

Comparación del Método de Stoll y el Frotis Directo Normalizado para la Determinación Cuantitativa de Helmintiasis Intestinales

Drs. Alberto García Laverde*
Cecilia Jiménez de Moreno**

El recuento de los huevos de helmintos complementa el examen coprológico cualitativo, suministrando información de importancia clínica y epidemiológica sobre la intensidad aproximada de varias helmintiasis intestinales. Tal determinación es también indispensable durante los ensayos terapéuticos de drogas antihelmínticas. De los dos métodos generalmente empleados para efectuar recuentos de huevos, el más conocido y generalmente usado se conoce como el método de dilución de Stoll, según la descripción de Stoll y Hausheer (1926), pero varias dificultades de procedimiento han limitado su aplicación. La técnica conocida como frotis directo normalizado, descrita por Beaver (1949, 1950), es de ejecución relativamente sencilla pero su empleo poco se ha gene-

* Departamento de Microbiología y Patología Tropical, Universidad del Zulia, Maracaibo.

** Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Cartagena, Cartagena.

realizado a pesar de que algunos estudios comparativos con la técnica de Stoll (Maldonado, 1956; Melvin et al., 1956), coincidieron en hallar equivalentes los resultados de ambos métodos para apreciar la magnitud de los parasitismos.

El presente trabajo tiene por objeto presentar una comparación estadística de las cifras obtenidas por las dos técnicas en el mismo grupo de pacientes y con base en los resultados, procura contribuir a estimular el interés en el empleo del frotis directo normalizado.

MATERIAL Y MÉTODO

La investigación se cumplió estudiando muestras de heces de 410 individuos parasitados por una hasta cinco de las especies de helmintos que se mencionan adelante. Estuvieron representados ambos sexos y todos los grupos de edad. Los pacientes fueron seleccionados de una agrupación suburbana de bajo nivel socio-económico de la ciudad de Cartagena, Colombia, en donde se desarrolla el programa de Medicina Preventiva Familiar, organizado por la Facultad de Medicina de dicha ciudad.

Por lo general, las muestras comenzaban a procesarse poco tiempo después de recibidas en el laboratorio, pero en caso de demora se guardaban en nevera hasta el momento del examen. Los procedimientos se adhirieron estrictamente a las descripciones originales de los autores. En toda muestra se practicó el recuento de huevos de helmintos por cada una de las dos técnicas, de acuerdo a la descripción siguiente:

Método de Stoll

Elementos:

1. Solución N/10 de NaOH (0.4%).
2. Frascos de Stoll tipo erlenmeyer, marcados a los niveles de 56 y 60 ml., con tapón de caucho correspondiente.
3. Perlas de vidrio pequeñas.
4. Portaobjetos y laminillas de 22 x 30 mm.

5. Pipetas calibradas para 0.075 ml.
6. Aplicadores de madera.

Procedimiento:

1. Llenar el frasco hasta la marca de 56 ml. con la solución N/10 de NaOH.
2. Añadir las heces con un aplicador, sin untar el cuello del frasco, hasta que el líquido alcance la marca de 60 ml.
3. Añadir las perlas, tapar y sacudir vigorosamente.
4. Dejar en reposo de 12 a 24 horas, sacudiendo ocasionalmente.
5. Sacudir verticalmente por 20 a 30 segundos, destapar y sacar inmediatamente con la pipeta 0.075 ml. exactos.
6. Enjugar el exceso de suspensión en el exterior de la pipeta y colocar la muestra de 0.075 ml. sobre la lámina.
7. Cubrir con laminilla de 22 x 30 mm. y contar los huevos de toda la preparación.
8. Multiplicar este recuento por 200 y registrar el resultado como huevos/ml., sin corrección.
9. Corregir de acuerdo a la consistencia de las heces multiplicando el dato anterior por los siguientes factores: heces duras, x 1; pastosas, x 2; blandas, x 3; líquida o diarreas, x 4.
10. Las cifras corregidas se informan como huevo / ml.; (base de heces duras).

Método de Beaver

Esta técnica se basa en la comprobación de que los huevos de las especies que habitan en el intestino delgado y parte alta del colon, tienen distribución uniforme en las heces. Beaver comenzó por demostrar que repitiendo frotis directos de igual densidad y preparaciones por dilución de la misma muestra, se obtenían recuentos del mismo grado de variabilidad. La densidad (turbidez) uniforme de los frotis se logró con el empleo de fotó-

metros y la calibración de éstos para obtener una cantidad standard conocida, se obtuvo preparando por métodos analíticos suspensiones de sulfato de bario.

Elementos:

1. Fotómetro tipo exposímetro, sensible a luz tenue y que presente la escala en la misma cara de la ventana de la célula fotoeléctrica. En el presente trabajo se usó un Weston Master, modelo 703. El aparato se adapta colocando sobre la ventana de la célula un bloque de madera de 18 mm. de espesor, provisto de una perforación circular central de 16 mm. de diámetro. Este bloque sirve de plataforma para el porta-objetos que llevará la preparación y reduce la ventana al tamaño conveniente para extender el frotis. Directamente sobre la plataforma se coloca una lámpara eléctrica desplazable que produzca una lectura de 20 bujías cuando se encuentre aproximadamente a una altura de 25 cm. de la perforación circular del bloque.
2. Para la calibración se preparan dos soluciones: 2N Na_2SO_4 y N/1 BaCl_2 . A cada solución se añade $\frac{1}{2}$ parte de glicerina pura. Si se desea una turbidez equivalente a 1 mg., combínese 1 parte del BaCl_2 glicerinado con 6 partes de Na_2SO_4 glicerinado; para una turbidez equivalente a 2 mg., que es la más usada, combínese 1 parte de BaCl_2 glicerinado con 3 partes de Na_2SO_4 glicerinado. Colóquese una lámina sobre el centro de la plataforma y moviendo la lámpara, búsqese un número entero en la escala de bujías. Aplíquese una gota (1/20 ml.) de la suspensión de BaSO_4 equivalente a 1 ó 2 mg. a nivel de la ventana de 16 mm. Anotar la reducción en la lectura de la escala. Repetir la operación hasta que se obtenga un promedio de reducción luminosa, que viene a ser igual al producido por 1 mg. de heces duras emulsionadas en una gota de agua.

Procedimiento:

1. Colocar una lámina limpia sobre la ventana de la plataforma y adaptar la lámpara para obtener el mismo número entero usado en la calibración.

2. Poner una gota de agua o solución salina sobre la lámina, emulsionar la materia fecal hasta que la luz se reduzca al nivel calibrado para 1 mg. o 2 mg.
3. Cubrir con laminilla de 22 x 22 mm. y contar los huevos de toda la preparación. Multiplicando por 1.000 o por 500, según el caso, se obtiene la cifra de huevos por gramo.

Para la comparación estadística de los datos cuantitativos se calculó como medida de asociación el coeficiente de correlación según el procedimiento aceptado corrientemente. En segundo lugar, se utilizó la prueba de chi cuadrado por el método gráfico como medida de asociación entre las dos variables descritas cualitativamente. Para esto fue necesario transformar las cifras de huevos en parasitismos leves, moderados e intensos. Con este objeto para cada parásito las anteriores categorías se clasificaron así:

Para **Ascaris lumbricoides**, la infección leve (L) representa hasta 5.000 huevos por ml. de heces; infección moderada (M), desde 5.000 a 20.000 huevos; e infección intensa (I) por encima de 20.000 huevos. Estas cifras se basan en un cálculo de aproximadamente 1.000 huevos por ml. de heces por gusano (Brown y Cort, 1927; Agustine *et al.*, 1928).

Para **Trichuris trichiura**, L representa hasta 10.000 huevos por ml, M representa entre 10.000 y 20.000 e I equivale a más de 20.000 huevos. Lo anterior se basa en el cálculo de aproximadamente 300 huevos por ml. por parásito (Burrows, 1950).

Para **Necator americanus**, el ancilostomídeo de mayor incidencia en la región estudiada, L representa hasta 5.000 huevos, M de 5.000 a 20.000 e I, 20.000 o más, según el cálculo de 50 huevos por ml. por parásito adulto (Stoll y Hauscheer, 1926).

Para **Hymenolepis nana**, L representa hasta 5.000 huevos, M de 5.000 a 20.000 e I por encima de 20.000. Este parásito se calcula que sólo produce aproximadamente 12 huevos por ml. por adulto (Beaver y Sodeman, 1952).

En el caso de **Strongyloides stercoralis**, parásito que solamente deposita varias docenas de huevos en la mucosa intestinal por

día durante los pocos meses de máxima fecundidad (Faust *et al.*, 1962), arbitrariamente L representa hasta 1.000 larvas por ml. de heces, M representa de 1.000 a 5.000 larvas e I, 5.000 o más larvas. En este caso no es posible hacer el cálculo del número de adultos por individuo, pues no se conoce en forma precisa la magnitud de la oviposición de las hembras.

RESULTADOS

En las 410 muestras observadas se encontraron 1.032 infecciones por helmintos, correspondientes a las cinco especies analizadas, repartidas en esta forma: **Ascaris lumbricoides**, 291; **Trichuris trichiura**, 388; Ancylostomidae, 203; **Strongyloides stercoralis**, 87; **Hymenolepis nana**, 63.

El Cuadro N° 1 presenta los resultados generales del trabajo: número de positivos por cada una de las técnicas y los coeficientes de correlación.

CUADRO N° 1

Coefficientes de correlación de los métodos de Beaver y de Stoll en el recuento de huevos de cinco helmintos intestinales

	Ascaris	Trichuris	Necator	Strongyloides	Hymenolepis
Total de infecciones	291	388	203	87	63
Casos positivos por el método de Beaver	288	385	200	87	62
Casos positivos por el método de Stoll	284	372	184	35	55
Casos positivos en ambos métodos	281	370	181	35	54
Coefficientes de correlación para los positivos en ambos métodos	0.79	0.90	0.88	0.63	0.96

El Cuadro N° 2 muestra los promedios de huevos contados por el frotis directo normalizado y por la técnica de dilución. Igualmente, el número promedio de helmintos adultos por persona, según cada técnica, de acuerdo a los cálculos explicados atrás para cada especie.

CUADRO N° 2

Recuento promedio de huevos de helmintos y cálculo del promedio de parásitos por persona, según los métodos de Beaver y de Stoll

	Ascaris	Trichuris	Necator	Hymenolepis
Número de casos	281	370	181	54
Promedio de huevos Método de Beaver	63.840	24.970	6.820	20.680
Promedio de huevos Método de Stoll	52.430	19.500	5.700	14.310
Helmintos por persona Método de Beaver	65	83	136	1.723
Helmintos por persona Método de Stoll	52	65	114	1.192

La Figura N° 1 representa los hallazgos analizados por el método gráfico de chi cuadrado. X corresponde a Beaver, Y corresponde a Stoll; L a infección leve, M a infección moderada e I a infección intensa. Al detallar los resultados vemos que en el caso de **Ascaris lumbricoides** ambos recuentos coinciden en 226 de los 281 casos, o sea, en un 80.4%. Tenemos 4 casos de recuentos de divergencia amplia (1.4%).

Para **Trichuris trichiura** hay 292 coincidencias en 370 recuentos (78.9%) y 8 casos de recuentos ampliamente divergentes (2.1%). En **Necator americanus** coinciden 159 de 181 exámenes, lo que da una asociación de 87.8%; recuentos muy divergentes,

2 muestras (1.1%). 48 de 54 recuentos de huevos de *H. nana* coinciden, dando una asociación de 88.8%; 1 caso de recuento de divergencia amplia (1.8%). Para *Strongyloides stercoralis*, 18 de 35 recuentos coinciden, dando una asociación de 51.4%; los recuentos muy divergentes fueron 5 (14.2%).

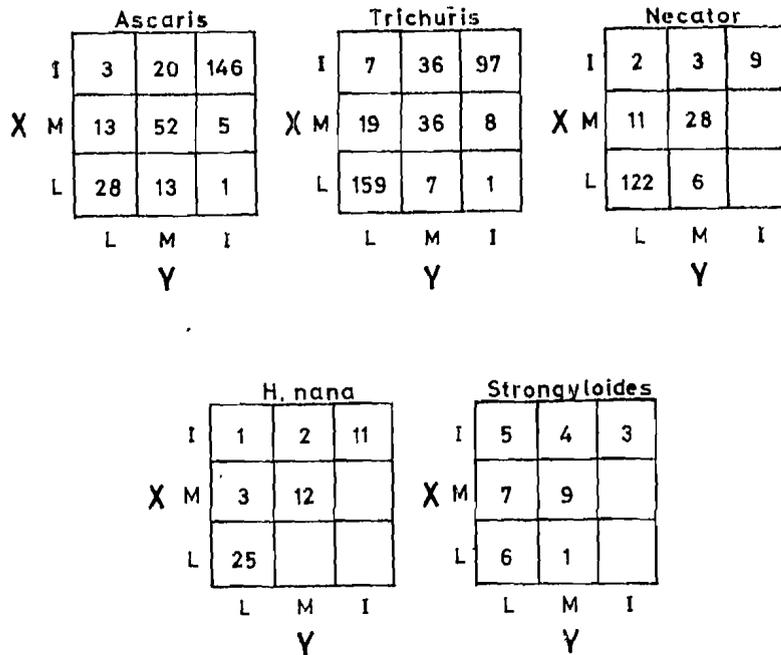


FIGURA N° 1.— Relaciones chi cuadrado de los recuentos de huevos por los métodos de Beaver (X) y de Stoll (Y). L = infecciones leves, M = moderadas, I = intensas.

DISCUSION

Los resultados del estudio muestran que los coeficientes de correlación dieron valores estadísticos altamente significativos. Hay que exceptuar los hallazgos para *Strongyloides stercoralis*, pues no se incluyeron 52 casos (59% del total para este helminto) que resultaron negativos por la técnica de Stoll, anulando por tanto el valor comparativo. El coeficiente de correlación de los 35 casos

restantes, positivos en ambos métodos, es de bajo nivel y carece posiblemente de valor si se tiene en cuenta que grados de correlación moderadamente altos resultan estadísticamente no significativos, si están basados en una muestra relativamente pequeña. Las mismas limitaciones afectan la comparación por el método gráfico.

En encuestas epidemiológicas tiene valor primordial el clasificar los parasitismos en intensos, moderados o leves. El método gráfico usado atrás muestra en forma evidente los casos que coinciden y los que difieren. Las cifras de coincidencia fueron altas y los casos de divergencias amplias fueron mínimos.

Los resultados anteriores indican que ambos métodos pueden usarse indistintamente, de modo que el criterio de elección será dado por la sencillez y rapidez del procedimiento. La técnica de Beaver reúne estas dos condiciones y varias otras que la ponen en ventaja, tales como menos cantidad de muestra, menos vidriería y mucho menos espacio de laboratorio. Otra ventaja muy importante es que se omite la lectura de la consistencia de las heces. Este ha sido el mayor obstáculo en la aplicación rutinaria del método de Stoll, puesto que en las heces fecales entran siempre elementos de materia indigesta gruesa y cantidades variables de agua que diluyen lo que verdaderamente se debe considerar como excrementos. El frotis normalizado puede simplificar el trabajo coprológico haciendo superfluo el examen del frotis directo en solución salina.

Cuando se controla periódicamente el buen funcionamiento del fotómetro con suspensiones de sulfato de bario, las posibilidades de cometer errores son pocas. Por el contrario, el método de Stoll exige permanente concentración durante sus varias etapas, como al medir el líquido y las heces, al desmenuzar la muestra, al tomar con la pipeta gotas verdaderamente representativas de la suspensión. Los descuidos se reflejan en errores amplios.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se practicaron recuentos comparados de huevos de cinco helmintos intestinales utilizando dos técnicas: frotis directo normalizado de Beaver y técnica de dilución de Stoll.

Se efectuaron comparaciones en 281 infecciones de **A. lumbricoides**, 370 de **T. trichiura**, 181 de **Necator**, 35 de **Strongyloides** y 54 de **H. nana**. El valor del coeficiente de correlación expresó un grado intenso de asociación en todas las series, con excepción de **Strongyloides**, donde se presentó asociación de menor grado. La coincidencia de las infecciones agrupadas cualitativamente en leves, moderadas e intensas, y expresadas en porcentaje, fue también muy alta.

La técnica de Beaver demostró ser de fácil ejecución, poco demorada y no sujeta a los errores del cálculo de la consistencia de las heces. No requiere vidriería o reactivos especiales y toma el mismo tiempo que un frotis directo de rutina. En este trabajo se encontró, además, que muchas infecciones positivas por el método de Beaver, pasaban desapercibidas en la técnica de dilución. El caso opuesto fue menos frecuente. Este defecto del método de dilución es especialmente acentuado cuando se investigan larvas de **Strongyloides**.

Teniendo en cuenta que el recuento de huevos de helmintos es un procedimiento valioso para el clínico, el epidemiólogo e indispensable en ensayos de antihelmínticos, se desea en carecer como conclusión final de este estudio una mayor difusión y un correcto aprecio del valor del procedimiento de Beaver en la actividad de laboratorios de salud pública, de investigación clínica y farmacológica.

REFERENCIAS

- AGUSTINE, D. L.; NAZMI, M.; HELMY, M., y MCGAVRAN, E. G., 1928. The ova-parasite ratio for **A. duodenale** and **A. lumbricoides**, *J. Parasitol.* 15: 45-51.
- BEAVER, P. C., 1949. Quantitative hookworm diagnosis by direct smear, *J. Parasite.* 35: 125-135.
- BEAVER, P. C. 1950. The Standardization of fecal smears for estimating egg production and worm burden, *J. Parasit.* 36: 451-456.
- BEAVER, P. C. y SODEMAN, W. A. 1952. Treatment of **Hymenolepis nana** (Dwarf Tapeworm) infection with Quinacrine Hydrochloride (Atebrin). *Jr. Trop. Med. & Hyg.*, 55: 97-99.
- BROWN, H. W. y CORT, W. W., 1928. The egg production of **A. lumbricoides**, *J. Parasitol.* 14: 88-90.
- BURRONWS, R. B., 1950. On the estimation of **Trichuris** worm bur-

- den in patients. J. Parasitol. 26: 227-231.
- FAUST, E. C.; BEAVER, P. C. y JUNG, R. C. 1962. Animal agents and vectors of human disease. Lea & Febiger, Philadelphia.
- MALDONADO, J. F., 1956. An evaluation of the standardized direct smear for egg-counting in parasitological work. Am J. Trop. Med. & Hyg. 5: 888-892.
- MELVIN, D. M., SADUN E. y HEIMLICH, R. 1956. Comparison of the direct smear and dilution egg counts in the quantitative determination of hookworm infections. Am. J. Hyg., 64: 139-148.
- STOLL, N. R. y HAUSCHEER, W. C., 1926. Concerning two options in dilution egg counting: Small drop displacement. Am. J. Hyg. 6: March Suppl. 136-145.