



EHAS
ENLACE HISPANO AMERICANO DE SALUD

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE PARÁSITOS INTESTINALES

Proyecto AECID 2012

*“Nuevos procedimientos para el diagnóstico de enfermedades olvidadas
utilizando tele-microscopía de bajo coste”.*





TABLA DE CONTENIDOS

ANTES DE COMENZAR

Características de la muestra.
Cuándo debe tomarse la muestra.
Cómo debe recogerse la muestra.
Registro de la muestra.
Ejemplos de muestras.

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

1. TEST DE GRAHAM

- A) Material necesario.
- B) Toma de la muestra.
- C) Observación de la muestra.

2. TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADA

- A) Material necesario.
- B) Procesamiento para la Tinción.
- C) Observación en el Microscopio.

3. EXAMEN EN FRESCO

- A) Material necesario.
- B) Procesamiento de la muestra.

4. TÉCNICAS DE CONCENTRACIÓN DE HECES

- A) Material necesario.
- B) Procesamiento de la muestra.

5. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *TAENIA*

- A) Visualización “al trasluz” de anillos de *Taenia*.
- B) Método de Tinta China.

FUENTES FIGURAS



TÉCNICA	PARÁSITO	OBSERVACIONES
Test de Graham	<i>Enterobius</i> o <i>Taenia</i>	
Tinción de Ziehl-Neelsen modificada	<i>Cryptosporidium</i> , <i>Cyclospora</i> e <i>Isospora</i>	
Examen en fresco	Trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	Debe ser inmediata una vez obtenida la muestra.
Concentración de heces	Quistes, huevos y larvas de parásitos intestinales	Es necesario utilizar centrífuga.
Tinta china (o a simple vista)	Especies de <i>Taenia</i>	Ha de realizarse cuando se observan anillos de la <i>Taenia</i> en las heces.

ANTES DE COMENZAR

CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

La muestra para el estudio de las diferentes parasitosis intestinales son las heces. En las heces de los pacientes parasitados podemos encontrar tanto “elementos” parasitarios microscópicos (huevos, quistes, larvas) como estructuras visibles sin necesidad de microscopio como pueden ser proglótides (anillos) de *Taenia* o incluso gusanos adultos. Por ello, **antes de procesar la muestra para examen microscópico se debe hacer una inspección visual** para descartar la presencia de estas estructuras visibles, así como para detectar la presencia de sangre y/o moco en las mismas.

Las imágenes microscópicas de los diferentes parásitos intestinales se encuentran disponibles en el siguiente enlace:

<http://www.cdc.gov/dpdx/az.html>

CUÁNDO DEBE TOMARSE LA MUESTRA

Como norma general, cuando se sospecha que un paciente padece una parasitosis intestinal deben examinarse **3 muestras** de heces recogidas en **días diferentes**, ya que la eliminación de quistes y huevos no se produce de forma constante a lo largo del día ni a lo largo de los días.

CÓMO DEBE RECOGERSE LA MUESTRA

Las heces deben recogerse en un recipiente de boca ancha y tapón de rosca, similar al que se emplea para tomar las muestras para estudio de tuberculosis, con las siguientes características:

- Boca ancha (no menos de 5 cm de diámetro) para una adecuada recolección y posterior procesamiento de la muestra.





- Capacidad entre 30-50 ml.
- Cierre hermético, con tapa de rosca (evitará el derramamiento y la producción de aerosoles).
- Material plástico, desechable, resistente a roturas y transparente o semitransparente, para poder observar las características y calidad de la muestra sin necesidad de abrir el bote.
- El envase debe etiquetarse o rotularse con los datos del paciente. El etiquetado o rotulado debe hacerse siempre en la pared del bote, nunca en la tapa del mismo.

REGISTRO DE LA MUESTRA

A su llegada al laboratorio, los datos de cada muestra (tipo de muestra, nº de identificación de la muestra, nombre del paciente...) deben anotarse en el libro de registro, así como los resultados obtenidos tras su observación macro y microscópica.

EJEMPLOS DE MUESTRAS

Las imágenes microscópicas de los diferentes parásitos intestinales se encuentran disponibles en el siguiente enlace:

<http://www.cdc.gov/dpdx/az.html>

1. Enterobius vermicularis (imágenes de huevos y gusanos adultos):

<http://www.cdc.gov/dpdx/enterobiasis/gallery.html#eggs>

<http://www.cdc.gov/dpdx/enterobiasis/gallery.html#adult>

2. Taenia:

<http://www.cdc.gov/dpdx/taeniasis/gallery.html>

3. Cryptosporidium oocystes:

<http://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/gallery.html#oocystsZNacidfast>

<http://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/gallery.html#oocystsacidfast>

4. Cyclospora:

<http://www.cdc.gov/dpdx/cyclosporiasis/gallery.html#oocystsAcidFast>

(teñido con Ziehl-Neelsen modificada)

<http://www.cdc.gov/dpdx/cyclosporiasis/gallery.html#oocystsWetMount>

(sin teñir)

5. Isospora:

<http://www.cdc.gov/dpdx/cystoisosporiasis/gallery.html>

6. Entamoeba histolytica:

<http://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/gallery.html#cystswetmounts>



PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

1. TEST DE GRAHAM

El test de Graham es una prueba muy sencilla que permite diagnosticar la parasitación por nematodos del género *Enterobius vermicularis* (*Oxiuros*) y, en ocasiones, por cestodos del género *Taenia*.

Las hembras de *Enterobius* realizan la puesta de sus huevos alrededor del esfínter anal, normalmente por las noches, lo que suele acompañarse de un intenso picor en la zona. Esta prueba consiste en tomar una muestra de la región perianal con ayuda de cinta adhesiva transparente para poder observar los huevos de este parásito y, de esta manera, hacer el diagnóstico.

En cuanto a la parasitación por *Taenia*, en ocasiones, la salida a través del esfínter de anillos llenos de huevos de este gusano (proglótidos) puede favorecer el depósito de huevos en la región perianal, por lo que el test de Graham puede resultar de ayuda en el diagnóstico.

A) Material necesario

- Portaobjetos.
- Cinta adhesiva transparente.
- Material (etiqueta, rotulador, etc) para identificar el portaobjetos.

B) Toma de la muestra

Para un adecuado diagnóstico microscópico, la muestra debe tomarse a primera hora de la mañana, nada más levantarse el paciente y antes de que éste se lave, limpie o defaque (en el caso de la parasitación por *Taenia* no es necesario que sea a primera hora de la mañana).

- Pegar un fragmento de cinta adhesiva transparente en el extremo de un portaobjetos limpio y doblarla sobre el mismo, de tal forma que **la parte adhesiva quede orientada hacia el exterior**, tal y como se muestra en la imagen.
- Para tomar la muestra, separar los glúteos para poder visualizar bien la región perianal y pegar o apretar la cinta adhesiva sobre los márgenes del ano.

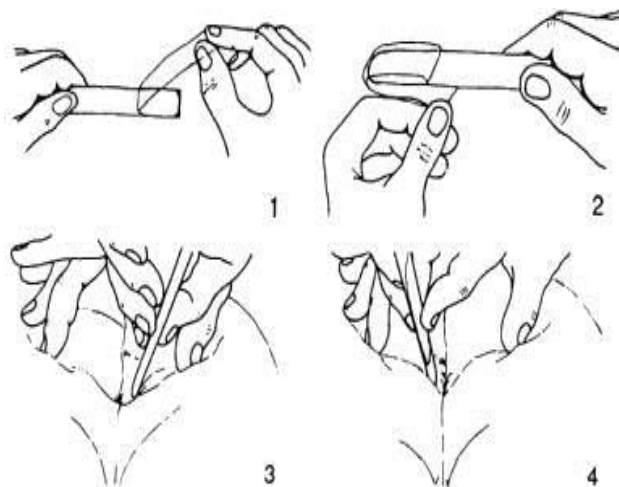


Figure 1: Procedimiento para realizar el Test de Graham



C) Observación en de la muestra

- Pegar la cinta adhesiva a lo largo del portaobjetos. La muestra ya está lista para poder observarla al microscopio.
- En caso de que al ir a hacer la toma se observen los gusanos adultos, éstos se pueden llevar también al laboratorio para su observación bien adheridos a un portaobjetos diferente mediante cinta adhesiva transparente o bien en un recipiente limpio que contenga alcohol.
- Una vez hecha la toma, la persona que la haya realizado **debe lavarse adecuadamente las manos para evitar el contagio**, ya que durante el procedimiento pueden quedar huevos adheridos a las mismas.



2. TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADA

Esta tinción es útil para visualizar quistes de protozoos intestinales que tienen la propiedad de ser ácido-alcohol resistentes (AAR).

Cryptosporidium es un protozoo (parásito unicelular) intestinal de elevada prevalencia a nivel mundial. Produce predominantemente diarrea acuosa con tendencia a la recurrencia **en niños y personas inmunodeprimidas**.

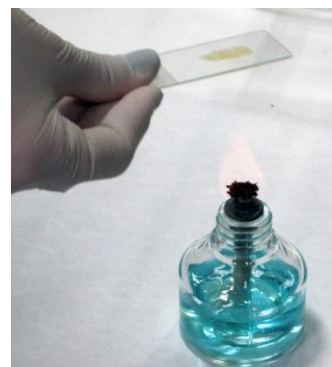
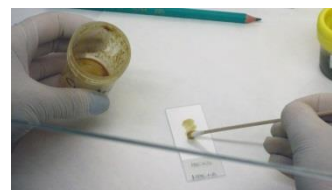
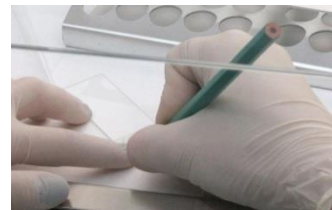
Cyclospora e *Isospora* suelen producir diarrea persistente, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos o con infección por el VIH (principalmente *Isospora*).

A) Material necesario

- Recipiente de boca ancha y tapón de rosca.
- Portaobjetos.
- Etiquetas o material para identificar la muestra.
- Aplicador o varillas para hacer la extensión.
- Mechero de alcohol/gas
- Metanol (en caso de no disponer de mechero).
- Reactivos para la tinción: Agua, Fucsina Fenicada, Alcohol-Ácido y Azul de Metileno.

B) Procesamiento para la Tinción

1. Etiquetar o identificar el portaobjetos.
2. Tomar una porción pequeña de las heces (principalmente aquellas que contengan moco) con ayuda de un aplicador o una varilla.
3. Hacer una extensión **fina** sobre el portaobjetos..
4. Dejar secar a temperatura ambiente.
5. Una vez seca, fijar la extensión con **METANOL** o bien aplicando calor con ayuda de un mechero (pasar el portaobjetos 2-3 veces sobre la llama de forma rápida para evitar que la muestra se queme) y dejar enfriar.
6. Cubrir la preparación con el reactivo **FUCSINA FENICADA** durante 5 minutos (toda la muestra quedará teñida de color rojo intenso).
7. Lavar con **AGUA**.
8. Decolorar con **ALCOHOL-ÁCIDO** durante 20-30 segundos (los quistes AAR de estos parásitos intestinales no se decoloran, permaneciendo de color rojo-fucsia).
9. Lavar con **AGUA**.



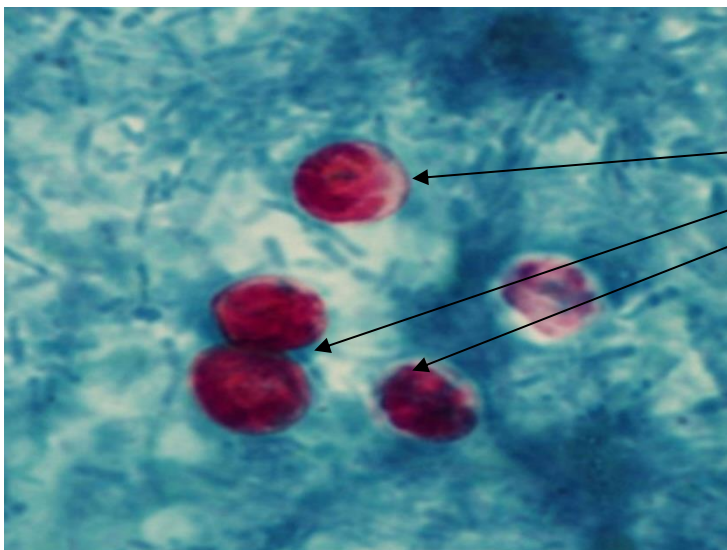


10. Cubrir la preparación con el reactivo **AZUL DE METILENO** durante 30 segundos.
11. Lavar con **AGUA**.
12. Secar la preparación y visualizar en el microscopio con el objetivo 100x (aceite de inmersión).



C) Observación en el microscopio

- Los quistes de estos parásitos se observarán de color de rojo/fucsia sobre fondo azul. En el siguiente enlace se pueden observar las características de cada uno de los quistes: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/MorphologyTables.htm>.
- Se pueden guardar en una caja alguna de las extensiones positivas, para tenerlas como referencia y control positivo.



Quistes de *Cryptosporidium* (AAR)
tras tinción de Kinyoun

Figura 2



3. EXAMEN EN FRESCO

Se realiza para la observación de las formas móviles de los protozoos intestinales (trofozoítos). La movilidad puede alterarse si la muestra se seca por lo que **su realización debe ser lo más rápida posible una vez obtenida la muestra** (antes de los 20-30 minutos tras su emisión).

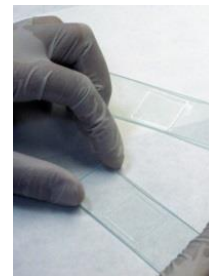
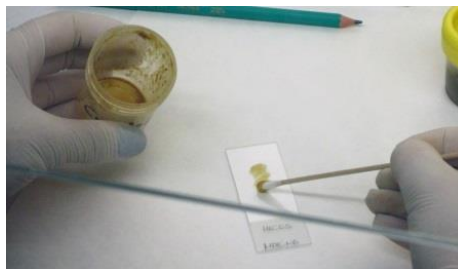
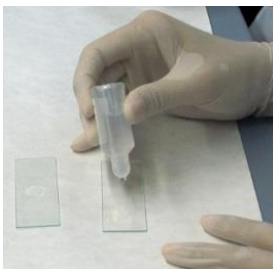
Esta técnica también puede emplearse **en los casos en los que no se disponga de centrífuga** o de los reactivos necesarios para realizar la técnica de concentración de las heces, aunque la sensibilidad es mucho menor.

A) Material necesario

- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Suero salino estéril.
- Varillas o palillos de madera.

B) Procesamiento de la muestra

- Dispensar sobre un portaobjetos limpio una gota de suero salino.
- Mezclar una pequeña cantidad de heces con el suero salino.
- Colocar un cubreobjetos sobre la muestra y observar rápidamente al microscopio con las lentes 10x y 40x.
- Para facilitar la visualización se puede añadir al portaobjetos una gota de lugol al 20% (diluido 1/5 en suero salino).





4. TÉCNICAS DE CONCENTRACIÓN DE HECES

Estas técnicas tienen como objetivo **aumentar la sensibilidad del estudio parasitológico** dado que, con frecuencia, las muestras fecales contienen escaso número de quistes o huevos de parásitos.

Existen diferentes métodos para concentrar las heces. Uno de los más utilizados es el de formalina – éter o formalina - acetato de etilo. Éste es un método que permite separar las heces en dos partes que no se mezclan, en una se localizarán restos fecales y en otra (sedimento) los elementos parasitarios.

A) Material necesario

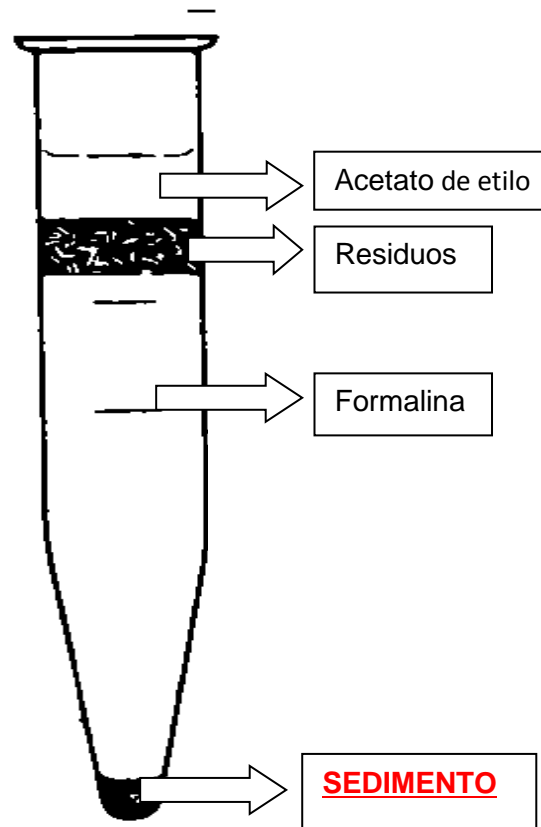
- Varillas o palillos de madera.
- Tubos de boca ancha.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Etiquetas, rotulador o material que permita etiquetar/identificar las muestras.
- Pipeta Pasteur.
- Formalina al 10%.
- Acetato de etilo.
- Tubos de centrifuga de 10 ó 15 ml.
- Centrifuga.
- Filtro o colador de café (diámetro poro de 425 μ).

B) Procesamiento de la muestra

- Identificar los tubos y portaobjetos con el n^o de identificación de cada una de las muestras que se vaya a examinar.
- En un tubo de boca ancha mezclar 7 ml de formalina al 10% o bien SAF (sodium acetato formalina) con 1 gr de heces aproximadamente (el tamaño de una avellana), ayudándose de varillas de madera, hasta conseguir una suspensión turbia. Tirar las varillas en el recipiente o contenedor acondicionado para desechar el material infeccioso.
- Dejar reposar 15 minutos la muestra.
- Colar la muestra utilizando un colador de café (diámetro de poro 425 μ) y verter el filtrado en un tubo limpio. Lavar cuidadosamente el colador para evitar contaminación cruzada entre las muestras.
- Añadir 3 ml de acetato de etilo (o en su defecto éter) y mezclar bien durante 15 segundos.
- Transferir a un tubo cónico de centrifuga y centrifugar durante 3 minutos a 3000 rpm. Si el equipo no alcanza esta velocidad, se harán 2 centrifugaciones consecutivas a 1500 rpm de 2 minutos cada una. Recuerde que la centrifuga debe estar equilibrada (tubos enfrentados con la misma cantidad).



- Una vez concluida la centrifugación deben observarse 4 capas en el tubo (acetato de etilo – tapón de residuos – formalina – sedimento) tal y como muestra la imagen.



Cuatro capas tras la última centrifugación

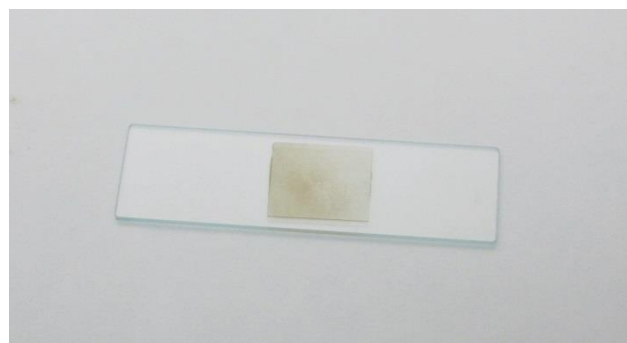
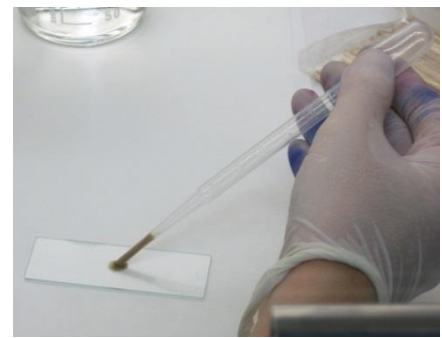
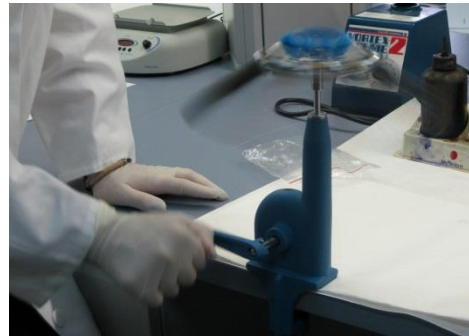
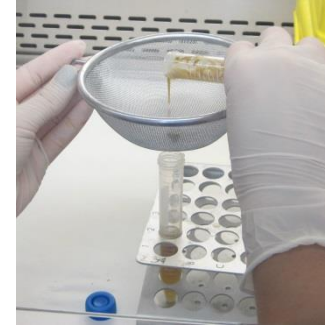
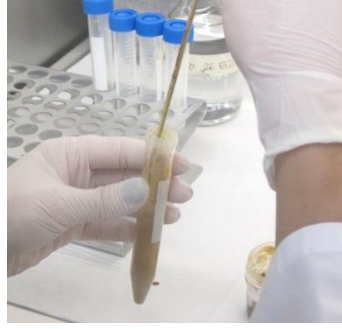
WHO

Figura 3

- Despegar cuidadosamente el tapón de residuos para evitar que caiga en el sedimento y verter el contenido líquido del tubo (acetato de etilo y formalina) en un contenedor para residuos evitando que caiga el sedimento. En el sedimento se encontrarán las formas parasitarias a estudiar.
- Mezclar bien el sedimento con ayuda de una pipeta y transferir una gota a un portaobjetos limpio.
- Colocar sobre la preparación un cubreobjetos.
- Examinar al microscopio con objetivos 10x y 40x.



- De forma adicional, para una mejor visualización se puede añadir al portaobjetos, antes de la colocación del cubreobjetos una gota de lugol al 20% (diluido 1/5 en suero salino).
- Una vez terminado el estudio, introducir el material utilizado (tubos, portaobjetos....) en el recipiente acondicionado para desechar el material infeccioso.





5. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE TAENIA

Las dos especies de *Taenia* que infectan al ser humano son ***Taenia saginata* o tenia de la vaca** y ***Taenia solium* o tenia del cerdo**. La diferenciación entre ambas resulta de vital importancia ya que la tenia del cerdo implica riesgo de cisticercosis y tiene un alto grado de contagio.

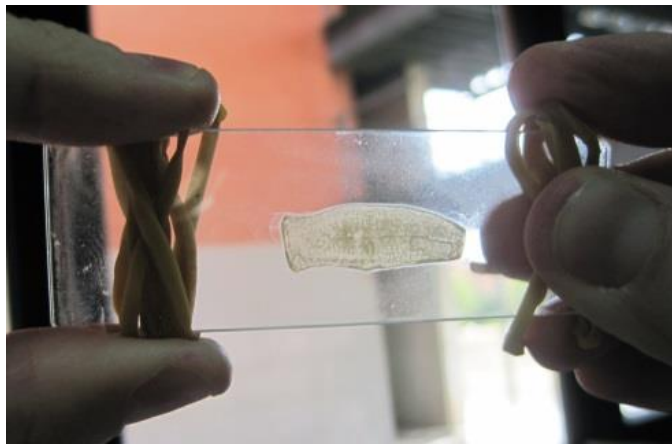
Los anillos de la *Taenia* (proglótides) pueden eliminarse junto con las heces del paciente o bien de manera espontánea a través del esfínter anal y pueden contener desde 30.000 hasta 100.000 huevos cada uno, dependiendo de la especie.

Los huevos de ambas especies son indistinguibles microscópicamente, pero los anillos sí son diferentes en cada una de ellas. Existen dos tipos de técnicas que permiten diferenciar ambas especies mediante la visualización del número de ramas uterinas que contienen el/los anillos desprendidos.

Los anillos deben manejarse con extremo cuidado y **SIEMPRE CON GUANTES**, para evitar infectarse.

A) Visualización “al trasluz” de anillos de *Taenia*

- Con ayuda de unas pinzas colocar el anillo o proglótide de la tenia sobre un portaobjetos. A continuación, aplastarlo entre dos portaobjetos, manteniendo éstos fuertemente unidos mediante gomas o cinta adhesiva colocada en los extremos y visualizarlo al trasluz.



- La tenia de la vaca posee un largo canal central con 15 a 30 ramificaciones uterinas laterales (imagen lateral), mientras que la tenia del cerdo posee únicamente de 5 a 10 ramificaciones uterinas laterales que se subdividen en gruesas digitaciones dendríticas.

B) Método de Tinta China

Material necesario

- Aguja y jeringa de insulina o de tuberculina.
- Tinta china.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.
- Portaobjetos.
- Guantes.



1. Con ayuda de unas pinzas colocar la muestra de anillo de *Taenia* en un recipiente limpio con agua destilada para su relajación y limpieza durante unas horas. Alternativamente pueden emplearse anillos fijados en formalina caliente al 10% en solución salina.
2. Colocar el anillo sobre papel secante o absorbente y secarla cuidadosamente por ambos lados.
3. Localizar el poro genital del anillo (hueco por el que la *Taenia* expulsa los huevos) e inyectar la tinta china con una jeringa de insulina o de tuberculina.
4. Secar con un nuevo papel absorbente el exceso de tinta y **colocar la muestra entre dos portaobjetos limpios ejerciendo presión para que ésta quede apretada**. Mantener los dos portaobjetos fuertemente **unidos mediante gomas o cinta adhesiva** colocada en los extremos de los mismos.
5. Examinar al microscopio con objetivo 4x ó 10x.
6. La tenia de la vaca posee un largo canal central con 15 a 30 ramificaciones laterales (Imágenes 1 y 2), mientras que la del cerdo posee únicamente de 5 a 10 ramificaciones laterales que se subdividen en gruesas digitaciones dendríticas (Imagen 3).
7. Una vez terminado el proceso **se debe descartar todo material utilizado en un recipiente que contenga desinfectante, desinfectar la superficie de trabajo y, por último, lavarse bien las manos**.



Figura 4: Proglótide de *T. saginata* tras tinción con tinta china

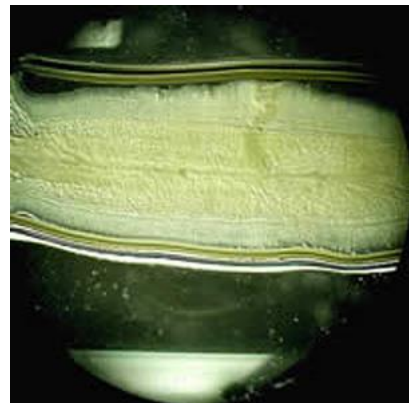


Figura 5: Proglótide de *T. saginata* sin tinción

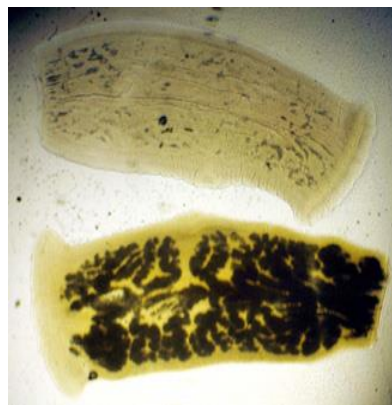


Figura 6: Proglótide de *T. solium* tras tinción con tinta china



FUENTES FIGURAS

- **Figura 1:** Test de Graham. En <http://www.clinicarotger.es/doc/atelab/doc07.htm>
- **Figura 2:** Tomada del CDC de Parásitos: <http://www.cdc.gov/dpdx/az.html>
- **Figura 3:** Modificada de: Métodos básicos de laboratorio en parasitología médica. OMS. 1992.
- **Figura 4:** Proglótide de *T. saginata* tras tinción con tinta china. Tomada de: <http://www.cdc.gov/dpdx/az.html>
- **Figura 5:** Proglótide de *T. saginata* sin tinción. Tomada de: <http://www.cdc.gov/dpdx/az.html>
- **Figura 6:** Proglótide de *T. solium* tras tinción con tinta china. Tomada de: <http://www.cdc.gov/dpdx/az.html>