N°													
	%												
TOTAL N°													
	%												
Monoparasitismo													
Biparasitismo													
Triparasitismo													
Tetraparasitismo													
Pentaparasitismo													
Hexaparasitismo													
Heptaparasitismo													
Octaparasitismo													

**POR GRUPO ETÁREO**

1,1 - 05 años													
5,1 - 10 años													
10,1 - 5 años													
15,1 - 20 años													
20,1 - 25 años													
25,1 - 30 años													
30,1 - 35 años													
35,1 - 40 años													
40,1 - 45 años													
45,1 - 50 años													
50,1 - 55 años													
55,1 - 60 años													
> 60 años													

### ANEXO G

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

Paciente..... Edad..... Sexo ..... N°.....  
 Institución..... Dirección..... Dpto.....  
 Muestra: Heces ( ) Aspirado..... ( ) Otro.....  
 Lugar y fecha.....

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

CULTIVO: Aislamiento Primario: Fecha.....Medio.....°C....Especies.....

**SUBCULTIVO:**

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

**AISLAMIENTO**

N° .....Medio.....

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

Observaciones.....  
 .....  
 .....

Responsable.....

## ANEXO H

### PARÁSITOS NO INTESTINALES: *Paragonimus* y *Fasciola* (DISTOMATOSIS PULMONAR Y HEPÁTICA)

#### H.1 MUESTRA DE ESPUTO O SECRECIÓN BILIAR Y MUESTRA FECAL

##### H.1.1 Fundamento

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

##### H.1.2 Materiales

H.1.2.1 Láminas portaobjetos.

H.1.2.2 Tubos 15 x 150 mm.

H.1.2.3 Pipetas Pasteur.

H.1.2.4 Vaso o copa cónica.

H.1.2.5 Placa Petri.

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

H.1.2.7 Agua destilada.

H.1.2.8 Aplicadores o 1/3 de bajalenguas.

##### H.1.3 Obtención de la muestra

###### H.1.3.1 *Muestra de esputo*

- a. La muestra se obtiene del paciente con tos persistente.
- b. Colectar la muestra en un frasco de boca ancha después de un esfuerzo de tos (4 a 8 mL, aproximadamente). Se prefiere la expectoración de 24 horas.

###### H.1.3.2 *Muestra de heces*

Colectar la muestra en un frasco de boca ancha (3 a 5 g aproximadamente).

#### H.1.3.3 *Muestra de secreción biliar*

Colectar la muestra en un frasco o tubo limpio.

#### H.1.4 **Conservación de la muestra**

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

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

#### H.1.5 **Procedimiento**

##### H.1.5.1 *Método directo*

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

##### H.1.5.2 *Método de concentración:*

###### a. *Muestra de esputo o secreción biliar*

- Agregar una solución de hidróxido de sodio 2% al frasco que contiene la muestra y homogeneizar.
- Pasar a través de una gasa a un tubo de ensayo de 15 x 150 mm o tubo cónico de 50 mL, centrifugar durante 10 minutos a 2 000 r.p.m. o dejar reposar de 1 a 2 horas si no se cuenta con centrifuga.
- Eliminar el sobrenadante y adicionar hidróxido de sodio 2%, dejar en reposo de 90 a 120 minutos.
- Obtener el sedimento con ayuda de una pipeta, colocarlo en una lámina y observar al microscopio.

###### b. *Muestra de heces*

Realizar el procedimiento según al ítem 5.3.

#### H.1.6 **Observación**

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

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

## ANEXO I

### MICROMETRÍA

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

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

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

#### Calibración del microscopio usando un ocular micrométrico:

Procedimiento de calibración:

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

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

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

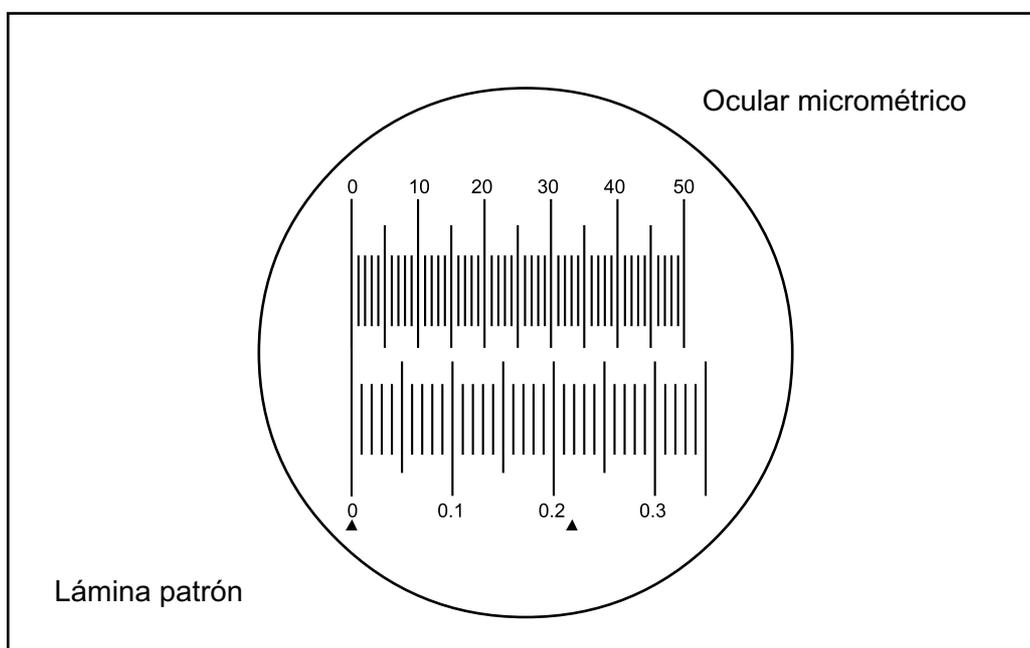
$$= 0,0066 \text{ mm} \times 1\mu\text{m}/1,000 \text{ mm} = \mathbf{6,6 \mu\text{m}}$$
, del aumento calibrado

Resulta una unidad de ocular micrométrico es equivalente a 6,6  $\mu\text{m}$

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

Puede preparar su tabla de calibración para cada microscopio:

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



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



**ARTES Y DISEÑOS LASER S.R.Ltda.**  
Calle Las Turquesas 263-265-269  
Balconcillo  
Lima 13 - Perú  
Telf.: 265-8320 Telefax: 266-0075

Abril 2003  
Tiraje: 3,000 ejemplares

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD  
SEDE CENTRAL**

Cápac Yupanqui N° 1400, Jesús María  
Lima 11, Apartado N° 451

Telf.: 471 9920 - Fax: 471 0179

E-mail: [postmaster@ins.gob.pe](mailto:postmaster@ins.gob.pe)

■ Página Web: [www.ins.gob.pe](http://www.ins.gob.pe)