

RECOMENDACIONES PARA LA REALIZACIÓN DEL EXAMEN PARASITOLÓGICO SERIADO DE DEPOSICIONES

RECOMENDACIONES PARA LA REALIZACIÓN DEL EXAMEN
PARASITOLÓGICO SERIADO DE DEPOSICIONES

AUTORES:

TM. María Isabel Jercic Lara PhD.

Jefe Sección Parasitología.
Subdepartamento de Enfermedades Infecciosas.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

TM. Alan Oyarce Fierro.

Encargado de Calidad.
Sección Parasitología.
Subdepartamento de Enfermedades Infecciosas.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE

Dra. Verónica Ramírez.

Jefe Subdepartamento Coordinación Externa.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES EXTERNOS

Comité de Expertos PEEC Parasitología

TM. José Luis Cerva Cortés.

Laboratorio de Parasitología.
Hospital Calvo Mackenna.

TM. Rubén Mercado Pedraza, PhD.

Profesor Asociado.
Unidad Docente de Parasitología.
Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
Sociedad Chilena de Parasitología.

TM. Hernán Sagua Franco.

Mg en Ciencias Biológicas mención Parasitología Universidad de Chile.

TM. Patricio Torres Hevia, PhD.

Profesor Instituto de Parasitología.
Facultad de Medicina.
Universidad Austral de Chile.

RECOMENDACIONES PARA LA REALIZACIÓN DEL EXAMEN PARASITOLÓGICO SERIADO DE DEPOSICIONES

RESUMEN

Este documento, entrega recomendaciones para la realización del Examen Parasitológico Seriado de Deposiciones (EPSD), desde la obtención de las muestras, procesamiento de éstas, informe de resultados hasta el control de calidad de la metodología empleada. La correcta utilización de estas recomendaciones permitirá uniformar la realización del EPSD en instituciones educativas y en los laboratorios clínicos del país que realicen exámenes de Parasitología.

ALCANCE

Las recomendaciones de este documento aplican a los laboratorios clínicos del país que proporcionen este examen entre sus prestaciones e instituciones educativas que impartan carreras cuyas sus mallas curriculares incluyan asignaturas, objetivos de aprendizaje y competencias en Parasitología general y humana.

INTRODUCCIÓN

El EPSD es el procedimiento de diagnóstico de laboratorio de mayor demanda en el área de la Parasitología en los laboratorios clínicos del país. Se estima, que al menos 466 laboratorios clínicos lo ofrecen como una más de sus prestaciones, según la información aportada por el Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) del año 2023.

Para realizarlo, se describen métodos basados en la concentración de los elementos parasitarios mediante sedimentación por fuerza de gravedad, centrifugación o flotación, entre los más empleados, que permiten concentrar los distintos estadios microscópicos o elementos de desarrollo de protozoos y helmintos parásitos presentes en una muestra de deposiciones. La sensibilidad de los métodos, dependerá entre otros de:

- La adecuada selección del procedimiento y su aplicación correcta.
- Aspectos biológicos de cada parásito.
- Intensidad de la infección.
- Adecuada obtención, transporte y procesamiento de la muestra.
- Equipamiento disponible en óptimas condiciones.
- Diseño físico del laboratorio, el cual debe cumplir con los requerimientos de cada equipo que interviene en el procesamiento de las muestras, así como ajustarse a normas ergonómicas y de bioseguridad.
- Tiempo dedicado por el profesional al análisis de las muestras.
- Sólida formación y experiencia del profesional que realiza el examen.

En este contexto, es primordial la selección del método que el laboratorio realice y la competencia técnica del profesional, esto último respaldado por a lo menos un semestre de formación en la identificación macroscópica y microscópica de los principales agentes parasitarios reconocibles en el EPSD, condiciones fundamentales a la hora de implementar correctamente la metodología.

Es importante destacar, que se requiere de un laboratorio con un buen diseño de su planta física, más una correcta instalación y mantenimiento de su equipamiento, lo que permite un adecuado desarrollo de las buenas prácticas de laboratorio clínico.

Para asegurar la calidad de los resultados emitidos, el laboratorio debe implementar un correcto control interno tanto de la etapa técnica, ya sea del método empleado, como también de la observación microscópica, evaluando periódicamente la competencia del observador en la identificación de los principales elementos parasitarios, lo que se complementa con la participación en un Programa de Evaluación Externa de la Calidad.

Por lo anterior, el objetivo de este documento es entregar las recomendaciones para la selección y realización del método a emplear asegurando así la calidad de la prestación realizada.

DEFINICIONES Y ABREVIACIONES

Método de concentración: procedimiento de laboratorio, basado en principios de sedimentación o flotación, mediante el cual se concentra o se aumenta la densidad, por unidad de muestra, de los estadios o elementos presentes.

MIF: Solución colorante y preservante que contiene entre sus componentes: Merthiolate, lugol y formaldehído.

PVA: Alcohol polivinílico es un polímero sintético que al mezclarse con el fijador Schaudinn es utilizado para la preservación de trofozoítos y quistes de protozoos en deposiciones y otras muestras biológicas.

Solución CVS: Solución que es la mezcla alcohólica de los colorantes safranina y cristal violeta.

Solución Fijadora: Suspensión homogénea de reactivos de rápida acción, cuyo objetivo es inactivar y preservar la morfología de los elementos presentes en la muestra por largo tiempo, y a través de su acción, disminuir los riesgos de contaminación con las diferentes formas infectantes que podría contener la muestra para quien la transporte o manipule.

DESARROLLO

En relación al EPSD se pueden mencionar los siguientes aspectos:

Ventajas	Desventajas
No invasivo.	Número de muestra (tres seriadas).
Permite detectar la mayoría de los parásitos del tracto digestivo y de vías biliares, como <i>Fasciola hepática</i> , prevalentes en Chile.	Tiempo desde la toma de muestra hasta la entrega de resultado.
Bajo costo.	Altamente dependiente del operador.
Ejecución simple.	Extenuante observación microscópica.
Buena especificidad y sensibilidad.	La especificidad depende de la competencia del profesional.

OBTENCIÓN Y CALIDAD DE LAS MUESTRAS

En Chile, en algunos casos, se ha decidido centralizar en un laboratorio la realización del EPSD, ya sea por las características geográficas (porque aún existen zonas alejadas de los centros de salud) o para optimizar recursos. En estas circunstancias, es importante minimizar los riesgos de infección por el transporte de las muestras garantizando al mismo tiempo la calidad de las mismas.

De lo anterior se desprende la recomendación de que las muestras empleadas sean **colectadas en soluciones fijadoras**. De no ser posible su uso, en casos excepcionales y de preferencia en recintos cerrados se podrán procesar muestras sin fijación debiendo garantizar el transporte de las muestras al laboratorio en menos de 24 horas, a temperatura entre 2 y 28 °C y asegurando la conservación adecuada de las muestras.

Solicitud de examen

- La orden o formulario de solicitud del EPSD debe incluir al menos:
- Nombres y apellidos del paciente.
- Fecha de nacimiento.
- Número de C.I. (cédula de identidad).
- Sexo.
- Procedencia indicando:
 - Dirección completa del paciente.
 - Establecimiento que deriva la muestra y su dirección.
- Nombre del profesional solicitante.
- Diagnóstico clínico o hipótesis diagnóstica.
- Fecha de toma de muestra (cuando corresponda).

Preparación del paciente

Antes de la toma de muestra, el paciente no debe haber recibido antibióticos, tratamiento quimioterápico, purgantes oleosos, antiparasitarios o compuestos que contengan carbón, bario o bismuto, ya que podrían generar resultados falsos negativos o dificultar la observación microscópica de las muestras. Si por razones médicas no pudiera suspenderse el uso de algunas de las sustancias antes señaladas, se recomienda indicarlo como observación en la solicitud de examen.

El paciente o su acompañante **SIEMPRE** deben recibir información verbal y por escrito sobre el procedimiento correcto para la obtención de la muestra y riesgo de la ingesta accidental del fijador. Anexo 1.

Materiales para la obtención de la muestra

- 3 frascos plásticos limpios, no necesariamente estériles, con cierre hermético, de tapa rosca, boca ancha y con etiquetas.
- Cada frasco con capacidad para 30 mL que debe contener 15 mL de solución fijadora.
- Se recomienda el uso de frascos con cucharilla incorporada.
- Si no poseen cucharillas, se requerirá de 3 paletas de madera auxiliares.
- Hoja impresa con las instrucciones para la recolección de las muestras. La hoja debe basarse en los aspectos generales detallados en los requisitos de la muestra, en lenguaje sencillo y comprensible. Anexo 2.
- Las etiquetas deben tener suficiente espacio para los siguientes datos:
- Nombres y apellidos del paciente.
- Fecha de obtención de la muestra.

Tipo y forma de obtención de la muestra

Las muestras requeridas deben provenir de deposiciones recién emitidas, no mezcladas con orina, cremas o talco. Estas pueden ser colectadas desde un recipiente limpio y seco, del pañal en el caso de lactantes o recurriendo a la ayuda de una bolsa plástica limpia, sobrepuesta en la taza del baño para facilitar su recolección y evitar la presencia de orina en la muestra.

Si se considera emplear sistemas concentradores desechables, éstos no deben ser incorporados a la realización de ninguno de los métodos mencionados en estas recomendaciones, ya que corresponden a una forma diferente de realización de búsqueda de elementos parasitarios en deposiciones, por lo que se deben seguir las instrucciones específicas indicadas por cada fabricante.

Número de muestras

El procesamiento debe ser de un número de **tres muestras recogidas en días alternados**. El esquema propuesto obedece a la variación temporal en la eliminación de los distintos estados de desarrollo de los parásitos con las deposiciones.

El periodo de recolección total comprende 5 días. Lo anterior, no excluye que en pacientes con cuadros graves se pueda emplear **una sola muestra** para realizar el examen, sin perjuicio de continuar posteriormente con la recolección y análisis de las demás muestras.

En el caso de algunas búsquedas dirigidas para ciertos agentes como: *Strongyloides stercoralis* y coccidios intestinales el número de muestras y su periodicidad puede variar con la finalidad de aumentar la sensibilidad. Por ello, se recomienda a los laboratorios diferenciar las indicaciones en la descripción de la prestación.

Fascos para recolección de muestra

Deben ser tres fascos, uno para cada fecha de obtención de muestra, lo que facilita la recolección de los especímenes y garantizar la correcta relación entre deposición y fijador. El frasco debe ser hermético, de material plástico resistente, de preferencia de boca ancha, lo suficiente como para permitir fácilmente la incorporación de la muestra sin derramar sobre los bordes. Los fascos pueden tener adosada a su tapa una cucharilla, para facilitar la recolección de la deposición y homogenización con el fijador. En caso de no tenerla, el laboratorio debe proporcionar algún elemento desechable que permita hacerlo. Lo más utilizados son las paletas de madera, que deben ser tres.

Estos fascos deben ser entregados en un **envase secundario**, que puede ser una bolsa plástica o caja de material rígido. Deben cerrarse herméticamente para evitar posibles derrames. Los fascos deben tener una etiqueta que permita identificar al paciente y fecha de la obtención de la muestra.

Relación fijador/muestra

Debe utilizarse **una parte de deposición por tres de fijador**. Homogenizar la muestra con el fijador para permitir una mejor acción de este último. El tiempo de fijación requerido dependerá del fijador utilizado. Se recomienda al menos 30 minutos de fijación antes del procesamiento, asegurándose de mezclar bien la muestra con el fijador.

Se debe considerar que, en algunas sospechas de diagnósticos, como búsqueda de larvas, trofozoítos o coccidios se recomienda usar muestras sin fijador por su afinidad con los colorantes a emplear o ver existencia de movilidad.

Cantidad de la muestra por frasco

Por ser éste un **examen cualitativo**, la cantidad de muestra es aproximada, recomendándose que en caso de deposiciones formadas alrededor de 5 g (**tamaño de una nuez**) para una cantidad de **15 mL de solución fijadora**. Cuando las deposiciones son líquidas, la cantidad de muestra aproximada a recolectar será de 5 mL para 15 mL de solución fijadora, lo cual correspondería a la cantidad equivalente a una cuchara sopera.

Soluciones fijadoras

Debe ser empleada aquella que se haya utilizado en la estandarización del método elegido por el laboratorio.

La mayoría de las soluciones descritas, contienen sustancias reconocidamente peligrosas por lo que se hace indispensable que el personal conozca sus componentes, sus riesgos, medidas preventivas y primeros auxilios frente a accidentes de laboratorio, por ello debe existir información escrita como ficha de seguridad de cada uno de sus componentes en los manuales de procedimientos internos. Como uno de los reactivos más empleados en la elaboración de soluciones fijadoras es el formaldehído, se mencionan en este documento consideraciones especiales para su manipulación en el Anexo 1.

Instrucciones para la obtención de muestra

El laboratorio, además de entregar las indicaciones escritas, debe proporcionar instrucciones verbales a los pacientes o familiares responsables de la obtención de las muestras. Se recomienda que la persona del laboratorio responsable de hacerlo solicite repetir las instrucciones para asegurar su comprensión. Las instrucciones escritas deben ser entregadas junto a los frascos y deben indicar los riesgos asociados al contacto con la solución fijadora y de qué hacer en caso de accidente. Anexo 2.

Conservación de las muestras

Como en la mayoría de los casos la recolección de las tres muestras toma 5 días, la solución fijadora seleccionada debe permitir la correcta preservación de las muestras en un rango amplio de temperatura, sin necesidad de refrigeración. Las muestras fijadas pueden ser conservadas durante varias semanas en un lugar fresco y alejadas de los niños. Pueden además ser transportadas a otras localidades sin necesidad de refrigeración, manteniéndose herméticamente cerradas y sin exposición al sol.

SELECCIÓN DEL MÉTODO

Este documento recomienda el uso de un **método de concentración por sedimentación mediante centrifugación**, ya que permite la pesquisa de la mayoría de los elementos diagnosticables en infecciones intestinales causadas por protozoos o helmintos. Dentro de los métodos de este tipo, se propone el uso del **Método de Burrows Modificado**, como el recomendado por la Sección Parasitología del ISP.

El uso de métodos de flotación es alternativo o complementario al método de Burrows Modificado para la búsqueda dirigida de coccidios intestinales, mientras que el método de sedimentación por fuerza de gravedad se recomienda para la detección de huevos de *Fasciola hepatica*.

Método de Burrows Modificado

Este método fue descrito en Estados Unidos por Robert A. Burrows en 1967 con el nombre de Método de PAFS (“Phenol-Alcohol-Formaldehyde-Sedimentation”). En Chile fue modificado por Torres P. y Navarrete N. en 1972. Más tarde, fue evaluado respecto al método del PVA y al método de Telemann Modificado (Sagua y col, 1973, 1975, Apt y col, 1977 y Mercado y col 1983). Estas evaluaciones demostraron una mayor eficiencia diagnóstica comparativa, especialmente en el hallazgo de trofozoítos de protozoos, respecto a los métodos utilizados de rutina en esa época. En Chile, se le conoce mayoritariamente como Método de Burrows Modificado.

Este es un método de concentración por sedimentación mediante centrifugación que se caracteriza por su buen rendimiento en el diagnóstico de huevos de helmintos, quistes y trofozoítos de protozoos, especialmente en el diagnóstico de elementos del género *Entamoeba*. La ventaja radica en la calidad de la solución empleada como fijador, que penetra rápidamente en el elemento parasitario permitiendo que las características morfológicas no se alteren e inactiva las formas infectantes que pudieran estar presentes en la muestra.

Recomendaciones para la observación microscópica de las muestras

Estas recomendaciones se aplican a todos los métodos.

El método de Burrows modificado incluye 2 fases en el procesamiento de las muestras (Anexo 3) observándose una preparación en cada fase, que es lo indicado en la literatura por los autores de las diferentes publicaciones al respecto. Sin embargo, si el laboratorio posee más de una tinción, se recomienda que se observen **dos preparaciones por fase**, una por cada colorante. Esto facilita y aumenta la probabilidad de detectar elementos parasitarios, en la mayoría de los casos, pudiéndose la identificación de algunos elementos que pudieran presentar dificultad y es el procedimiento utilizado de rutina por el Laboratorio de Referencia de Parasitología del ISP.

Observación microscópica de láminas preparadas:

- Utilizar un microscopio binocular con lentes objetivos de 10x, 40x y 100x (inmersión). Los lentes oculares deben tener un mínimo de 10x y estar dotados de una escala micrométrica para efectuar diagnósticos diferenciales que requieren mediciones de los elementos parasitarios o sus estructuras (por ejemplo, huevos de *Fasciola hepatica* respecto a los de la familia Diphyllbothriidae, larvas de nematodos, huevos de *Ancylostoma/Necator* respecto a los de Trichostrongylidae, etc.)
- Observar las preparaciones con objetivos de 10x para la búsqueda de huevos y larvas de helmintos y de 40x para la búsqueda de trofozoítos, quistes, ooquistes o esporoquistes de protozoos,
- Utilizar el objetivo de 100x para confirmar la identificación de trofozoítos o quistes en especial aquellos de amebas.
- Recorrer la preparación completamente con objetivo de 10x como con objetivo de 40x, teniendo especial cuidado en permitir que los límites de los recorridos se superpongan, para no dejar áreas sin examinar.

TINCIONES

Los colorantes recomendados para la observación de preparaciones húmedas en muestras de deposición deben ser capaces de teñir las estructuras y permitir la identificación de los distintos elementos parasitarios, con especial interés en la observación de los núcleos, en el caso de los protozoos.

Si no se dispone de colorantes y solo en casos de urgencia, la muestra puede ser observada al fresco y sin teñir, sin embargo, esto podría disminuir la sensibilidad y especificidad del método cuando el observador no posee la experiencia adecuada por lo que se recomienda utilizar tinciones.

Es importante considerar que todos los colorantes requieren un tiempo de acción para la correcta tinción de los elementos. No existen referencias publicadas anteriores que indiquen estos tiempos, sin embargo, la experiencia, a juicio de expertos, recomienda un rango que va entre 5 y 15 min., dependiendo del tipo de colorante, de la dilución, del parásito que se busque en la muestra y de las estructuras específicas por teñir.

Los colorantes mencionados, en este documento, han sido utilizados por distintos laboratorios en Chile, sin embargo, tionina es el colorante de elección y descrito por Burrows (1967) y otros autores.

Entre los colorantes disponibles se encuentran:

- Solución de tionina, recomendado para el método de Burrows modificado.
- Solución MIF recomendada para el método de Telemann modificado.
- Solución de yodo o lugol.
- Solución de cristal violeta y safranina (CVS).

INFORME DE RESULTADOS

Se recomienda emitir el informe de acuerdo a la normativa vigente para los laboratorios clínicos. Además, se debe indicar el número de muestras examinadas.

- Si el resultado es negativo, es decir no se observan elementos parasitarios, se informa de la siguiente manera:
 - Examen Parasitológico Seriado de Deposiciones. (EPSD)
 - Método de Burrows Modificado.
 - **(x)** Número de muestras procesadas.
 - Resultado: **No se observan elementos parasitarios.**
 - Observaciones:
- Si el resultado es positivo, es decir presenta estados evolutivos de protozoos o helmintos, se informa de la siguiente manera:
 - Examen Parasitológico Seriado de Deposiciones. (EPSD)
 - Método de Burrows Modificado.
 - **(x)** Número de muestras procesadas.
 - Resultado: **Se debe informar la presencia de todos los elementos observados en la muestra.**
 - Observaciones:

Consideraciones adicionales:

- Siempre deberá indicarse el estado de desarrollo del elemento observado, tales como: huevo, larva, quiste, ooquiste, etc. y el nombre científico del parásito, **correctamente escrito** y ciñéndose las recomendaciones del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica.
- No utilizar abreviaciones.
- No clasificar las especies encontradas en parásitos y comensales.
- Siempre se deben informar la presencia de cristales de Charcot-Leyden.
- No se debe estimar la carga parasitaria de los elementos presentes en la muestra, dado que el EPSD no corresponde a un método cuantitativo.

REGISTROS

Se recomienda utilizar hoja de trabajo y libro de registro, ya sea en formato papel o digital, de las actividades realizadas que debe incluir al menos la siguiente información:

- Nombre del paciente.
- N° de registro.
- Fecha del examen.
- Edad del paciente.
- Procedencia.
- Técnica empleada.
- Resultado obtenido.
- Número de muestras observadas
- Nombre de responsable de la ejecución de la técnica.
- Nombre del observador

CONTROL DE LA CALIDAD

Control Interno

Se sugiere contar con un control interno para esta metodología que incluya todos los aspectos relevantes. Algunos de los indicadores posibles de evaluar, extraídos del Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico publicado por el Instituto de Salud Pública, serían:

Se evalúa	Frecuencia	Indicador Expresado como porcentaje de muestras
Relación fijador/muestra	Mensual	% de muestras escasas. % de muestras excesivas.
Instrucciones al paciente	Trimestral	% de pacientes que comprenden las instrucciones.
Observación microscópica variación entre observadores	Trimestral	% de muestras positivas por profesional calculando promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Lo anterior se complementa el documento técnico publicado en 2016: Recomendaciones para el Control de Calidad aplicado al Examen Parasitológico Seriado de Deposiciones (EPSD) disponible en:

<https://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendaciones%20para%20el%20Control%20de%20Calidad%20EPSD.pdf>

Control Externo

Los laboratorios que proporcionen la prestación de este examen deben participar en algún Programa de Evaluación Externa de la Calidad con al menos dos envíos al año y dos muestras cada vez. Esto permite evaluar y mantener actualizado al personal en el reconocimiento de los principales elementos parasitarios. Es necesario, que estas muestras sean analizadas **como una muestra más** dentro de la rutina de trabajo.

BIOSEGURIDAD

Durante la obtención y el procesamiento de las muestras, al igual que para los otros exámenes de fluidos corporales, se deben guardar las precauciones contenidas en el Manual de Bioseguridad del laboratorio y seguir las buenas prácticas necesarias para proteger al paciente, al operador, al observador y al medio ambiente.

Tener presente y aplicar las normas del reglamento sobre Manejo de Residuos de Establecimientos de Atención de Salud (REAS, 2009) y decreto N° 594 sobre condiciones sanitarias y ambientales básicas en los lugares de trabajo (DECRETO DE SALUD N° 594/1999) que regulan las condiciones mínimas de contaminantes en las áreas de trabajo.

Los frascos con deposición y mezclados con fijador que contengan formaldehído no pueden ser desechados en la basura común. Se debe disponer de un recipiente especial para residuos peligrosos, así como también se deben colocar en bidones los líquidos resultantes de los centrifugados, sobrenadantes y soluciones que contengan formaldehído.

Se deben considerar atención especial a las recomendaciones relacionadas con el uso de reactivos tales como fenol y formaldehído Anexo 1.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece en forma especial el trabajo realizado por el Sr. Víctor Muñoz Flores Q.E.P.D. Tecnólogo Médico, Profesor Asociado de Tecnología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, el impulsor de la iniciativa de normalizar acerca de este tema y quien habría sido, sin duda, revisor de esta recomendación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asenjo, S. y Teuber, C. Tinción CVS. Una nueva técnica de tinción para el diagnóstico de trofozoítos y quistes de protozoos y huevos de helmintos intestinales. *Rev. Chil. Tecnol. Méd.* 1990, 13(2): 655-658.
2. Apt, W., C. Perez, G. Doren, J. Azocar. Evaluación del rendimiento del método de PAFS en el diagnóstico de las enteroparasitosis. *Revista Médica de Chile.* 1977; 105: 388-389.
3. Atías A. *Parasitología Médica.* Editorial Publicaciones Técnicas Mediterránea Ltda. 1999. ISBN: 956-220-155-4.
4. Burrows, R. A. New fixative and technics for the diagnosis of intestinal parasites. *Am J Clin Pathol.* 1967; 48: 342-346.
5. International Commission on Zoological Nomenclature. *International Code of Zoological Nomenclature.* Fourth edition. Published by The International Trust for Zoological Nomenclature c/o The Natural History Museum, London, UK. 1999.
6. Instituto de Salud Pública de Chile. *Manual de control de Calidad en el Laboratorio Clínico.* Ministerio de Salud. 1988.
7. Mercado R., Reyes V., Atías A. Rendimiento comparativo de las técnicas de Telemann modificado y PAF adaptado en el diagnóstico coproparasitológico. *Parasitología al Día.* 1983; 7: 104-107.
8. Ministerio de Salud. Decreto N° 594 sobre Condiciones Sanitarias y Ambientales Básicas en los lugares de trabajo. 1999. Publicado en el Diario Oficial de 29 de abril de 2000.
9. Ministerio de Salud. DTO. N° 6: Reglamento sobre Manejo de Residuos de Establecimientos de Atención de Salud (REAS). 2009.
10. Sagua H, Subiabre V, Galdames M, Arias B. Comparación del rendimiento de tres métodos en el diagnóstico coproparasitológico. *Rev. Med. Chile.* 1975; 103: 175-177.
11. Sagua H, Subiabre V, Torres P, Puga S, Arias B. Análisis comparativo del rendimiento del método del Fijador PAFS con referencia al método con Fijador PVA en el diagnóstico de protozoos y helmintos intestinales. *Bol Chil Parasitol.* 1973; 28: 58-60.
12. Torres, P. & Navarrete, N. Comparación entre los métodos del fijador PAFS y del Telemann modificado en el diagnóstico de protozoos intestinales del hombre. *Bol Chil. Parasitol.* 1972; 27, 90-95.

ANEXO 1

RECOMENDACIONES PARA LABORATORIOS DE PARASITOLOGÍA QUE EMPLEEN FORMALDEHÍDO O FENOL EN SUS SOLUCIONES FIJADORAS.

Todos los laboratorios que empleen formaldehído entre sus reactivos, deben ocupar campana de extracción de gases con capacidad suficiente para asegurar concentraciones inferiores al límite ambiental de 0,3 ppm (0,37 mg/m³) para exposiciones cortas.

En caso de no poseer este equipamiento los operadores deberán emplear elementos de protección personal para protección por vía aérea, piel o salpicaduras, tales como guantes, delantal, gafas y máscara facial. Si se pretende evitar completamente la inhalación de vapores, debe recurrirse a la utilización de equipos de protección respiratoria incluyendo filtros químicos del tipo BP3 y asegurar recambios de aire de la habitación.

Para el caso del uso de Fenol, se recomienda utilizar ventilación por extracción localizada en el lugar de las emisiones químicas y aislar del resto del personal el proceso de manipulación. De lo contrario, se puede utilizar respiradores apropiados junto con el uso de elementos de protección personal.

Es importante mantener al personal continuamente informado de los riesgos a los que se encuentra expuesto, cómo minimizar estos riesgos y cómo actuar en caso de accidente.

El laboratorio puede evaluar el reemplazo del formaldehído y otros reactivos nocivos para la salud en algunas metodologías. Sin embargo, debe mantenerse su eficiencia original, incluyendo la preservación efectiva de los parásitos y facilitación del proceso de tinción. Si bien, en algunos métodos como PVA se ha efectuado el remplazo de reactivos por otros menos nocivos, los resultados no han sido tan buenos como con el fijador original.

ANEXO 2

INSTRUCCIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA DE DEPOSICIONES PARA ESTUDIO DE ENTEROPARASITOSIS

1. Completar la etiqueta del frasco con el nombre completo y fecha de obtención de la muestra.
2. Defecar en un recipiente limpio y seco, en el pañal o recurriendo a la ayuda de una bolsa plástica limpia, sobrepuesta en la taza del baño para facilitar su recolección sin orina.
3. No debe mezclar las deposiciones con orina, cremas o talco.
4. No debe haber ingerido en días anteriores antibióticos, tratamiento quimioterápico, purgantes oleosos, fármacos a base de bismuto, bario o carbono, ni medicamentos específicos, contra la o las parasitosis que se investigan.
5. Debe colocar un trozo de deposición del tamaño de una nuez dentro del frasco. En el caso de deposiciones líquidas colocar lo equivalente a una cuchara sopera (5 mL).
6. Revolver con la cucharilla o el agitador adjunto hasta que el excremento se disuelva completamente en el líquido que contenga el frasco.
7. Repetir día por medio hasta completar los 3 frascos.

NOTA: EL CONTENIDO LÍQUIDO DE LOS FRASCOS ES TÓXICO Y DEBE PERMANECER FUERA DEL ALCANCE DE LOS NIÑOS. EN CASO DE INGESTA ACCIDENTAL DEBE ACUDIR DE INMEDIATO A UN SERVICIO DE URGENCIA PARA RECIBIR ATENCIÓN.

ANEXO 3

MÉTODO DE BURROWS MODIFICADO

Materiales y Equipos

- Vasos de vidrio.
- Pissetas.
- Mallas de tamizaje de bronce fosfórico, cobre o acero inoxidable. Abertura 425 µm de diámetro. Hilo 250 µm.
- Paleta de madera o baquetas de vidrio.
- Tubos de centrifuga graduados con 15 mL de capacidad, cónicos, de plástico desechable y con tapa.
- Portaobjetos 1" ancho x 3" de largo, 1 mm – 1,2 mm de grosor.
- Cubreobjetos de 22 x 22 mm.
- Máscara de seguridad de uso individual con filtro para formaldehído tipo BP3.
- Centrifuga no refrigerada.
- Cámara de extracción de gases.
- Suero fisiológico de 0,85 %
- Fijador PAF.
- Acetato de etilo, que reemplaza al éter etílico por razones de seguridad.

Tinción

El método de Burrows modificado fue descrito empleando solución de tionina como colorante según las recomendaciones del autor del método, sin embargo, en su ausencia se podrían utilizar como alternativa las siguientes soluciones:

- MIF
- Solución de yodo o lugol
- CVS

De los colorantes mencionados esta normativa recomienda el uso de CVS. Sin embargo, el laboratorio debe seleccionar la o las tinciones para la cual el observador se sienta más cómodo y le permita una mejor diferenciación de los elementos presentes en la muestra.

Preparación de soluciones

a.- Fijador PAF:

- | | |
|---------------------------------------|--------|
| • Cristales de Fenol | 20 g |
| • Suero fisiológico (0,85%) | 825 mL |
| • Etanol al 95% | 125 mL |
| • Formaldehído en solución (37 o 40%) | 50 mL |

Disolver los cristales de fenol y formaldehído en el suero fisiológico 0.85%. Mezclar bien y guardar el frasco en un lugar fresco. El fenol líquido (23 mL) puede reemplazar a los 20 g de fenol en cristales.

b.- Suero fisiológico 0.85%:

- Na Cl 8.5 g
- gua destilada 1000 mL

Preparación de la Tinción

a) Solución MIF:

Solución de yodo o Lugol	0,10 mL
Formaldehído sol. (37 o 40 %)	0,15 mL
Timerosal 1/1000	0,75 mL
Debe prepararse diariamente.	

b) Solución de yodo o Lugol:

Yodo	1 g.
Yoduro de Potasio	2 g.
Agua destilada	30 mL
Guardar en frasco ámbar como máximo un mes.	

c) Solución de Tionina 0,1 %:

Tionina en polvo	10 mg
Agua destilada	100 mL

Filtrar con papel filtro varias veces hasta que no se produzca precipitación de los cristales al teñir las preparaciones.

d) Solución CVS:

Solución A:

Cristal violeta	1 g
Etanol	6 mL
Suero fisiológico 0.85%	494 mL
Mezclar y filtrar, Guardar en frasco ámbar.	

Solución B:

Safranina	0,25 g
Etanol	10 mL
Suero fisiológico 0,85%	490 mL
Mezclar y filtrar. Guardar en frasco ámbar	

Las soluciones A y B se mantienen indefinidamente a temperatura ambiente.

Preparación solución de trabajo:

Colocar 4 partes de solución A y 10 partes de solución B. Mezclar. Guardar en frasco ámbar. Etiquetar.

La solución de trabajo de la tinción CVS mantiene sus propiedades como máximo 3 meses desde el momento de su preparación.

DESARROLLO DEL MÉTODO

1. Durante el procesamiento de las muestras, al igual que para los otros métodos aplicados a fluidos corporales, se deben guardar las precauciones contenidas en los manuales de bioseguridad.
2. Numerar los tres frascos del paciente con el mismo número.
3. Numerar 2 portaobjetos diferenciando la Fase trofozoítica (T) de la Fase quística (Q), 2 vasos y 1 tubo de centrífuga con el mismo número de los frascos.
4. Homogenizar el contenido de los frascos mediante ayuda de una paleta de madera.
5. Vaciar todo el contenido de cada frasco en un vaso y agregar suero fisiológico 0,85% con la precaución de efectuar una buena dilución y homogenización.
6. Tamizar la emulsión a través de la malla colocada en un vaso limpio.
7. Observar el material retenido en la malla en busca de parásitos macroscópicos.
8. Colocar aproximadamente 12 mL de tamizado en el tubo de centrífuga.
9. Centrifugar por 3 minutos a 1.800 r.p.m.
10. Eliminar el sobrenadante invirtiendo el tubo. Si el sedimento es menor de 0,5 mL agregar del tamizado hasta lograr un sedimento de 0,5 a 0,6 mL. Resuspender con suero fisiológico 0,85 % y centrifugar nuevamente.
11. Resuspender el sedimento hasta 2 mL con suero fisiológico 0,85 % y agitar para soltar el sedimento.
12. Completar a 12 mL con suero fisiológico 0.85% y centrifugar por 3 minutos a 1.800 r.p.m. aproximadamente.
13. Repetir los pasos 11 y 12 entre dos y cuatro veces hasta obtener un sobrenadante limpio o transparente.
14. Colocar una gota de tinción, en el portaobjeto marcado con la letra T (fase trofozoítica).
15. Colocar una gota del sedimento, una junto a cada gota de tinción.
16. Con un ángulo del cubreobjetos mezclar el sedimento y la tinción; luego cubrir.
17. Guardar en cámara húmeda.
18. Resuspender el contenido del tubo de sedimento con suero fisiológico 0,85% hasta 10 mL
19. Agregar 2 mL de acetato de etilo.
20. Tapar el tubo y agitar enérgicamente por 30 segundos. Destapar lentamente.
21. Centrifugar por 3 minutos a 2.000 r.p.m.
22. Vaciar todo el sobrenadante de una sola vez, en forma rápida, invirtiendo el tubo.

23. Resuspender el sedimento en 1 mL de suero fisiológico 0,85 % y homogenizar.
24. Proceder como en el punto 14 y marcar el portaobjetos con una letra Q (fase quística).
25. Proceder igual que en el punto 15 y 16.
26. Colocar en cámara húmeda hasta su lectura. Estas preparaciones se pueden conservar hasta 24 horas en la cámara húmeda en un lugar fresco o refrigerar entre 2 y 8°C.
27. Observar las muestras recorriendo totalmente la preparación e informar. Siguiendo el esquema de orientación de lectura de las preparaciones.

