

PRÁCTICA 7

DIAGNOSTICO COPROPARASITOSCOPICO (CPS)

B) CPS MEDIATO DIRECTO Y CPS POR CENTRIFUGACION-FLOTACION

L Galaviz Silva

Introducción

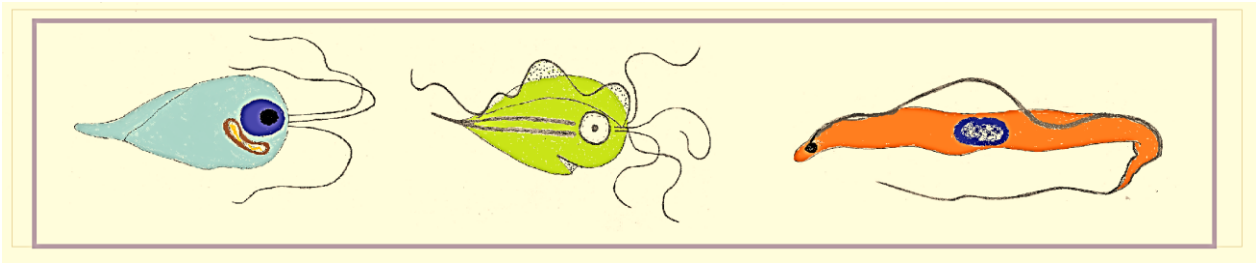
El CPS mediato directo es el empleado para examinar heces duras o pastosas. Este emplea lugol. Se denomina mediato porque se examinan horas después de ser evacuadas porque son tipos de heces que contienen huevos de helmintos o quistes de protozoarios. Al resultar negativas, pero con sospechas clínicas que indican la presencia de parásitos, se procede a realizar la técnica de concentración de parásitos por centrifugación.

La técnica de concentración y flotación en sulfato de zinc, aprovecha la densidad menor de los huevos y quistes llevándolos a la región superior del tubo de centrifuga, donde se colectan con un cubreobjetos o pipeta Pasteur. La desventaja es que no es efectiva en el caso de huevos operculados o

de esquistosomas. La una densidad del sulfato de zinc se ajusta a 1.18 con heces frescas (sin formol) o 1.20 con heces conservadas en formaldehido o PVA.

Objetivo general

Desarrollar en el estudiante la habilidad de analizar microscópicamente muestras de heces para examen parasitológico, capacitándolo para realizar labores diagnósticas clínicas. Esta práctica complementa los conocimientos teóricos revisados en la Unidad B2 (Flagelados del aparato digestivo y urogenital), Unidad B3 (Protozoarios sarcodinos), B4 (puntos 2 al 5; Toxoplasmosis, Sarcocistosis, Criptosporidiasis); Unidades C y D (Tremátodos y Cestodos de importancia médica) y Unidad E (Nemátodos de importancia médica).



Objetivo particular:

Desarrollar en el estudiante la habilidad de ejecutar los protocolos recomendados en el diagnóstico parasitológico por el CPS mediato y la concentración de formas parásitas en muestras de heces fecales.

Material

El maestro proporcionará:

Lugol parasitológico.

Solución salina 0.85 %

Sulfato de zinc

Microscopios

Lugol parasitológico:

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

Disolver el ioduro de potasio en agua destilada, agregar lentamente el yodo y agitar para disolver los cristales. Filtrar y almacenar en frascos ámbar. Antes de usarlo disolver cinco veces en agua una alícuota, para preparar la solución de trabajo.

Sulfato de zinc:

a una densidad de 1.18, agregar a un litro de agua tibia 331g aproximadamente de sulfato de zinc y filtrar, determinar con un densímetro la densidad, esta debe ser de 1.18, si es inferior, añadir más sulfato de

zinc, si es superior agregar más agua). Si se trata de muestras fijadas con formalina se recomienda emplear una densidad de 1.20.

El alumno aportará el siguiente material:

Tubos cónicos para centrifuga, gradilla.

Aplicadores, portaobjetos, cubre objetos de 22 X 22 mm.

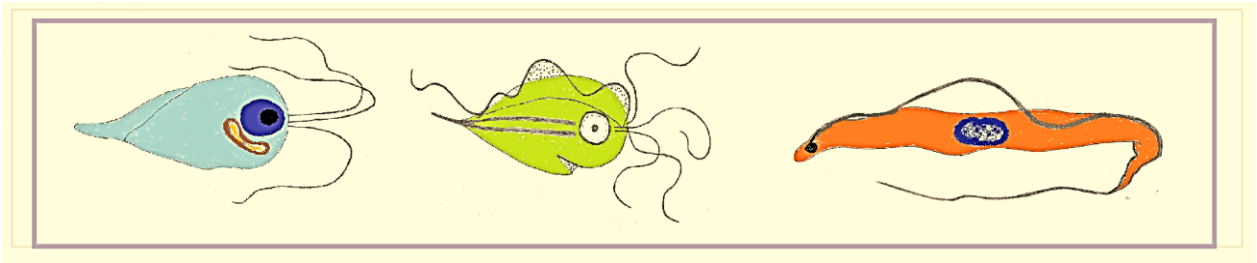
Muestras positivas de heces fecales, sin conservador o preservador.

El lugol no es un colorante, sino un contrastante para microscopía. Tiene afinidad para combinarse con los las estructuras que contienen glucógeno. Contrasta las formas quísticas y se recomienda emplearlo en preparaciones húmedas o examen en fresco de heces duras o pastosas. Si se utiliza en blandas o acuosas, los trofozoitos se inmovilizan y se destruyen.

A) Método del CPS mediato directo.

Para el CPS mediato, coloque una gota de lugol con el gotero (procure que la gota sea pequeña (aproximadamente 20 µL) para que no se flote la muestra.

Coloque una pequeña cantidad de muestra de heces y mezcle con el aplicador. Deposite el cubreobjetos. Examine en 10X, 40X y si es necesario en 100 X. En el objetivo de 10 X puede detectar fácilmente huevos de



nemátodos (*Ascaris lumbricoides*) céstodos (*Taenia, Hymenolepis*) o tremátodos.

Si observó escasos parásitos, la siguiente técnica le permitirá concentrarlos para analizar su morfología más detenidamente.

B) Método de flotación – centrifugación para concentración de quistes y huevos de parásitos.

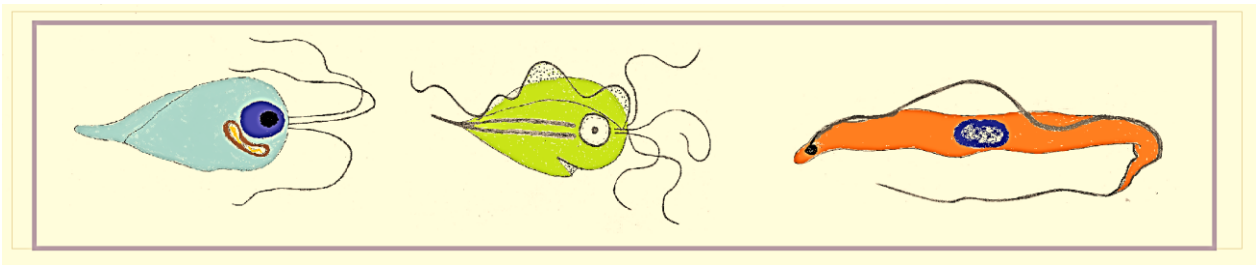
El material examinado y los sobrenadantes desechados se colocan en un recipiente que contiene formalina 10% para desinfectarlos.

1. Deposite la muestra de heces del tamaño de un fríjol (~ 0.3 g) en un tubo de 13 x 100 cónico, de plástico. Si tiene muchos detritos o partículas grandes, filtrar primero la muestra en gasa, antes de continuar. Si tiene mucho mucus no lo filtre, agregue formol al 5 ó 10 % antes de continuar.
2. Agregar solución salina 0.85 % casi hasta la boca del tubo y mezclar con aplicador. Centrifugar a 2000-2500 rpm por 2 min y descartar el sobrenadante. Repetir hasta que quede claro el sobrenadante (regularmente de 7 a 10 veces).
3. Agregar **primero**, sulfato de zinc hasta la mitad del tubo. Mezclar. **Segundo**, agregar más sulfato hasta 1 cm abajo de la boca del tubo.

4. Centrifugar 2000-2500 rpm por 2 min .
5. Al finalizar de centrifugar, **no deseche** el sulfato de zinc, **agregue más** sulfato con un gotero o pipeta Pasteur, hasta formar un menisco.
6. Llévelo hasta una gradilla sin movimientos bruscos. Coloque un cubreobjetos * en la parte superior del menisco, sin perturbarlo y espere 5-10 min. Mientras, prepare un portaobjetos con una gota de lugol.
7. Al terminar el tiempo, lleve el cubre, levantándolo verticalmente con cuidado, y colóquelo sobre la gota de lugol para examinarlo al microscopio.

(*) Si lo prefiere, tomar una alícuota de la parte superior del menisco, dentro de 10 min con una pipeta Pasteur o asa bacteriológica.

Debido a que los quistes de protozoarios y huevos de helmintos, poseen una densidad menor que el sulfato de zinc, estos ascenderán o flotarán hasta la superficie del menisco. Existen otras técnicas de flotación, así como de sedimentación, que aprovechan el mismo principio para separarlos de las heces y recuperarlos.



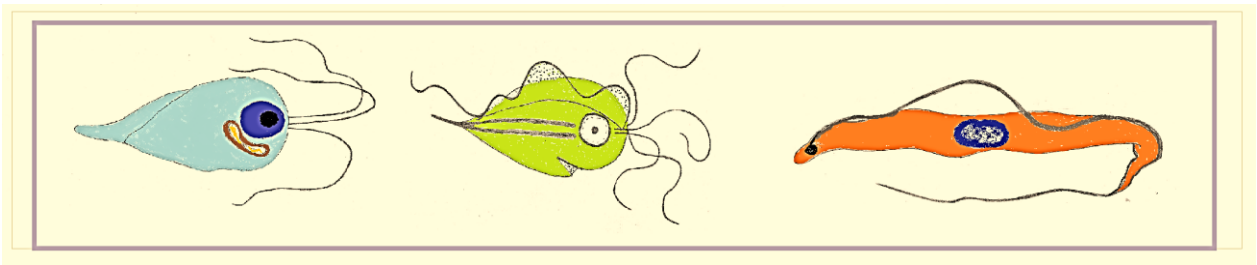
Resultados y discusiones

1.- Esquematice los protozoarios o helmintos observados con lugol y por centrifugación flotación en sulfato de zinc.

Literatura consultada (por el alumno)

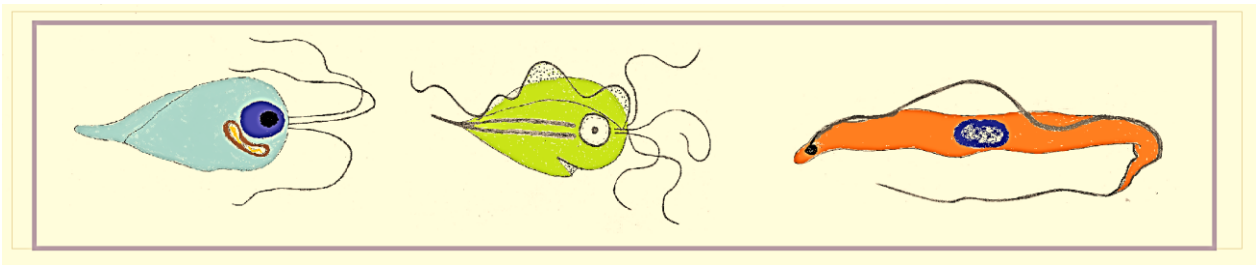
Investigue en la literatura el nombre de sus estructuras.

Nota.- No olvide anotar el aumento del microscopio en los esquemas.

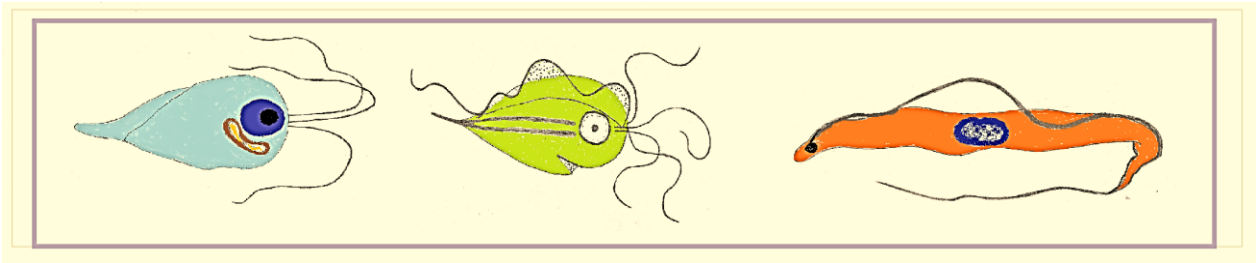


Bibliografía

- Araujo J, ME García, O Díaz-Suárez¹ y H Urdaneta. 2008. Amibiasis: Importancia de su diagnóstico y tratamiento. Mini-revisión. Invest Clín. 49: 265-271.
- Ash LR & Orighel, TC. 1997. Atlas of Human Parasitology. 4° ed. American Society of Clinical Pathologists. ASCP Press, Chicago. 410 pp.
- Ávila-Rodríguez EH, A Ávila-Rodríguez, JM Araujo-Contreras, A Villarreal-Martínez & T. Douglas T. 2007. Factores asociados a parasitosis intestinal en niños de la consulta ambulatoria de un hospital asistencial. Rev Mex Pediatr. 74 : 5-8
- Beaver, PC, Jung, RC & EW Cupp. 2003. Parasitología Clínica. 2003. 3° ed. Masson Doyma México, S.A. México, DF. 823 pp.
- Becerril MA. 2008. Parasitología Médica. 2ª. Ed. Mc Graw Hill/Interamericana Editores, SA de CV. México. 308 pp.
- Botero D. & M. Restrepo. 2005. Parasitosis humanas. 4° ed. Quebecor Word, Bogota, Colombia. CIB. 235-237 pp.
- Brito T. 2006. Diagnóstico laboratorial da *Giardia lamblia*. Saúde & Ambiente em Revista, Duque de Caxias. 1: 18-25.
- Brooke MM & Melvin DM. 1984. Morphology, of Diagnostic Stages of Intestinal Parasites of Humans. Center for Disease Control, Atlanta, GA. HHS Publication CDC N° 84-8116. 30 pp.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Stool Specimens. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/index.htm> Ultimo Acceso Abril 12, 2010.
- Cox, FEG. 2004. Modern Parasitology. 2a Edición. Blackwell Science Ltd. USA. 276 pp.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness. 2007. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev.;20:511-32.
- Garcia, LS. 2001. Diagnostic Medical Parasitology. 4° ed. American Society for Microbiology. ASM Press. Washington, DC. Pp. 329-362.
- Herrera GM, NCChávez-Tapia, C. Lizardi. 2003. Absceso hepático amibiano. Med Sur. 10:35-37.
- Khan NA. 2009. Acanthamoeba: Biology and Pathogenesis. Horizon Scientific Press, 1 220 pp.
- Melvin DM, Brooke MM. 1982. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd Edition. US Dept. of Health and Human Services publication no. (CDC) 82-8282. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention.
- Pajuelo CG, RD Luján, PB Paredes & CR Tello. 2006. Aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el



- diagnóstico de parásitos intestinales. Rev Mex Patol Clin. 53: 114-118.
- Rodríguez Pérez E. 2004. Atlas de Parasitología Médica. Mc Graw Hill. México. 57 pp.
- Schuster FL, GS Visvesvara. 2004. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. Veterinary Parasitology. 126: 91-120.
- Tanyuksel M & W Petri, Jr. 2003. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. Clin Microbio Rev, 16: 713-729.
- Tato Saldivar P & García Yáñez, Y. 2010. Prácticas de Laboratorio. Programa académico de la asignatura de Microbiología y Parasitología. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Trujillo Contreras F, A Villanueva & M Raygoza. 2001. Manual Práctico Ilustrado. Enfermedades Parasitarias. Ediciones Cuellas, Jalisco, México. 165 pp.
- Valadez A, C- Ximenez. 2005. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: prevalence infection in a rural mexican community. Exp Parasitol. 110:327-30.
- Uribarren Berrueta, T. 2010. Recursos en Parasitología. NAEGLERIOSIS, ACANTHAMOEBOISIS, BALAMUTHIOSIS. Facultad de Medicina, Depto. de Microbiología y Parasitología, UNAM. http://www.facmed.unam.mx/marco/index.php?dir_ver=87. Ultimo acceso Abril 12, 2010.



PRÁCTICA 8

TÉCNICAS DE TINCIÓN PARA EXAMEN DE HECES FECALES

Z J Molina Garza

Introducción

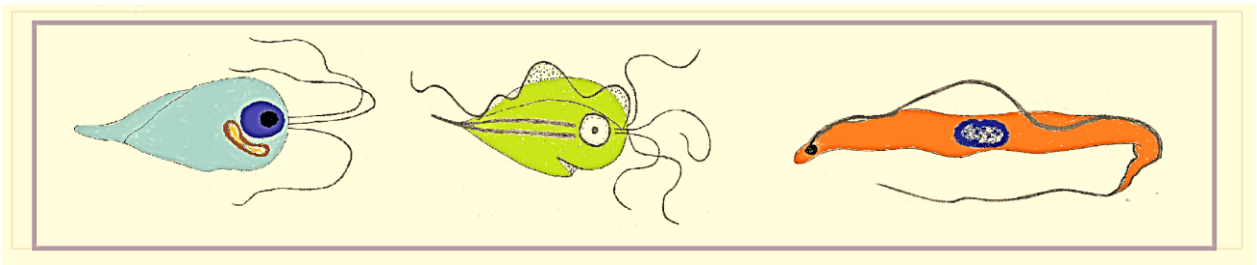
Las técnicas de tinción permiten obtener preparaciones permanentes de los parásitos intestinales para su posterior examen microscópico, con lo cual se pueden evidenciar formas parásitas enmascaradas facilitando su identificación. La hematoxilina, por ser un colorante acidófilo, tiene una mayor afinidad hacia los núcleos. Por ello, antiguamente se denominaron erróneamente algunas estructuras como “cuerpos cromatoidales” asociándose con las estructuras nucleares. El colorante tricrómico, en cambio, tiñe en varias tonalidades entre el verde y el púrpura, pero con mayor intensidad en los núcleos y menor en el citoplasma.

Los buenos frotis para tinción se logran 1) al utilizar muestras recientes y sin conservadores, 2) realizar frotis extendidos delgados, 3) no permitir que se sequen los frotis durante el proceso de tinción, 4) realizar una buena fijación, 5) usar

mordiente recientemente preparado, de buena calidad en el caso de hematoxilina férrica (certificado), 6) usar solución colorante “madura”, 7) permitir una buena deshidratación y transparentación y 8) examinar la serie de alcoholes para garantizar que estén a pH neutro o ligeramente alcalinos, pues las soluciones de pH ácido decoloran los frotis, y en el montaje con resina sintética esta debe estar a pH neutro para garantizar una duración permanente.

Objetivo general

El objetivo de esta práctica es proporcionar al alumno los conocimientos sobre las técnicas de tinción para obtener laminillas permanentes de protozoarios intestinales, debido a que estas sirven como un registro permanente de los hallazgos y observaciones hechos por el investigador o en la región de estudio y es la **única** manera de comprobar a la comunidad científica la veracidad de su investigación. Esta práctica es complemento importante de la teoría



correspondiente a las Unidades B2 y B3 sobre protozoarios intestinales y las unidades C, D y E sobre helmintos de importancia clínica.

Objetivos particulares

1. Capacitar al alumno en las técnicas de tinción con hematoxilina férrica y tricrómica de Gomori para protozoarios intestinales.
2. Informar al estudiante sobre los pormenores de las técnicas, los cuales son parte de la experiencia de los maestros del laboratorio y que no aparecen en la literatura, de los cuales depende el éxito de la técnica.

Material

El laboratorio proporcionará el siguiente material:

- Jarras cubetas de tinción con canastilla
- Canastillas de plástico, para sumergir las laminillas en Schaudinn.
- Canastillas metálicas, para sumergir las laminillas en el resto de las soluciones, especialmente en el xilol.
- Fijador de Schaudinn
 - Colorante Tricrómico
 - Colorante de hematoxilina férrica.
 - Mordientes.
- Etanol al 70, 80, 90 y 100 %.
- Agua destilada.
- Pizetas.
- Xilol

Resina
Carboxilol.

El estudiante proporcionará:

1. Porta y cubreobjetos libres de grasa
2. Aplicadores de madera
3. Muestras positivas a de protozoos o helmintos certificadas por el responsable de la práctica mediante preparaciones temporales.

El estudiante colaborará en la preparación de los reactivos

Fijador de Schaudinn:

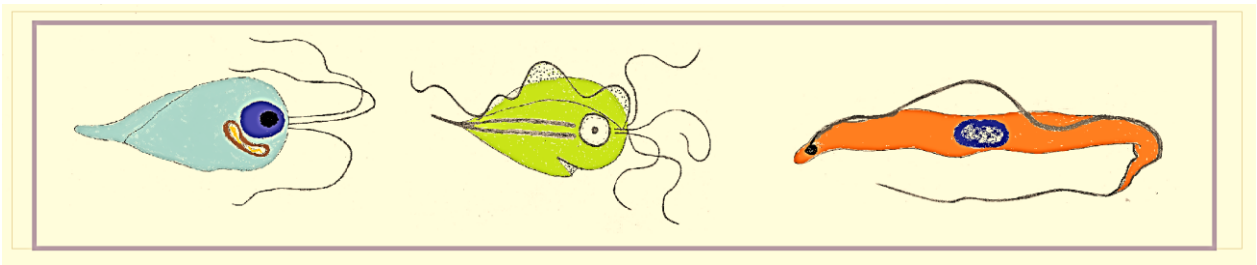
1) Preparar una solución acusa saturada de bicloruro de mercurio:

Bicloruro de mercurio
110 g
Agua destilada
1000 ml

Caliente la solución para permitir que se disuelva (evite aspirar los vapores por ser neurotóxico) cubriéndolo con un vidrio de reloj. No use agitadores o material metálico. Permitir que se enfríe. La solución saturada permitirá la sedimentación de los cristales en el fondo.

2) Preparación del fijador:

Solución saturada de bicloruro de mercurio	600 ml
Alcohol etílico 95 %	300 ml



Inmediatamente antes de usarlo, agregar 5 ml de ácido acético glacial por cada 95 ml de fijador.

Solución madre de alcohol iodado D'Antoni :

Disolver 1 g de yoduro de potasio (KI) y 1.5 g de cristales de yodo en 100 ml de agua destilada. Quedará un exceso de cristales en el fondo del envase. Filtrar la solución madre en un envase ámbar de vidrio. Esta solución tiene una caducidad promedio de un año. Cuando desaparece el exceso de cristales deberá prepararse una nueva. La solución madre se divide en varios goteros ámbar. Este se puede usar sin diluir, en lugar del lugol ó para preparar la solución de alcohol iodado.

Alcohol iodado:

Agregue varias gotas de la solución madre D'Antoni al etanol 70 % de la canastilla hasta que adquiera un color marrón como el té. Esta se prepara al momento de teñir.

Otros reactivos para la tinción con Hematoxilina férrica:

Mordiente (para la técnica de tinción con hematoxilina): Antes de iniciar la técnica, preparar una solución de sulfato férrico amoniacal al 4% en agua destilada, agitar y eliminar los cristales y partículas no disueltas.

Alumbre férrico (sulfato férrico amoniacal):

Sulfato férrico amoniacal	0.25 g
Agua destilada	100 ml.

Hematoxilina (solución madre del colorante):

Hematoxilina en cristales	10g
Etanol 95%	100ml

La calidad del colorante se mejora si se prepara la solución madre varias semanas (6) antes y se almacena en un frasco tapado con torunda de algodón para que madure. Agite eventualmente durante el proceso de maduración. Almacene en envase de vidrio bien cerrado a 4 °C o en un lugar fresco. La caducidad de este es de un año o mas.

Solución de trabajo de hematoxilina:

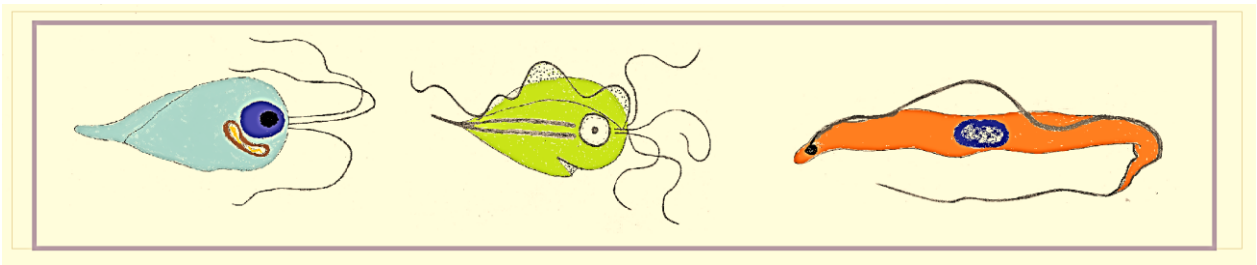
Esta se prepara antes del proceso de tinción con 5ml de la solución madre en 100 ml de agua destilada.

Alcohol etílico:

Preparar diluciones al 50%, 70%, 95% y 100% (dos cambios del último). Verificar el pH. Este debe ser neutro o ligeramente alcalino (7-7.4), de lo contrario, el tono de la tinción se perderá con la acidez.

Carboxilol:

Preparar con un volumen de xileno o tolueno y un volumen de alcohol etílico absoluto.



Resina sintética neutra: Diluir los cristales en xileno o tolueno con agitación constante. También se puede conseguir preparada en el comercio.

Colorante tricómico de Gomori (Ash & Orihel, 1997):

Cromotrofo 2R	6 g
Verde claro SF	3 g.
Verde rápido FCF	3 g
Ácido fosfotúngstico	7 g
Ácido acético glacial	10 ml
Agua destilada	1000 ml

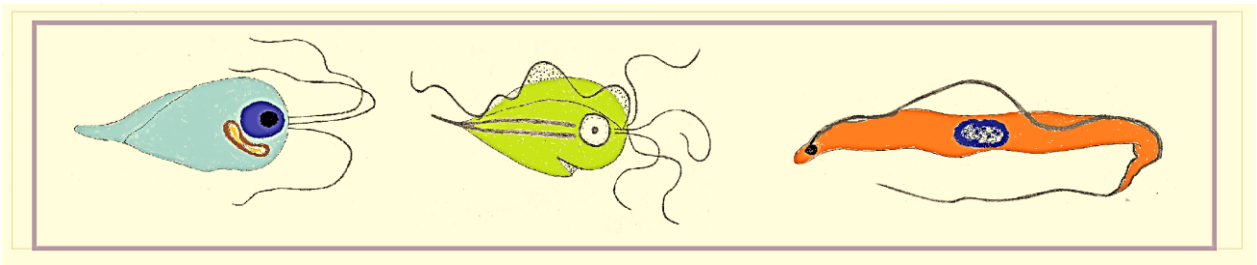
Mezclar los colorantes y ácido fosfotúngstico con el ácido acético glacial en un mortero, macerarlos y mezclarlos, dejar reposar 30 min. Agregar el agua destilada y agitar la solución. Se usa sin diluir. Este debe quedar de color púrpura oscuro.

A) Método de tinción con hematoxilina férrica (Adaptada de Ash & Orihel, 1997):

- 1.- Depositar la muestra (positiva y con buena densidad de parásitos) con un aplicador, cerca de un extremo el portaobjetos y extender para lograr un frotis transparente. El grosor adecuado es el que permite leer un periódico a través de él. No se debe dejar secar en ningún momento.
- 2.- Fijar en Schaudinn 5 min a 50°C o 15 min a temperatura ambiente. *No se deben*

emplear canastillas u otros instrumentos de metal. Estos se deben sustituir por artículos de plástico para evitar la precipitación del mercurio que tiene el fijador. Si este precipita, el fijador ya no servirá porque el mercurio es el agente fijador. Maneje la solución con cuidado y evitar el contacto con la piel, porque es altamente tóxico.

- 3.- Transferir en alcohol iodado por 5 min. Si la solución se ha decolorado, repetir este paso agregando más solución madre. El alcohol iodado permite eliminar todos los restos del fijador de los frotis. Si quedan restos, no se teñirá.
- 4.- Sumergir en etanol al 50% por 3 min para eliminar el iodo.
- 5.- Lavar en agua de la llave por 3 min.
- 6.- Sumergir en mordiente (sulfato férrico amoniacal 4 %) por 5 min a temperatura ambiente.
- 7.- Lavar veces en agua de la llave 1 min.
- 8.- Transferir a la solución de trabajo de hematoxilina por 10 min a temperatura ambiente. El tiempo de tinción también puede variar dependiendo del grado de "madurez" del colorante. Si al reutilizarlo, se observan grumos en la solución colorante o, si este presenta un color pardo negruzco, se debe de desechar y cambiar por nuevo. Este cambio en el color y turbidez en el colorante se debe a que ya reaccionó con residuos de mordiente que pueden



quedar en las laminillas si no se lavaron bien y se inactiva.

- 10.- Lavar en agua de la llave por 1 min.
- 11.- Aclarar en sulfato férrico amoniacal 0.25% (o ácido fosfotúngstico al 2%) por 2 a 5 min. Este es el paso crítico de la técnica porque el tiempo es muy variable. Se aconseja examinar el frotis húmedo (unas gotas de agua con pipeta de vez en cuando para que no se seque) al microscopio para obtener el óptimo de tinción y contraste.
- 12.- Lavar en agua de la llave por 10 min.
- 13.- Agregar unas gotas de carbonato de litio saturado (en agua) al etanol 70%. Sumergir los frotis en esta por 3 min.
- 14.- Enjuagar en etanol 80 % por 3 min.
15. Transferir a etanol 95% por 3min. Después, sumergir en dos cambios de etanol absoluto por 5 min en cada uno.
- 1+.- Transferir a carboxilol por 3-5min.
- 16.- Transferir a dos cambios de xilol o sustituto de xilol por 5 min en cada uno.
- 17.- Montar en resina sintética, procurando aplastar bien el cubre con una goma para que queden lo más cercanos el porta y el cubre y lograr observarlos en el objetivo de inmersión.

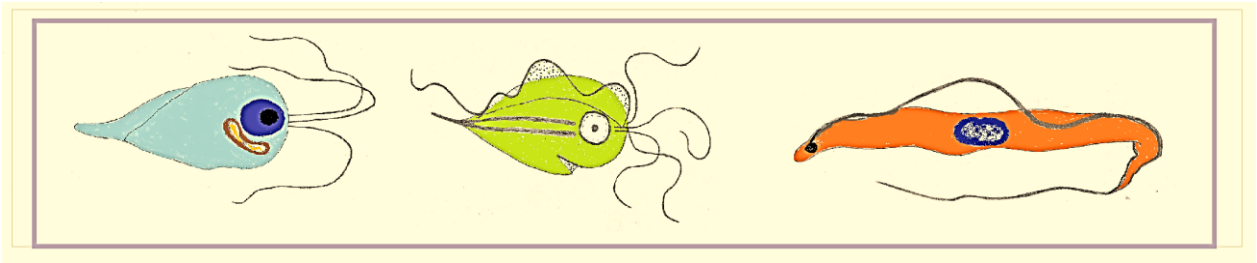
Para muestras fijadas en PVA-Schaudinn, se depositan dos gotas en el centro del portaobjetos y se extienden en aproximadamente 2.5 cm² con un aplicador.

Dejar secar toda la noche de preferencia en una estufa a 30°C. El frotis seco se tiñe inmediatamente o puede conservarse en etanol 70%. También se pueden transferir 4 ml de muestra en PVA a un tubo y centrifugar a 2500 rpm. Durante 5 min. Decantar el PVA y limpiar las paredes del tubo con un hisopo, después se transfiere parte del sedimento a un trozo de papel para absorber el exceso de humedad. Finalmente se prepara el frotis en un portaobjetos.

Resultados esperados: Los protozoarios y quistes se teñirán de un color azul oscuro, con las estructuras nucleares, cuerpos cromatoidales y otras inclusiones citoplásmicas más negras que el resto del citoplasma. Los cristales de Charcot-Leyden, eritrocitos y bacterias se teñirán de azul grisáceo.

B) Tinción con tricrómica de Gomori

Esta brinda buenos resultados para propósitos de rutina, no es necesario la sobre tinción y diferenciación para conseguir los detalles morfológicos ni el uso de mordientes. El colorante tricrómico es estable y puede usarse repetidamente, si se pierde la calidad de la tinción el colorante puede restablecerse dejándolo destapado por 3-8 hrs. o toda la noche. Para heces fijadas en PVA se omite la fijación en



Shaudinn y se prolongan los tiempos, según se señala entre paréntesis.

Método

Sumergir en el fijador Schaudinn 5min a 50°C o una hora a temperatura ambiente. Seguir las mismas recomendaciones dadas anteriormente.

Transferir a etanol 70% iodado 1 min. (10 min.)

Etanol 70% I 1min. (3-5 min)

Etanol 70% II 1min. (3-5 min)

Colorante tricromico 2-8 min. (6-8 min.)

Etanol 90% acidificado (1 gota de ácido acético glacial en 10 ml de alcohol etílico) 10-20seg.

Etanol 95% o 100%. Enjuague en esta solución para detener el aclaramiento (5min).

Etanol 100 % 1min (5 min)

Carboxilol 1min (5-10 min)

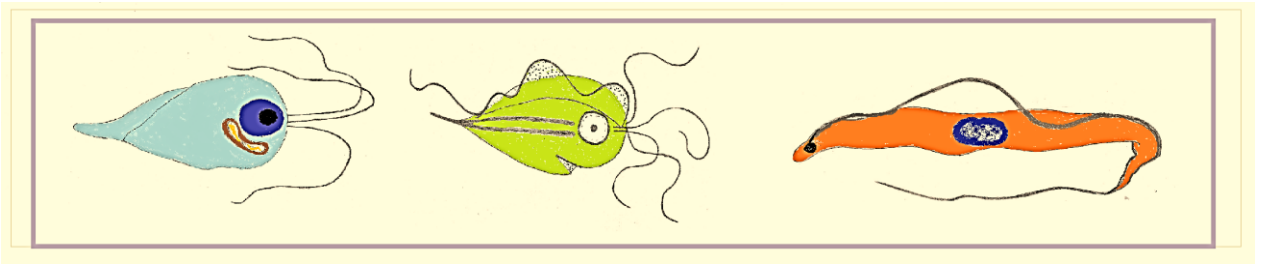
Xilol 1min. o hasta que desaparezca la refracción en la interfase del frotis- xilol (10 min). Montar en resina sintética neutra.

Resultados y discusiones

1.- Esquematice las formas observadas con ambas técnicas, enfatizando sobre las estructuras diferenciadas al microscopio en objetivo de inmersión.

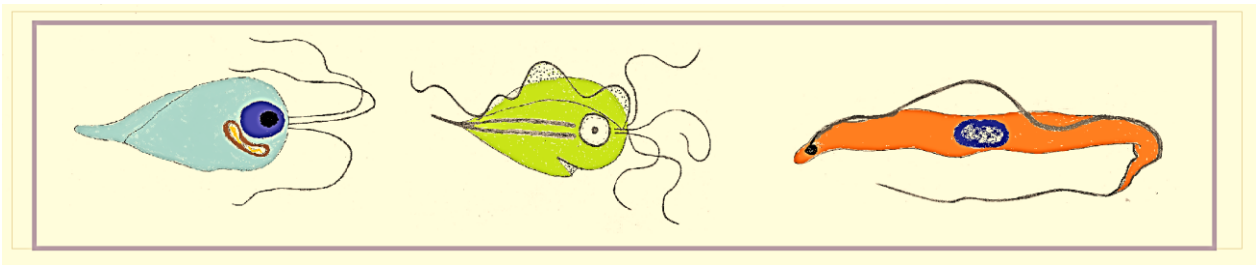
A) Protozoarios

B) Helmintos



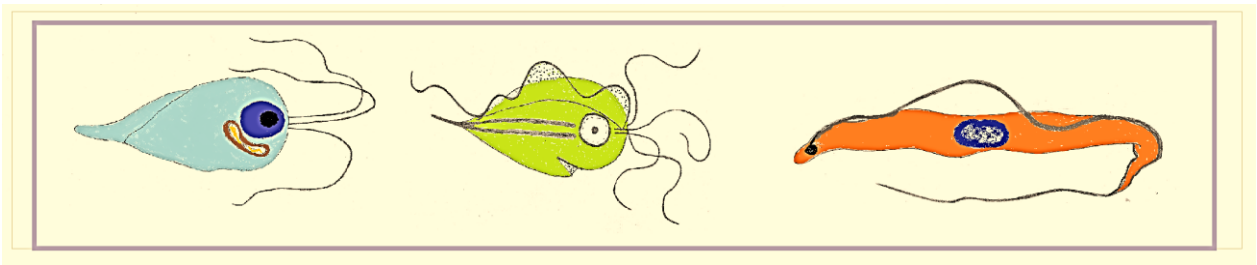
2.- Concluya las diferencias observadas entre ambas tinciones

Literatura consultada (por el alumno)



Bibliografía

- Araujo J, ME García, O Díaz-Suárez¹ y H Urdaneta. 2008. Amibiasis: Importancia de su diagnóstico y tratamiento. Mini-revisión. Invest Clín. 49: 265-271.
- Ash, L. R. y Oriol, T. C. 1987. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. ASCP Press, Chicago.
- Ash LR & Orighel, TC. 1997. Atlas of Human Parasitology. 4° ed. American Society of Clinical Pathologists. ASCP Press, Chicago. 410 pp.
- Beaver, PC, Jung, RC & EW Cupp. 2003. Parasitología Clínica. 2003. 3° ed. Masson Doyma México, S.A. México, DF. 823 pp.
- Becerril MA. 2008. Parasitología Médica. 2ª. Ed. Mc Graw Hill/Interamericana Editores, SA de CV. México. 308 pp.
- Botero D. & M. Restrepo. 2005. Parasitosis humanas. 4° ed. Quebecor Word, Bogota, Colombia. CIB. 235-237 pp.
- Brito T. 2006. Diagnóstico laboratorial da *Giardia lamblia*. Saúde & Ambiente em Revista, Duque de Caxias. 1: 18-25.
- Brooke MM & Melvin DM. 1984. Morphology, of Diagnostic Stages of Intestinal Parasites of Humans. Center for Disease Control, Atlanta, GA. HHS Publication CDC N° 84-8116. 30 pp.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Stool Specimens. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/index.htm> Ultimo Acceso Abril 12, 2010.
- Cox, FEG. 2004. Modern Parasitology. 2a Edición. Blackwell Science Ltd. USA. 276 pp.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness. 2007. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev.;20:511-32.
- García, LS. 2001. Diagnostic Medical Parasitology. 4° ed. American Society for Microbiology. ASM Press. Washington, DC. Pp. 329-362.
- García Más I, B Muñoz Araújo, A Aguirre Inchaurre, I Polo Roldán. Ana García Moreno, P Refoyo Román. 2008. Manual de laboratorio de Parasitología 4. Amebas parásitas y/o comensales Reduca (Biología). Serie Parasitología. 1 (1): 28-37.
- García Más I, B Muñoz Araújo, A Aguirre Inchaurre, I Polo Roldán. Ana García Moreno, P Refoyo Román. 2008. Manual de laboratorio de Parasitología. 3. Flagelados intestinales y urogenitales. Reduca (Biología). Serie Parasitología. 1 (1): 20-27.
- Museo virtual de Parasitología. Facultad de Cc. Biológicas. UCM. Madrid, España. <http://www.ucm.es/centros/webs/fbio/index.php?tp=Museo%20Virtual%20de%2>



[OParasitología&a=servicios&d=16028.ph
p](http://www.facmed.unam.mx/marco/index.php?dir_ver=87)

Melvin DM, Brooke MM. 1982. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd Edition. US Dept. of Health and Human Services publication no. (CDC) 82-8282. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention.

Pajuelo CG, RD Luján, PB Paredes & CR Tello. 2006. Aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el diagnóstico de parásitos intestinales. Rev Mex Patol Clin. 53: 114-118.

Rodríguez Pérez E. 2004. Atlas de Parasitología Médica. Mc Graw Hill. México. 57 pp.

Tanyuksel M & W Petri, Jr. 2003. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. Clin Microbio Rev, 16: 713-729.

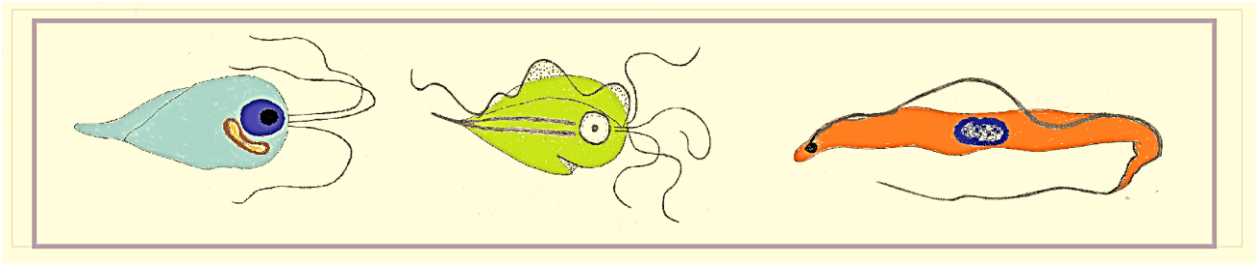
Tato Saldivar P & García Yáñez, Y. 2010. Prácticas de Laboratorio. Programa académico de la asignatura de

Microbiología y Parasitología. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Trujillo Contreras F, A Villanueva & M Raygoza. 2001. Manual Práctico Ilustrado. Enfermedades Parasitarias. Ediciones Cuellas, Jalisco, México. 165 pp.

Valadez A, C- Ximenez. 2005. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: prevalence infection in a rural mexican community. Exp Parasitol. 110:327-30.

Uribarren Berrueta, T. 2010. Recursos en Parasitología. NAEGLERIOSIS, ACANTHAMOEBOISIS, BALAMUTHIOSIS. Facultad de Medicina, Depto. de Microbiología y Parasitología, UNAM. http://www.facmed.unam.mx/marco/index.php?dir_ver=87. Ultimo acceso Abril 12, 2010.



PRÁCTICA 9

OBSERVACIÓN DE HEMATOZOARIOS

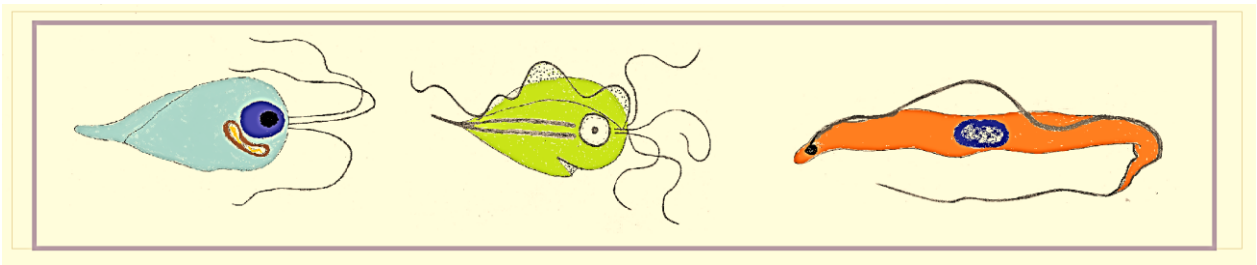
L Galaviz Silva

Introducción

Los hematozoarios (Apicomplexa o Sporozoa, Hematozoa) son organismos formadores de esporas, con alternancia de generaciones con una fase sexual (microgametos – microgametos = cigoto - oocineto móvil - oocistos en un hospedero invertebrado (mosquitos) y otra asexual (formación de esporozoitos en un hospedero vertebrado); además afectan órganos como el bazo, hígado, cerebro y otros tejidos en los cuales se inicia la fase exoeritrocítica y parasitan después células sanguíneas, donde llevan a cabo la fase eritrocítica, con producción de pigmento. La malaria es una enfermedad causada por cuatro especies de plasmodios que infectan a los seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. El hombre actúa como huésped intermediario reservorio y en el *Plasmodium* realiza dos ciclos esquizogónicos: el exoeritrocítico y el eritrocítico. El ciclo sexuado se inicia en el

hombre pero se realiza en el mosquito del género *Anopheles* los cuales siendo huéspedes definitivos actúan como transmisores. Solo la hembra es hematófaga y por lo tanto sólo ella es la transmisora. Otra vía de adquirir el paludismo es a través de la transfusión sanguínea.

En 1897 hace más de 100 años, Sir Ronald Ross encontró que el mosquito *Anopheles* era el enemigo a vencer y pensó que la erradicación del paludismo sería asunto de pocos años, sin embargo a poco más de siglo después, el impacto de la infección sigue en aumento. Se estima que existen zonas de riesgo de transmisión de paludismo en más de 107 países y aproximadamente 3.3 millones de personas en zonas de riesgo de transmisión; asimismo, se consideran entre 350 y 500 millones de episodios de paludismo clínico/año, la mayoría causados por infección con *P. falciparum* y *P. vivax*. *P. falciparum* causa más de un millón de



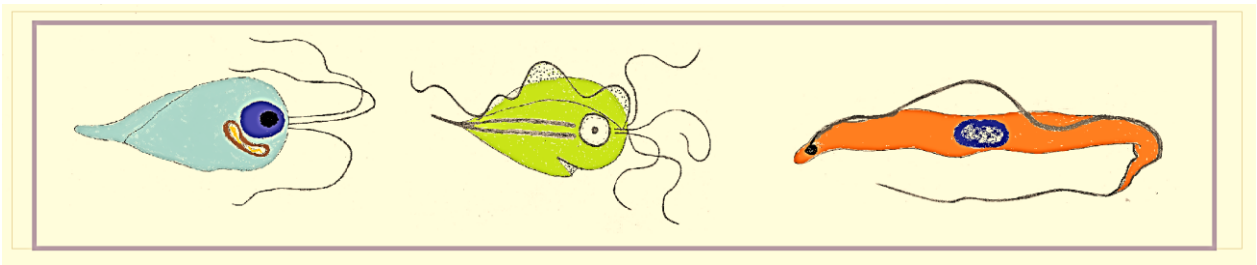
defunciones anuales principalmente de niños y bebés, por si solo o asociado a otras enfermedades como VIH/SIDA ocasionando altos índices de morbi-mortalidad en zonas endémicas como el África subsahariana, donde se reporta hasta el 60% de todos los casos de paludismo del mundo, un 75% de los casos por *P. falciparum* y casi el 90% de las defunciones por paludismo. Si bien 9 de cada 10 casos de muerte ocurren en países africanos, América Latina tiene una cuota importante de infecciones palúdicas. En Latinoamérica, el paludismo persiste como un importante problema de salud pública, con unos 870 000 casos reportados en 2004 (PAHO, 2005). Es endémico en 9 países que comparten la selva amazónica, y en 7 países de América Central y el Caribe y México. En varias zonas de Centro y Sudamérica se han reportado farmacorresistencias. Los vectores prevalentes son *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopunctipennis*. Las tasas de morbilidad de la malaria en México han seguido un patrón cíclico, con períodos de control alternados con períodos de reactivación y brotes epidémicos. La mayor parte de los casos reportados son causados por *Plasmodium vivax* y una minoría corresponde a *P. falciparum*.

México reportó logros mediante un programa de “tratamiento focalizado”, que consiste en un tratamiento más eficaz y rociamento de acción residual racional en

determinadas zonas, lo que ha logrado interrumpir la transmisión en gran parte del país, aunque existen focos de transmisión persistentes en el noreste del país, Nayarit, Michoacán, Oaxaca y en la frontera sur (<http://www.facmed.unam.mx/marco/index.php?dir ver=87>).

Ciclo de vida: El mosquito (hembra) inocula esporozoitos durante la alimentación; invade los hepatocitos en hígado y después células rojas sanguíneas en los ciclos eritrocíticos, la ruptura de los esquizontes, causan fiebres periódicas características. Las etapas sexuales son desarrolladas en el mosquito; culmina con la formación del ooquiste en pared del intestino; La esporogonia y liberación de los esporozoitos que invaden glándulas salivales, están listos para infectar en la alimentación siguiente de sangre.

El método de diagnóstico tradicional se basa en el examen de frotis sanguíneos extendidos y de gota gruesa, teñidos con Giemsa, diferenciando los esquizontes con sus merozoitos, micro y macrogametos, así como los trofozoitos invadiendo los eritrocitos. Actualmente existen también técnicas moleculares basada en la amplificación especie específica del ADN del parásito y técnicas de inmunocromatografía que se basan en antígenos recombinantes del parásito permitiendo además el



diagnóstico a nivel de especie en escasos minutos, lo cual los convierte en una herramienta ideal para realizar el diagnóstico en zonas rurales alejadas de los laboratorios de diagnóstico, permitiendo brindar un tratamiento inmediato a los pacientes. Para mayor información, se citan ejemplos en la bibliografía.

Objetivo general

El alumno diferenciará los principales caracteres morfológicos de cada una de las especies de *Plasmodium*, agente etiológico de la malaria o paludismo. El material de esta práctica es complementario a la información proporcionada al estudiante en la Unidad B4 (Protozoarios apicomplexos de sangre, tejidos e intestino) del curso de Parasitología Clínica.

Objetivo particular

1. El estudiante diferenciará la morfología particular de cada

especie y estadio de desarrollo al microscopio.

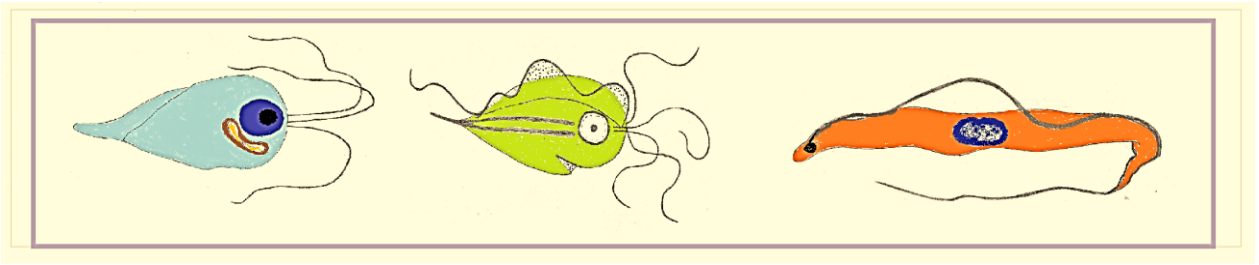
Material

El maestro proporcionará microscopio, aceite de inmersión y preparaciones permanentes de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*.

El alumno aportará cuaderno de dibujo, colores, lápiz y un trozo de tela de algodón para la limpieza del microscopio.

Método

- 1) El alumno revisará cada una de las laminillas en 40X y 100X, realizando dibujos representativos de las formas parásitas. Comparará las formas observadas con el que se muestra en la literatura para indicar el estadio de desarrollo y estructuras morfológicas.



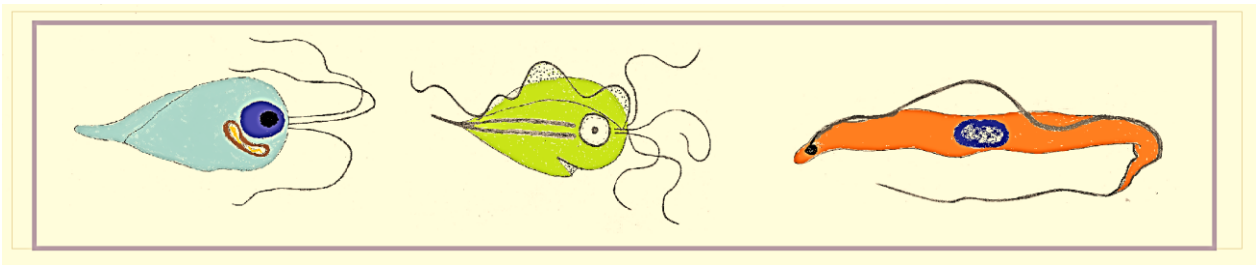
Resultados y discusiones

1.- Esquematice lo observado en las preparaciones permanentes siguientes:

Plasmodium vivax

Trofozoít

Esquizonte



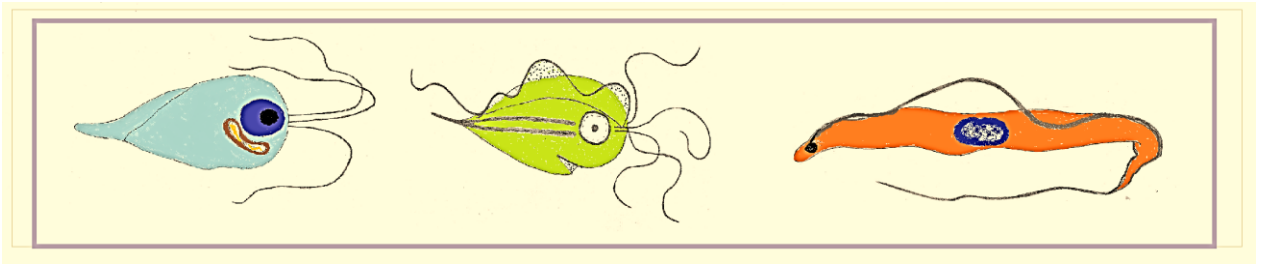
Microgametocito

Macrogametocito

Plasmodium malarie

Trofozoito

Esquizonte



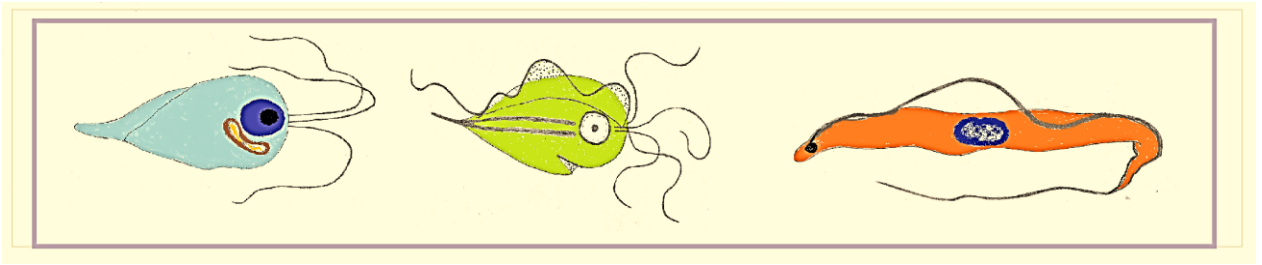
Microgametocito

Macrogametocito

Plasmodium falciparum

Trofozoito

Esquizonte



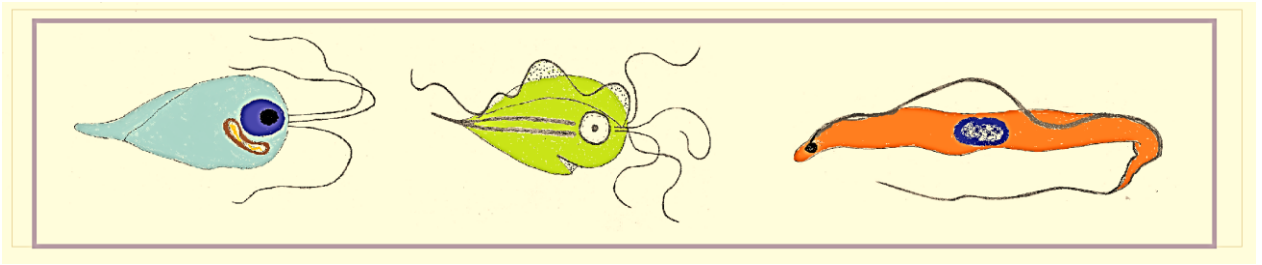
Microgametocito

Macrogametocito

Trofozoito

Plasmodium ovale

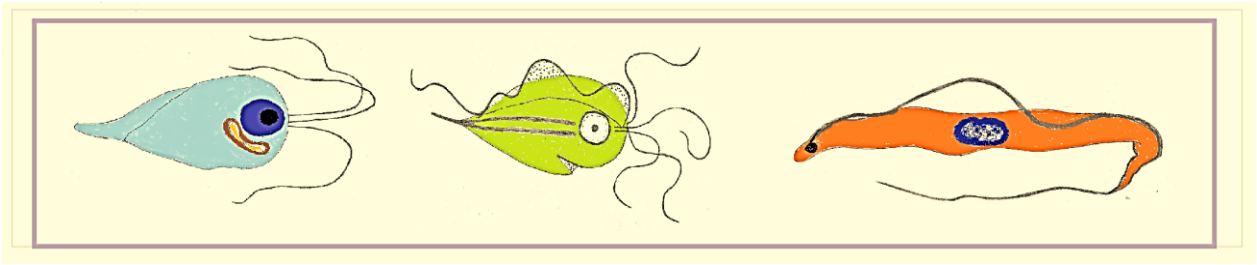
Esquizonte



Macrogametocito

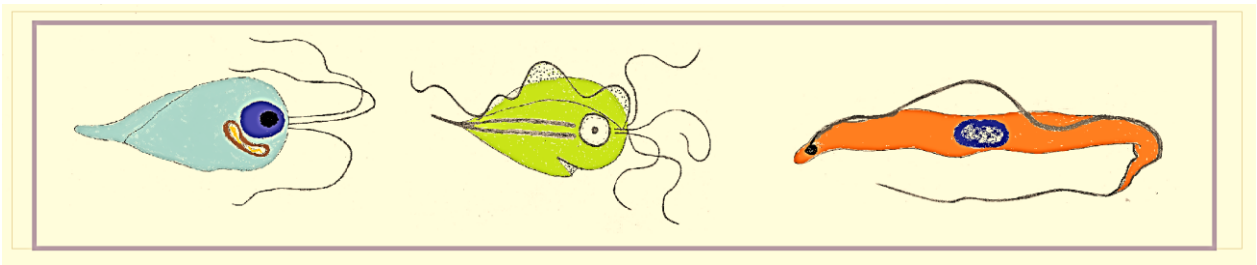
Microgametocito

Literatura consultada (por el alumno)

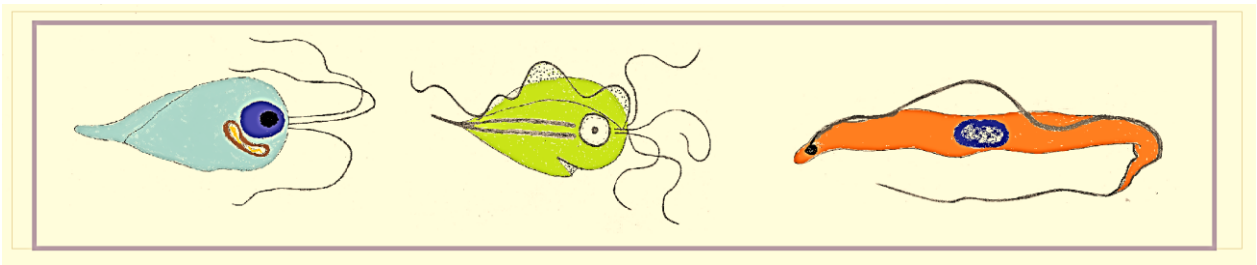


Bibliografía

- Ash LR & Orighel, TC. 1997. Atlas of Human Parasitology. 4° ed. American Society of Clinical Pathologists. ASCP Press, Chicago. 410 pp.
- Beaver, PC, Jung, RC & EW Cupp. 2003. Parasitología Clínica. 2003. 3° ed. Masson Doyma México, S.A. México, DF. 823 pp.
- Becerril MA. 2008. Parasitología Médica. 2ª. Ed. Mc Graw Hill/Interamericana Editores, SA de CV. México. 308 pp.
- Botero D. & M. Restrepo. 2005. Parasitosis humanas. 4° ed. Quebecor Word, Bogota, Colombia. CIB. 235-237 pp.
- Brooke MM & Melvin DM. 1984. Morphology, of Diagnostic Stages of Intestinal Parasites of Humans. Center for Disease Control, Atlanta, GA. HHS Publication CDC N° 84-8116. 30 pp.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Stool Specimens. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/index.htm> Ultimo Acceso Abril 12, 2010.
- Cho D, KK Hee, PS Chul, KY Kee, KL No, CL Seung. 2001. Evaluation of rapid immunocapture assays for diagnosis of *Plasmodium vivax* in Korea. Parasitol Res. 87:445-448.
- Coleman RE, M Maneechai, A Ponlawat, C Kumpitak, N Rachapaew, Miller RS. 2002. Short report: Failure of the OptiMAL rapid malaria test as a tool for the detection of asymptomatic malaria in an area of Thailand endemic for *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. Am J Trop Med Hyg. 67:563-565.
- Coleman RE, Maneechai N, Rachaphaew N, Kumpitak C, Millar RS, Soyseng V. 2002. Comparison of field and expert laboratory microscopy for active surveillance for asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in western Thailand. Am J Trop Med Hyg. 67: 141-144.
- Cox, FEG. 2004. Modern Parasitology. 2a Edición. Blackwell Science Ltd. USA. 276 pp.
- Fletcher RH, SW Fletcher, EH Wagner. 1996. Clinical Epidemiology: The essentials, 3rd ed. Baltimore: The William Wilkins Co. 46-58.
- Ferro BE, González IJ, Carvajal F, Palma GI, Saravia NG. 2002. Performance of OptiMAL in the diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in a malaria referral center in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 97:731-735.
- Filisetti D, S Bombard, C N'Guiri, R Dahan, B Molet, A Abou-Bacar. 2002. Prospective



- assessment of a new polymerase chain reaction target (STEVOR) for imported *Plasmodium falciparum* malaria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 21:679-681.
- Garcia, LS. 2001. *Diagnostic Medical Parasitology.* 4^o ed. American Society for Microbiology. ASM Press. Washington, DC. Pp. 329-362.
- González-Cerón, L, Rodríguez, AF Betanzos, A Abadía. 2005. Eficacia de una prueba rápida para el diagnóstico de *Plasmodium vivax* en pacientes sintomáticos de Chiapas, México. *Salud Publica Mex.* 47:282-287.
- Grobusch MP, Jelinek T, Anscheid. 1999. False positivity of rapid antigen detection tests for diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria: Issue appears to be more complicated than presented. *J Clin Microbiol* 1999;37:3781-3782.
- Iqbal J, A Sher, A Rab. 2000. *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich protein 2-based immunocapture diagnostic assay for malaria: Cross-reactivity with rheumatoid factors. *J Clin Microbiol.* 38:1184-1186.
- Iqbal J, A Muneer, N Khalid, MA Ahmed. 2003. Performance of the OptiMAL test for malaria diagnosis among suspected malaria patients at the rural health centers. *Am J Trop Med Hyg.* 68:624-628.
- Iqbal J, Khalid N, Hira PR. 2002. Comparison of two commercial assays with expert microscopy for confirmation of symptomatically diagnosed malaria. *J Clin Microbiol.* 40:4675-4678.
- Londono B, J Carmona, S Blair. 2002. Comparison between OptiMAL and the tick smear tests for malaria diagnosis in an endemic area during a non-epidemic period. *Biomedica.* 22:466-475.
- Melvin DM, Brooke MM. 1982. *Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites.* 3rd Edition. US Dept. of Health and Human Services publication no. (CDC) 82-8282. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention.
- Milne LM, PL Chiodini, DC Warhurst. 1994. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J Clin Pathol.* 4:740-742.
- Patsoula E, G Spanakos, D Sofianatou, M, Parara & NC Vakalis. 2003. A singlestep PCR-based method for the detection and differentiation of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. *Trop Med Parasitol.* 97:15-21.
- Piper R, J Lebras, L Wentworth, A Hunt-Cooke, S Houze, P Chiodini. 1999. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:109-118.
- Playford EG, J Walker. 2002. Evaluation of the ICT Malaria P.f/P.v and the OptiMAL Rapid Diagnostic Test for Malaria in



- Febrile Returned Travellers. *J Clin Microbiol.* 40:4166-4171.
- Rodríguez Pérez E. 2004. Atlas de Parasitología Médica. Mc Graw Hill. México. 57 pp.
- Singh N, N Valecha, AC Nagpal, SS Mishra, HS Varma, SK Subbarao. 200. The hospital and field-based performance of the OptiMAL test, for malaria diagnosis and treatment monitoring in central India. *Ann Trop Med Parasitol.* 97:5-13.
- Snounou G, S Viriyakosol, XP Zhu, W Jarra, L Pinheiro, VE do Rosario. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* 61: 315-320.
- Tato Saldivar P & García Yáñez, Y. 2010. Prácticas de Laboratorio. Programa académico de la asignatura de Microbiología y Parasitología. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Tree of Life Web Project. 2010. Apicomplexans. Sporozoans. <http://tolweb.org/Apicomplexans/2446Version>. in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>. Acceso el 27 de Abril 2010
- Trujillo Contreras F, A Villanueva & M Raygoza. 2001. Manual Práctico Ilustrado. Enfermedades Parasitarias. Ediciones Cuellas, Jalisco, México. 165 pp.
- Uribarren Berrueta, T. 2010. Recursos en Parasitología. Facultad de Medicina, Depto. de Microbiología y Parasitología, UNAM. http://www.facmed.unam.mx/marco/index.php?dir_ver=87. Ultimo acceso Abril 12, 2010.
- Warhurst DC, JE Williams. 1996. Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol.* 49:533-538.