

KASMER: Vol. 4. N° 1, 1971.
Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Aplicación Cuantitativa de Algunas Técnicas de Concentración Usadas en el Diagnóstico Cualitativo de Parásitos Intestinales

(TESIS DOCTORAL) *

Leonor Chacín de Bonilla

**Profesora asistente IV de la Cá-
tedra de Parasitología,
Departamento de Medicina Tro-
pical y Microbiología,
Facultad de Medicina,
Universidad del Zulia,
Maracaibo, Venezuela.**

INTRODUCCION

Los procedimientos de concentración constituyen un complemento necesario del examen directo de las heces, en el diagnóstico de las parasitosis intestinales.

* Trabajo de investigación original presentado ante el Consejo de la Facultad de Medicina para optar al Título de Doctor en Ciencias Médicas.

Los objetivos de las técnicas de concentración son tres: 1) aumentar el número de quistes, trofozoítos, huevos o larvas en la preparación; 2) eliminar gran parte de los detritos y 3) presentar los organismos sin distorsión para facilitar su identificación. Todavía no contamos con una técnica ideal que cumpla con todos estos objetivos; sin embargo, algunos procedimientos que se han estudiado extensamente después de la Segunda Guerra Mundial, demuestran por análisis estadístico, su eficacia para identificar la presencia de especies parásitas.

En general, los métodos emplean algunas o todas las siguientes etapas: 1) flotación, para separar los parásitos de la masa de elementos densos; 2) sedimentación, para suprimir elementos livianos junto con el sobrenadante; 3) tamizaje, para eliminar los detritos de mayor tamaño. Según la etapa final que se seleccione, las técnicas de concentración se dividen en técnicas de flotación y técnicas de sedimentación. En ambos grupos el proceso se puede acelerar por centrifugación.

Cada método posee ventajas y desventajas.

La principal ventaja de la flotación es el notable enriquecimiento del número de huevos y de quistes de algunas especies en relación con la preparación directa. Entre las desventajas tenemos: a) el desconocimiento de la densidad de la mayoría de los huevos y quistes, por lo que se necesitarían varias soluciones con diferente densidad para que todos los elementos parasitarios floten; b) los huevos operculados y los huevos pesados como los de **Ascaris** y **Taenia** rara vez flotan; c) algunos quistes delicados y las larvas se distorsionan fácilmente; d) los trofozoítos se pierden totalmente y e) las grasas y aceite de algunas muestras flotan junto con los elementos parasitarios y dificultan el diagnóstico.

La sedimentación tiene las siguientes ventajas: a) se recupera gran número de huevos operculados y no operculados así como los quistes de algunas especies de protozoarios; b) las grasas, aceite y otros detritos se eliminan. Entre las desventajas podemos señalar: a) la recuperación de los quistes es generalmente pobre y por lo tanto, la identificación puede ser más difícil que con las técnicas de flotación; b) algunas técnicas usan solu-

ciones ácidas concentradas que aparentemente, afectan algunos huevos y distorsionan muchos quistes.

Se han reportado muchas técnicas de flotación, algunas de las cuales no se usan, mientras que otras están ampliamente difundidas.

Bass¹ describió un método de flotación simple con cloruro de sodio y lo consideró un procedimiento eficiente para la recuperación de huevos de helmintos. Más tarde, el mismo autor^{2,3} desarrolló una técnica de flotación por centrifugación usando cloruro de calcio, para el diagnóstico de ancilostomídeos.

Willis⁴ reportó un método práctico de concentración simple, empleando una solución saturada de cloruro de sodio para la flotación de huevos de helmintos, pero este método fracasó para concentrar quistes de protozoarios y ciertos tipos de huevos. Esta técnica fue adoptada por muchos laboratorios, en especial por aquellos dedicados al estudio de la incidencia de ancilostomídeos.

Lane^{5,6} describió una técnica de flotación por centrifugación usando solución saturada de cloruro de sodio, la cual es muy eficiente para concentrar la mayoría de los huevos de nematodos.

Khaustov⁷ recomendó una solución de sulfato de cobre con densidad de 1.200.

Faust y cols.^{8,9} después de ensayar varias soluciones de diferente densidad, observaron que una solución de sulfato de zinc de densidad 1.180, resultaba excelente para la mayoría de los quistes de protozoarios y huevos de helmintos.

Otto y cols.¹⁰ reportaron una técnica de flotación simple, empleando solución de sulfato de zinc con densidad de 1.180; ésta, es una de las mejores técnicas de flotación para ser usada en el medio rural, donde difícilmente se dispone de una centrífuga.

Baroody¹¹ modificó la técnica de Faust, usando mayor cantidad de heces y suspendiendo éstas en agua caliente, eliminando así la mayoría de las grasas antes de agregar la solución de sulfato de zinc.

Beaver¹² reportó una modificación de la técnica de Faust mediante el uso de un agitador eléctrico y advierte que esta técnica no es satisfactoria para demostrar huevos infecundos de **Ascaris**, trematodos y cestodos, y que no es aconsejable su empleo cuando hay exceso de grasas, aceite, bario y bismuto. Sin embargo, tiene muchas ventajas que hacen de este método el más empleado en los laboratorios que adoptan como rutina la combinación del examen directo y concentración por flotación.

Bayona¹³ modificó el método de flotación de Faust usando un portaobjetos para la obtención del material flotante, en lugar de asa bacteriológica.

Ferreira y Abreu, citado por Biagi y Portilla¹⁴, reportaron una modificación del método de Faust, mediante el uso de un embudo para la obtención del material flotante y solución de sulfato de zinc con densidad de 1.191.

Al-Talib¹⁵ empleó la flotación con sulfato de zinc y cloruro de metileno, esta última sustancia fue usada como solvente de las grasas.

Phillipson¹⁶ usó sulfato de magnesio en lugar de sulfato de zinc y logró la flotación de huevos de **Clonorchis** y **Opisthorchis**.

Se han ensayado procedimientos de sedimentación espontánea emulsionando las heces con varios líquidos como agua¹⁷, solución salina al 0.7%¹⁸, agua glicerinada al 0.5%¹⁹ y etanol al 10%. Estas técnicas son útiles, sobre todo para la concentración de huevos de helmintos, especialmente los de **Schistosoma**, **Clonorchis** y **Opisthorchis**.

Existe un número considerable de técnicas de sedimentación por centrifugación, las cuales sirven principalmente para concentrar huevos de helmintos y quistes de protozoarios.

Telemann²¹ obtuvo buenos resultados tratando las heces con ácido clorhídrico concentrado y éter. El ácido lo utilizó para disolver ciertas proteínas, jabones, mucinas, fosfatos y sales de calcio; y el éter, para disolver las grasas neutras, y liberar los ácidos grasos, para que el sedimento contenga principalmente, celulosa, fibras musculares y huevos de helmintos. La técnica

original aún se emplea en algunos laboratorios, pero se usan más otros métodos que utilizan menor concentración de ácido y menos éter. Otros métodos de sedimentación por centrifugación (los cuales no son más que modificaciones del método anterior) han sido descritos: Carles y Barthelmy²² usaron ácido cítrico y éter; Fulleborn²³ ácido clorhídrico al 50% y éter; De Rivas²⁴ ácido acético al 5% y éter; Weller y Dammin²⁵ ácido clorhídrico-éter-Tritón NE; Hunter y cols.²⁶ ácido clorhídrico-sulfato de sodio-éter-Tritón NE; Loughlin y Stoll²⁷ ácido clorhídrico-éter-xilol; Loughlin y Spitz²⁸ Calgon-éter-xilol.

Ritchie²⁹ se apartó de la rutina del ácido-éter y empleó la mezcla formalina-éter para concentrar tanto huevos, como quistes. Maldonado y cols.³⁰ modificaron esta técnica mediante el uso del Tritón NE.

Sapero y Lawless³¹ describieron una técnica de preservación para los quistes de protozoarios, usando la mezcla merthiolate-iodo-formol (MIF). Más tarde, Blagg y cols.³² reportaron un método de concentración (MIFC) usando la mezcla MIF. Santos y cols.³³ modificaron la técnica anterior usando el tyloxapol como detergente y mucolítico.

En resumen, los procedimientos de Telemann y de Willis representan la base sobre la cual se han desarrollado los diferentes sistemas de sedimentación y flotación que actualmente se usan.

Un buen examen parasitológico de material fecal debe combinar el examen directo con una técnica de concentración, que puede ser de flotación o de sedimentación. Del primer grupo el método del sulfato de zinc es el más usado; los que prefieren la sedimentación se inclinan generalmente por la técnica de la formalina-éter la cual presenta la ventaja de que se puede concentrar el material preservado en formol al 10%. Algunos autores se inclinan por el sulfato de sodio-Tritón NE-éter¹⁹.

Diversos autores han desarrollado métodos para el conteo de huevos de helmintos intestinales: Stoll³⁴, Stoll y Hauscheer³⁵, Fulleborn³⁶, Beaver^{37 38}, Frick³⁹, Mazzoti⁴⁰, Ritchie-Frick, citado por Beck y cols.⁴¹, Kato, citado por la World Health Organization⁴²,

Barbosa, citado por Katz y cols.⁴³ y Bell⁴⁴. Estos métodos son muy importantes ya que el recuento de huevos es un dato de valor clínico-epidemiológico y útil para el control terapéutico de antihelmínticos. Sin embargo, muchas veces se omite, pues hay que recurrir a procedimientos que alargan el tiempo de la investigación como el método de Stoll y Hauscheer, o la complican como en el caso de la técnica de Beaver por el empleo de fotómetros que no forman parte del equipo rutinario de los laboratorios de diagnóstico coprológico.

Es curioso que pocos autores hayan estudiado la posibilidad de aplicar cuantitativamente las más conocidas técnicas de concentración. Hood⁴⁵ utilizó la técnica del sulfato de zinc; Tigert y cols.⁴⁶ la técnica de Hunter y la de formalina-éter; Maldonado y Acosta-Matienzo³⁰ las técnicas de sulfato de sodio-Tritón NE-éter, ácido clorhídrico-sulfato de sodio-Tritón NE-éter, ácido clorhídrico-Tritón NE-éter, formalina-Tritón NE-éter y sedimentación simple por gravedad en agua glicerinada al 0.5%; Biagi y Portilla¹⁴ las técnicas de Faust, Bayona y Ferreira; Biagi y González⁴⁷ el método de Ferreira; Al-Talib¹⁵ las técnicas de Hunter, Fausi, MIFC, formalina-éter y sulfato de zinc-cloruro de metileno y Dunn⁴⁸ la técnica MIFC. Desafortunadamente estos estudios no fueron ampliados para evaluación estadística.

Si la aplicación cuantitativa de las técnicas de concentración tal como lo han intentado los mencionados autores, se logra con métodos simples que permitan fácil repetición en otros laboratorios, sería factible analizar numerosos datos en diferentes estudios comparativos que nos dirían si vale la pena insistir en buscar aplicaciones cuantitativas en métodos cualitativos.

El presente estudio es una nueva contribución en este sentido, y consiste en la comparación de los datos cuantitativos obtenidos en tres técnicas de sedimentación y en dos de flotación, con referencia a las cifras obtenidas por el método de Beaver, el cual fue tomado como patrón.

MATERIALES Y METODOS

Se examinaron cien muestras de heces obtenidas de pacientes del Charity Hospital (New Orleans, U.S.A.) y fueron procesadas dentro de una hora y 3 días después de obtenidas.

La calidad de las muestras fecales fueron registradas por clave, de acuerdo a la siguiente tabla usada por Beaver (no publicada).

CONSISTENCIA	COLOR	ELEMENTOS
1 Dura, resiste pun- ción.	1 Negro.	1 Pulpa y fibra ca- si puras.
2 Formadas, pueden ser punzadas.	2 Marrón oscuro.	2 Marcadamente fi- brosas.
3 Blandas, pueden ser cortadas.	3 Marrón.	3 Moderadas o es- casas fibras.
4 Pastosas, pueden ser modelables.	4 Marrón pálido	4 Heces coloidales.
5 Flojas, adaptables al recipiente.	5 Amarillas.	5 Heces con escaso mucus.
6 Diarreicas, fluidas.	6 Verdes.	6 Heces con mucho moco.
7 Acuosas.	7 Arcillosas.	7 Moco con escasas heces.
	8 Otros.	8 Otros (sangre, ba- rio, etc).

Se prepararon 3 frotis directos estandarizados de 2 mgs. de heces, según el método de Beaver^{37 38}. Se usó un fotómetro Weston modelo 614, previamente calibrado para medir la turbidez de la materia fecal. El procedimiento usado es el siguiente: se utiliza un bloque de madera de 18 mm. de espesor y un diámetro conveniente para adaptarlo a la ventana del fotómetro; se perfora un agujero circular de 16 mm. de diámetro en el centro del bloque. Este sirve como plataforma para el portaobjetos, sobre el cual se hace la preparación y provee una pantalla que reduce

la ventana al tamaño conveniente, para preparar y extender el frotis. Directamente sobre el orificio, se suspende una lámpara eléctrica, que se eleva o se baja para obtener lecturas arbitrarias de números enteros.

Cuando la lectura inicial del fotómetro se ajusta a 20, las lecturas de interferencia de 7.5, 10, 11.5, 13 y 16 corresponden a frotis fecales uniformes que contienen respectivamente 1/200, 1/300, 1/400, 1/500 y 1/1000 cc. de heces.

Para calibrar el aparato, se preparan soluciones de sulfato de sodio (2N) y cloruro de bario (1N) las cuales se mezclan separadamente con glicerina pura en la proporción de 2 partes de cada solución salina para 1 parte de glicerina. Cuando el cloruro de bario glicerinado y el sulfato de sodio glicerinado se combinan en las siguientes proporciones: 3:2, 2:3, 1:2, 1:3 y 1:6, se obtienen lecturas de turbidez equivalentes a los siguientes frotis fecales: 1/200 cc, 1/300 cc, 1/400 cc, 1/500 cc y 1/1000 cc respectivamente. Para obtener el número de huevos por cc. de muestra, el recuento se multiplica por el denominador, es decir, cuando el frotis contiene 1/500 cc el factor es 500, etc.

Para este estudio se prepararon suspensiones de 1/500 cc (2 mgs. de heces) y se tomaron las siguientes precauciones:

- 1) Empleo de portaobjetos limpios.
- 2) Preparaciones con material fecal puro y eliminación de otras partículas.
- 3) Recalibración del aparato antes de cada sesión.

Los frotis directos estandarizados fueron preparados y examinados el día de la toma, y se hicieron contajes de huevos de helmintos y quistes de protozoarios. Se calculó el promedio de tres contajes y se usó para computar el rendimiento relativo de cada una de las técnicas de concentración estudiadas.

Las técnicas de concentración usadas fueron:

- 1) **Sedimentación por centrifugación con sulfato de sodio-ácido clorhídrico-Tritón NE-éter según Hunter y cols.²⁶:**

Se colocaron 250 mgs. de heces en un tubo de ensayo y se emulsionaron en la siguiente mezcla: 2.5 cc de ácido clorhídrico al 40%, 2.5 cc de sulfato de sodio (densidad 1.08) y 0.06 cc de una solución de Tritón NE al 33%. El tubo se tapó y se agitó durante 10 segundos y el contenido se filtró a través de dos capas de gasa hacia un tubo de centrifuga de 15 ml; 5 cc de éter se usaron para lavar el tubo original y esta mezcla se pasó a través de la gasa. El tubo de centrifuga se tapó, el contenido fue agitado nuevamente durante 10 segundos, y se centrifugó a 2.200 r.p.m. durante 1 minuto. Luego se eliminó, con la ayuda de un aplicador, el tapón de detritos que se forma, y el sobrenadante se decantó. Se tomó una gota del sedimento y se realizó el recuento de elementos parasitarios.

2) Sedimentación por centrifugación con formalina-éter según Ritchie²⁹:

Se mezclaron 250 mgs. de heces con 10 cc de solución salina en un tubo de ensayo y la mezcla se pasó a través de dos capas de gasa a un tubo de centrifuga de 15 ml. Se centrifugó a 2.200 r.p.m. durante 1 minuto y se decantó el sobrenadante (el lavado con solución salina se repitió hasta obtener un sobrenadante claro). Al sedimento se agregaron 10 cc de formol al 10%, se mezcló y se dejó en reposo durante 5 minutos. Luego se agregaron 3 cc de éter, se tapó el tubo, se agitó por unos 10 segundos y se procedió a centrifugar a 2.200 r.p.m. durante un minuto. El tapón de detritos fue eliminado y el sobrenadante decantado. Se tomó una gota del sedimento y se realizó el conteo.

3) Sedimentación por centrifugación con formol-iodo-merthiolate (MIFC), según Blagg y cols.³²:

Para realizar esta técnica se preparó la solución MIF de acuerdo a Saper y Lawless³¹. Una solución MF fue preparada como sigue: 200 cc de merthiolate N° 99 (1:1000 Lilly), 25 cc de formol (USP), 5 cc de glicerina, 250 cc de agua destilada y solución de Lugol al 5%. La solución MIF se preparó inmediatamente antes de mezclarla con las heces, combinando la solución MF con la solución de Lugol al 5%.

Se colocaron 250 mgs. de heces en un tubo de ensayo al cual se le agregaron 9.4 cc de la solución MF y 0.6 cc de la solución de Lugol. Se emulsionó la muestra y se pasó la mezcla a través de dos capas de gasa a un tubo de centrifuga de 15 ml. Se agregaron 4 cc de éter al tubo, se agitó y se dejó en reposo durante 2 minutos. Luego se centrifugó a 2.200 r.p.m. por 1 minuto, se eliminó el tapón de detritos y se decantó el sobrenadante. A continuación se procedió a realizar el conteo en una gota del sedimento.

4) Flotación por centrifugación con sulfato de zinc, modificada por Beaver¹²:

Se agregaron 250 mgs. de heces a un tubo de ensayo (12 x 100 mm) y se mezclaron con 2 cc de agua usando un agitador eléctrico^{12 49}. Se añadió agua al tubo hasta casi llenarlo. Luego se centrifugó, a 2.200 r.p.m. durante un minuto. Se decantó el sobrenadante, se agregó 1 cc de solución de sulfato de zinc (densidad 1.180) al sedimento y se mezcló. En seguida se agregó más solución de sulfato de zinc hasta casi llenar el tubo y la mezcla se pasó a través de 2 capas de gasa a un vaso de cartón parafinado. El filtrado se colocó de nuevo en el tubo y se agregó más solución de sulfato de zinc hasta 3 mm aproximadamente por debajo de la boca del tubo. Se centrifugó a 2.200 r.p.m. por 1 minuto y se tomó una muestra del material flotante con asa bacteriológica, para ser estudiada.

5) Flotación por centrifugación con sulfato de zinc, modificada para este experimento como sigue:

Se colocaron 250 mgs. de heces en un tubo de ensayo (12 x 100 mm) y se mezclaron en 2 cc de agua con un agitador eléctrico; luego se agregó agua hasta llenar el tubo. El contenido fue centrifugado a 2.200 r.p.m. durante 1 minuto. El sobrenadante fluido se descartó y el sedimento se mezcló con la solución de sulfato de zinc (densidad 1.180) hasta llenar las 4/5 partes de la capacidad del tubo, la mezcla se pasó a través de 2 capas de gasa y se recogió en un vaso de cartón parafinado. El filtrado fue colocado de nuevo en el tubo; se agregó 1.5 cc de cloroformo (densidad 1.48) y la solución de sulfato de zinc hasta casi llenar el tubo. El contenido fue agitado durante 10

segundos y centrifugados a 2.200 r.p.m. por 1 minuto. El tiempo de agitación es crítico porque, si se prolonga demasiado, determinaría una exposición prolongada de los huevos y quistes al cloroformo, lo que acarrearía resultados pobres. Después de realizada la técnica se observan en el tubo las siguientes capas de abajo hacia arriba: a) el sedimento; b) el cloroformo; c) detritos; d) la solución de sulfato de zinc y e) el material flotante con los elementos parasitarios. Seguidamente, se tomó una muestra del material flotante con asa bacteriológica y se examinó.

Esencialmente, el mismo procedimiento descrito por el autor fue seguido en cada caso. Sin embargo, para establecer condiciones más uniformes para las técnicas de concentración usadas, se tomaron las siguientes medidas:

1) La velocidad y tiempo de centrifugación fueron de 2.200 r.p.m. exactamente por 1 minuto (en centrífuga clínica), sin incluir los tiempos de aceleración y desaceleración.

2) Se utilizó un agitador eléctrico para desmenuzar las heces.

3) Se usó la misma cantidad de heces (250 mgs.).

4) En los procedimientos de sedimentación, el sedimento obtenido fue diluido con 4 gotas de solución salina para facilitar su traslado. 0.05 cc del sedimento diluido (que representa aproximadamente la cuarta parte del sedimento) se llevó a un portaobjetos y se cubrió con una laminilla cuadrada de 22 mm. Luego se procedió al contaje de huevos y quistes.

5) En ambas técnicas de flotación con sulfato de zinc, los hallazgos registrados se basaron en los contajes de huevos o quistes del material tomado con asa bacteriológica de 6 mm de diámetro, que abarca la cuarta parte de la superficie de flotación de un tubo de ensayo de 12 x 100 mm.

En todas las técnicas se hizo el contaje en una sola preparación, ya que Maldonado y cols.³⁰ han probado que es impráctico e innecesario repetir los recuentos en los métodos de concentración.

El examen se realizó con objetivo de menor aumento (10X). El objetivo de mayor aumento (43X) se usó ocasionalmente para confirmar identificaciones dudosas de las formas parasitarias más pequeñas.

La presencia de material grasoso en ambas técnicas con sulfato de zinc, se registró de la siguiente manera: (+++) preparación muy grasosa; (++-) preparación grasosa; (+- -) preparación poco grasosa; (---) preparación no grasosa.

RESULTADOS

Se identificaron quistes de 3 especies de protozoarios (**Entamoeba coli**, **Endolimax nana** y **Giardia lamblia**) y huevos de 2 especies de helmintos (**Ascaris lumbricoides** y **Trichuris trichiura**). Las infecciones por huevos fecundos e infecundos de **Ascaris lumbricoides** se tabularon por separado. En la primera columna del Cuadro I, se señala el total de casos positivos de cada especie. Este total está formado por la suma de los casos positivos observados con las diferentes técnicas usadas. En las columnas correspondientes a cada una de estas técnicas se encuentra frente a cada especie, el porcentaje de infecciones que demostró dicha técnica. Se puede observar que el promedio de tres preparaciones directas logró elevar el porcentaje de eficacia a cifras muy altas en todas las especies. En el grupo de las concentraciones por sedimentación, solamente el **Trichuris trichiura** dejó de ser identificado en las tres técnicas: técnica de Hunter, 1 caso; F. E., 2 casos; M. I. F. C., 1 caso. La técnica de Hunter también dejó de identificar, como era de esperarse, dos de las infecciones por huevos infecundos de **Ascaris lumbricoides**. Las dos técnicas de flotación también fallaron en tres casos con este mismo parasitismo, y en dos casos de infecciones por tricocéfalo. En general, los resultados de todas las técnicas, demostraron una buena sensibilidad y no se dieron resultados sorpresivos.

Para medir la potencia de recuperación de elementos parasitarios de las diferentes técnicas y para cada una de las especies halladas, se determinó primero el índice de densidad parasitaria al examen directo de 2 mgs. de heces. Esta cifra, que es en realidad el promedio del número de huevos o quistes de

CUADRO I

Proporción de casos positivos diagnosticados por las diferentes técnicas en 100 pacientes.

ESPECIE	Total de casos positivos según el resultado de todas las técnicas	3 preparaciones directas normalizadas %	SEDIMENTACION				FLOTACION		
			Na ₂ SO ₄ %	Formol-éter %	MIFC %	ZnSO ₄ %	ZnSO ₄ -cloroformo %		
<u>E. coli</u>	21	95	100	100	100	100	100	100	
<u>E. nana</u>	14	100	100	100	100	100	100	100	
<u>G. lamblia</u>	13	100	100	100	100	100	100	100	
<u>A. lumbricoides</u>									
fecundas	30	93	100	100	100	100	100	100	
infecundas	11	100	82	100	100	91	82	82	
<u>T. trichiura</u>	34	91	97	94	97	94	100	100	

todos los casos del grupo, se utiliza como un factor numérico arbitrario que se usa en comparaciones estadísticamente válidas de diferentes grupos de población. Al comparar este promedio o índice con los respectivos promedios en cada una de las técnicas, se obtuvo un factor de recuperación dividiendo los promedios obtenidos en las correspondientes técnicas entre el índice de densidad parasitaria al examen directo. Estas cifras figuran en el Cuadro II y muestran claramente que en el grupo de protozoarios las dos técnicas de flotación, la de formalina-éter y M. I. F. C. dan cifras semejantes. Solamente la técnica de Hunter da cifras más bajas. En las dos helmintiasis estudiadas solamente la técnica de Ritchie y M. I. F. C. dieron índices altos de manera constante. En cambio, la técnica de Hunter y las dos de flotación presentaron, en el caso de huevos infecundos de **Ascaris lumbricoides**, índices por debajo de la unidad, lo cual se traduce en que el promedio de huevos contados al examen directo fue superior a los promedios de las concentraciones.

CUADRO II

Comparación de los factores de recuperación obtenidos para cada forma parasitaria según las diferentes técnicas.

ESPECIE	Índice de densidad parasitaria al examen directo de 2 mgs. de heces	FACTOR DE RECUPERACION AL EXAMEN POR CONCENTRACION				
		SEDIMENTACION			FLOTACION	
		Na ₂ SO ₄ %	Formol - éter %	MIFC %	ZnSO ₄ %	ZnSO ₄ - cloroforme %
<u>E. coli</u>	22	7,6	20,6	21,9	20,5	21,3
<u>E. nana</u>	688	3,0	5,7	5,9	8,2	7,8
<u>G. lamblia</u>	413	5,1	16,2	16,8	12,7	12,5
<u>A. lumbricoides</u>						
fecundos	33	3,2	6,2	7,4	6,6	11,8
infecundos	22	0,3	5,2	6,1	0,5	0,5
<u>T. trichiura</u>	36	4,2	5,6	7,1	9,3	9,3

Para estudiar la posible asociación entre los recuentos de huevos por el método del examen directo estandarizado (método de Beaver) y los obtenidos por las otras técnicas, se utilizaron ciertas categorías cualitativas de valor clínico y epidemiológico, anteriormente determinadas por algunos autores. En el caso de ascariasis, Cort, Otto y Spindler⁵⁰ consideraron tres categorías de severidad de la infección, a saber: ligera, moderada y severa que corresponden a menos de 10, de 10 a 50 y más de 50 adultos respectivamente. Esto, traducido a número de huevos en examen directo de 2 mgs. sería menos de 20, de 20 a 100 y por encima de 100 huevos.

En el caso de *Trichuris trichiura*, Manalang⁵¹, Correa y cols.⁵² y Burrows⁵³ han establecido las siguientes categorías: leve, menos de 40; moderada, de 40 a 160; y severa, más de 160 adultos. Como se ignoraban las cifras equivalentes en los métodos que se utilizaban por primera vez, se calcularon límites arbitrarios para las 3 categorías en cada técnica, utilizando los respectivos índices de recuperación y las cifras del método de Beaver. Las cifras adoptadas se ven en el Cuadro III. Estas categorías cualitativas permiten averiguar, en forma preliminar, la presencia o ausencia de asociación, empleando la prueba chi-cuadrado.

En las gráficas 1-10 se ilustra la obtención, caso por caso, de las cifras de coincidencia total y las de divergencia moderada o amplia, las cuales se resumen en el Cuadro IV. Para ascariasis, la coincidencia total osciló entre 53 y 57% y en tricocefalosis, desde 63 hasta 75%. No hubo casos de divergencias amplias.

La anterior prueba mide solamente si hay o no asociación entre dos variables descritas cualitativamente. Cuando tal asociación existe, es conveniente medir el grado de dicha asociación calculando el valor del coeficiente de correlación. Se practicó por consiguiente la comparación estadística de los datos cuantitativos calculando el coeficiente de correlación según el procedimiento aceptado corrientemente, en el cual X representa los recuentos en el frotis directo estandarizado y Y los recuentos en cada una de las técnicas de concentración aplicadas a la determinación cuantitativa. El valor del coeficiente de correla-

CUADRO III

Categorías de la intensidad parasitaria según el número de helmintos adultos y su equivalente numérico en el recuento de huevos en las heces para cada una de las técnicas.

ESPECIE	Categoría de la intensidad	Número equivalente de huevos para cada técnica					
		Directo	Hunter	Ritchie	MIFC	Faust I*	Faust II*
<u>A. lumbricoides</u>	Leve (<10 adultos)	< 20	< 84	< 124	< 148	< 172	< 238
	Moderada (10-50 adultos)	20-100	84-320	124-620	148-740	172-880	238-1190
	Severa (50 ó mas adultos)	> 100	> 320	> 620	> 740	> 880	> 1190
<u>I. trichiura</u>	Leve (<40 adultos)	< 10	< 42	< 56	< 71	< 93	< 93
	Moderada (40-160 adultos)	10-40	42-168	56-224	71-284	93-372	93-372
	Severa (160 ó mas adultos)	> 40	> 168	> 224	> 284	> 372	> 372

FAUST I* : Técnica de flotación de Faust, modificada por Beaver.

FAUST II* : Técnica de flotación con sulfato de zinc-cloroformo.

CUADRO IV

Correlación de los recuentos por el método de Beaver con los otros recuentos según la prueba chi-cuadrado.

	Hunter	Ritchie	MIFC	Faust I*	Faust II*
ASCARIASIS					
Coincidencia total	57 %	57 %	53 %	57 %	57 %
Divergencia moderada	43 %	43 %	47 %	43 %	43 %
Divergencia amplia	0	0	0	0	0
TRICOCEFALOSIS					
Coincidencia total	64 %	75 %	70 %	63 %	65 %
Divergencia moderada	36 %	25 %	30 %	37 %	35 %
Divergencia amplia	0	0	0	0	0

FAUST I* : Técnica de flotación de Faust, modificada por Beaver.

FAUST II* : Técnica de flotación con sulfato de zinc-cloroformo.

ción debe estar comprendido entre 0 y + 1 ó entre 0 y -1. Un coeficiente igual a 0 indica la ausencia de correlación; un coeficiente igual a 1 (sea positivo o negativo), indica correlación perfecta. Naturalmente, cuanto más se aproxima el valor del coeficiente a 1, tanto mayor es la intensidad de la asociación.

El Cuadro V resume los resultados obtenidos al calcular el coeficiente de correlación. En el grupo de las infecciones por protozoarios se observa que las técnicas de sedimentación dieron en general cifras considerables altas y las técnicas de flotación cifras un poco más bajas. En los datos sobre helmintiasis hay cifras un poco erráticas. Por ejemplo, dos técnicas semejantes como la de formalina-éter y MIFC dieron cifras diferentes e invertidas en el caso de huevos fecundos de **Ascaris lumbricoides** y de **Trichuris trichiura**. Las mismas diferencias se observan pero en forma menos acentuada en los resultados de las tres especies de protozoarios. El procedimiento de Hunter dio los índices más bajos y menos regulares, siendo casi negativo el resultado obtenido en la comparación de los recuentos de huevos de **Trichuris trichiura**. Las dos técnicas de flotación mostraron en cambio, cifras muy semejantes en los seis diferentes recuentos comparados y su valor positivo fue aceptablemente alto con excepción de los recuentos de huevos infecundos de **Ascaris lumbricoides**.

CUADRO V

Comparación del índice de correlación entre la técnica de recuento de Beaver y cada una de las técnicas empleadas.

ESPECIE	SEDIMENTACION			FLOTACION	
	Na ₂ SO ₄	Formol-éter	MIFC	ZnSO ₄	ZnSO ₄ - cloroformo
<u>E. coli</u>	0,86	0,62	0,74	0,56	0,56
<u>E. nana</u>	0,83	0,93	0,84	0,86	0,82
<u>G. lamblia</u>	0,89	0,86	0,92	0,64	0,60
<u>A. lumbricoides</u>					
fecundos	0,34	0,56	0,33	0,46	0,48
infecundos	0,63	0,78	0,68	0,58	0,60
<u>T. trichiura</u>	0,09	0,37	0,55	0,69	0,70

S		I	
X M	6	7	2
L	10	4	
	L	M	S
		Y	

GRAFICO 1

Relaciones chi-cuadrado de los recuentos de huevos fecundos de A. lumbricoides con las técnicas de Beaver (X) y Hunter (Y). 17 de 30 recuentos coinciden dando una correlación de 57%. Recuentos de divergencia moderada, 13 casos (43%).

S		I	
X M	5	9	I
L	8	6	
	L	M	S
		Y	

GRAFICO 2

Relaciones chi-cuadrado de los recuentos de huevos fecundos de A. lumbricoides con las técnicas de Beaver (X) y Ritchie (Y). 17 de 30 recuentos coinciden dando una correlación de 57%. Recuentos de divergencia moderada, 13 casos (43%).

S		I	
X M	5	9	I
L	7	7	
	L	M	S
		Y	

GRAFICO 3

Relaciones chi-cuadrado de los recuentos de huevos fecundos de A. lumbricoides con las técnicas de Beaver (X) y MICEF (Y). 16 de 30 recuentos coinciden dando una correlación de 53%. Recuentos de divergencia moderada, 14 casos (47%).

S		I	
X M	6	8	I
L	9	5	
	L	M	S
		Y	

GRAFICO 4

Relaciones chi-cuadrado de los recuentos de huevos fecundos de A. lumbricoides con las técnicas de Beaver (X) y Faust I (Y). 17 casos de 30 recuentos coinciden dando una correlación de 57%. Recuentos de divergencia moderada, 13 casos (43%).

S		1	
X M	6	8	1
L	9	5	
	L	M	S
		Y	

GRAFICO 5

Relaciones chi-cuadrado de los recuentos de huevos fecundos de *A. lumbricoides* con las técnicas de Beaver (X) y Faust II (Y). 17 de 30 recuentos coinciden dando una correlación de 57%. Recuentos de divergencia moderada, 13 casos (43%).

S		2	3
X M		4	4
L	14	6	
	L	M	S
		Y	

GRAFICO 6

Relaciones chi-cuadrado de los recuentos de huevos de *T. trichiura* con las técnicas de Beaver (X) y Hunter (Y). 21 de 33 recuentos coinciden dando una correlación de 64%. Recuentos de divergencia moderada, 12 casos (36%).

S		1	4
X M		6	2
L	14	5	
	L	M	S
		Y	

GRAFICO 7

Relaciones chi-cuadrado de los recuentos de huevos de *T. trichiura* con las técnicas de Beaver (X) y Ritchie (Y). 24 de 32 recuentos coinciden dando una correlación de 75%. Recuentos de divergencia moderada, 8 casos (25%).

S			5
X M		4	4
L	14	6	
	L	M	S
		Y	

GRAFICO 8

Relaciones chi-cuadrado de los recuentos de huevos de *T. trichiura* con las técnicas de Beaver (X) y MIFC (Y). 23 de 33 recuentos coinciden dando una correlación de 70%. Recuentos de divergencia moderada, 10 casos (30%).

S		1	4
X M	1	3	4
L	13	6	
	L	M	S
	Y		

GRAFICO 9

Relaciones chi-cuadrado de los recuentos de huevos de *T. trichiura* con las técnicas de Beaver (X) y Faust I (Y). 20 de 32 recuentos coinciden dando una correlación de 63%. Recuentos de divergencia moderada, 12 casos (37%).

S		1	4
X M	1	3	4
L	15	6	
	L	M	S
	Y		

GRAFICO 10

Relaciones chi-cuadrado de los recuentos de huevos de *T. trichiura* con las técnicas de Beaver (X) y Faust II (Y). 22 de 34 recuentos coinciden dando una correlación de 65%. Recuentos de divergencia moderada, 12 casos (35%).

En el presente estudio, no se observó relación entre las características macroscópicas de las heces y la recuperación de los elementos parasitarios con las técnicas de concentración.

DISCUSION

Antes de comentar los resultados obtenidos en este estudio, debe advertirse que no se tuvo como objetivo principal buscar un procedimiento sencillo para convertir en técnicas cuantitativas los métodos de concentración empleados. Falta todavía encontrar la simplificación que estimule estudios comparativos en grupos más diversos y más numerosos. El objetivo de este estudio fue comparar los datos numéricos obtenidos en cinco técnicas con relación al método de Beaver, lo cual pudo lograrse en forma satisfactoria desde varios ángulos, pero el número reducido de casos positivos disminuye el valor del significado estadístico de los in-

dices de correlación hallados. Grados de correlación moderadamente altos resultan estadísticamente no significativos si están basados en una muestra relativamente pequeña. Clínica y epidemiológicamente tiene primordial valor clasificar las helmintiasis en categorías de intensidad. El método gráfico, que se usó para medir las coincidencias y divergencias, muestra sin ninguna duda que existe una asociación que vale la pena medir, en grupos de población con mayor variedad de especies parasitarias y diversos grados de intensidad de la infección.

Desde el punto de vista de la sensibilidad y potencia de concentración de los métodos, tal como se observa en los Cuadros I y II, los resultados están de acuerdo con el valor y las desventajas que ya se han descrito para cada técnica. Las técnicas de flotación fracasaron en concentrar los huevos infecundos de **Ascaris**, lo que era de esperarse, ya que estos huevos son más pesados que el medio de flotación. Las cifras de recuperación que presenta el método de Hunter en esta serie son comparativamente bajas, particularmente en el caso de huevos infecundos de **Ascaris** hecho éste también observado por Maldonado, Acosta-Matienzo y Vélez-Herrera³⁰ y Al-Talib¹⁵. Según este último autor, es posible que el Tritón tenga algún efecto adverso, puesto que Maldonado y cols.³⁰ también reportaron pobre recuperación de huevos infecundos de **Ascaris** con otras técnicas, que incluyen el Tritón en su preparación (ácido clorhídrico-Tritón NE-éter, sulfato de sodio-Tritón NE-éter). La técnica de Ritchie y la MIFC resultaron ser las más efectivas para concentrar los huevos infecundos de **Ascaris**, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por Al-Talib¹⁵ y con Ridley y Hawgood⁵⁴ quienes señalaron la efectividad de la técnica de Ritchie para concentrar estos huevos. Con respecto a los huevos fecundos de **Ascaris** y los de **T. trichiura**, se nota que el poder de concentración fue superior en las técnicas de flotación (Cuadro II) y que las técnicas de sedimentación dejaron de diagnosticar ciertos casos de tricocefalosis (Cuadro I). Esto, podría tener relación con el hecho señalado por Burrows⁵⁷ de que el éter que se usa en algunas técnicas de sedimentación, aparentemente se lleva algunos huevos junto con los detritos, de tal manera que algunas infecciones ligeras pueden pasar desapercibidas. En el caso de los pro-

tozoarios se nota que la técnica de Ritchie y la MIFC dieron los mejores resultados. Los resultados de la técnica de la formalina-éter concuerdan con la opinión de Maldonado y cols.³⁰, Wykoff y Ritchie⁵⁵ y Ritchie y cols.⁵⁶, de que esta técnica es a veces tanto o más efectiva, para concentrar quistes, que la técnica por centrifugación con sulfato de zinc.

La adición de cloroformo, a la técnica con sulfato de zinc, se hizo con la idea de tratar de disolver los materiales grasos de las preparaciones, ya que Beaver¹² señaló que la técnica es insatisfactoria para heces ricas en dichos materiales. En este estudio se obtuvieron preparaciones con menos impurezas con el uso del cloroformo, el cual es un solvente de los materiales grasos y no interfiere con la toma del material flotante ya que es más pesado que la solución de sulfato de zinc y se deposita en el fondo del tubo. El comparar los resultados obtenidos con las dos técnicas de flotación se puede observar (Cuadro I y II) que de acuerdo a los cálculos estadísticos no hay diferencias numéricas de significado aun cuando resultaron preparaciones más limpias con el uso del cloroformo.

RESUMEN

Se examinaron muestras de heces de pacientes hospitalarios y cada muestra se procesó mediante las siguientes técnicas, para determinación cuantitativa de todos los elementos parasitarios observados: 1) tres preparaciones directas de 2 mgs.; 2) sedimentación por centrifugación con sulfato de sodio-ácido clorhídrico-Tritón NE-éter; 3) sedimentación por centrifugación con formalina-éter; 4) sedimentación por centrifugación con merthiolate-iodo-formol-éter; 5) flotación con sulfato de zinc; 6) flotación con sulfato de zinc y cloroformo. Todas las concentraciones partieron de una cantidad de 250 mgs. de heces y la lectura se hizo en el material tomado con asa bacteriológica una sola vez y en una gota del sedimento según la técnica. Por combinación de todos los datos positivos se observaron 21 casos de **E. coli**; 14 de **E. nana**; 13 de **G. lamblia**; 41 de **A. lumbricoides** y 34 de **T. trichiura**. La proporción de positivos fue alta en las diferentes técnicas. La potencia de éstas para concentrar los ele-

mentos parasitarios se obtuvo calculado el factor de recuperación, el cual resulta al dividir los promedios obtenidos en las correspondientes técnicas por el índice de densidad parasitaria al examen directo.

Se estudió la asociación existente entre los recuentos de elementos parasitarios por el método de Beaver y los obtenidos por las otras técnicas usando ciertas categorías cualitativas de severidad de la infección, determinadas anteriormente por algunos autores, las cuales permiten averiguar, utilizando la prueba del chi-cuadrado, la existencia o no de asociación. Para medir el grado de asociación se calculó el coeficiente de correlación.

Al añadir cloroformo a la técnica de Faust resultaron preparaciones más limpias, pero no se observaron diferencias cuantitativas al comparar las dos técnicas de flotación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 — BASS, C. C. 1906. Uncinariasis in Mississippi. *J. Am. Med. Assoc.* **47**: 185-191.
- 2 — BASS, C. C. 1909. Mild uncinariasis infection. *Arch. Intern. Med.*, **3**: 446-450.
- 3 — BASS, C. C. 1910. The diagnosis of hookworm infection with special reference to the examination of feces for eggs of intestinal parasites. *Arch. Diag.* **3**: 231-236.
- 4 — WILLIS, H. H. 1921. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Med. J. Australia* **8**: 375-376.
- 5 — LANE, C. 1922. The mass diagnosis of ankylostome infestation. Part. I. *Trans. R. Soc. Trop. Med. & Hyg.* **16**: 274-315.
- 6 — LANE, C. 1924. The mass diagnosis of ankylostome infestation. Parts II to III. *Trans. R. Soc. Trop. Med. & Hyg.* **17**: 407-436.
- 7 — KHAUSTOV, J. M. 1935. A concentration method for determination of protozoan cysts in feces. *Trans. Pasteur Inst. Epidemiol & Bacteriol in Leningrad, Sec. Parasit.* **2**: Russian text, pp. 215-218; English abstract, p. 236.
- 8 — FAUST, E. C., D'ANTONI, J. S., ODOM, V., MILLER, M. J., PERES, C., SAWITZ, W., THOMEN, L. F., TOBIE, J., and WALKER, J. H. 1938. A critical study of clinical laboratory

- technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. Am. J. Trop. Med., **18**: 169-183.
- 9 — FAUST, E. C., SAWITZ, W., TOBIE, S., ODOM, V., PERES, C. and LINCICOME, D. 1939. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. J. Parasit. **25**: 241-261.
 - 10 — OTTO, G. F., HEWITT, R. and STRAHAN, D. E. 1941. A simplified zinc sulfate levitation method of fecal examination for protozoan cysts and hookworm eggs. Am. J. Hyg. **33** (Sect D): 32-37.
 - 11 — BAROODY, B. J. 1946. Modification of the Faust method in the detection of cysts and ova, J. Lab. & Clin. Med. **31**: 1372-1374.
 - 12 — BEAVER, P. C. 1952. The detection and identification of some common nematode parasites of man. Am. J. Clin. Path. **22**: 481-494.
 - 13 — BAYONA, A. G. 1955. Tubo plástico en técnicas de flotación para investigar parásitos intestinales. Ciencia (Mex). **14**: 265-268.
 - 14 — BIAGI, F. and PORTILLA, J. 1957. Comparison of methods of examining stools for parasites. Am. J. Trop. Med. & Hyg. **6** (II): 906-911.
 - 15 — AL-TALIB, A. M. 1958. Procedures for recovery of helminth eggs and protozoan cysts. Thesis, Tulane University, 30 pp.
 - 16 — PHILLIPSON, R. F. 1962. Flotation technique for *Opisthorchis* and *Clonorchis* eggs. Trans. R. Soc. Trop. Med. & Hyg. **56**: 174.
 - 17 — FAUST, E. C. and MELENEY, H. E. 1924. Studies on schistosomiasis japonica. Am. J. Hyg. Monogr. Serv. N. 3, 339 pp.
 - 18 — TOMB, J. W. and HELMY, M. M. 1931. The diagnosis of intestinal schistosomiasis by sedimentation. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. **25**: 181-185.
 - 19 — FAUST, E. C., INGALLS, J. W. and SEE, J. K. 1946. The diagnosis of schistosomiasis japonica. II Technics for the recovery of the eggs *Schistosoma japonicum*. Am. J. Trop. Med., **26**: 559-584.
 - 20 — JAHNES, W. G., and Hodges, E. 1947. An improved method of sedimenting *Schistosoma japonicum* and other helminth ova, J. Parasit. **33**: 483-486.
 - 21 — TELEMANN, W. 1908. Eine Methode Zur Erleichterung der Auffindung von Parasiteniern in den Faeces. Deutsch. med. Wochenschr. **34**: 1510-1511.
 - 22 — CARLES, J. and BARTHELMY, G. 1917. Procède special d'homogenisation et de tamisage pour collecter les kystes dysen-

- teriques contenus dans les selles. C. R. Soc. Biol. Paris, **80**: 402.
- 23 — FULLEBORN, F. 1921. Uber der Nachweis der *S. Mansoni* — Eier in Stuhl. Arch. f. Schiffs. u. Tropeen — Hyg. **25**: 334-340.
- 24 — DE RIVAS, D. 1928. An efficient and rapid method of concentration for the detection of ova and cysts of intestinal parasites. Am. J. Trop. Med., **8**: 63-72.
- 25 — WELLER, T. H. and DAMMIN, G. J. 1945. An improved method of examination of feces for the diagnosis of intestinal schistosomiasis. Am. J. Clin. Path. **15**: 496-500.
- 26 — HUNTER, J. W., III, INGALLS, J. and COHEN, M. 1946. Comparison of methods for recovery of eggs of *Schistosoma japonicum* from feces. Am. J. Clin. Path. **16** (11): 721-724.
- 27 — LOUGHLIN, E. H. and STOLL, N. R. 1946. An efficient concentration method (AEX) for detecting helminth ova in feces (modification of the Telemann technic). Am. J. Trop. Med. **26**: 517-527.
- 28 — LOUGHLIN, E. H. and SPITZ, S. H. 1949. Diagnosis of helminthiasis. J. Am. Med. Assoc. **139**: 997-1000.
- 29 — RITCHIE, L. S. 1948. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Bull. U.S. Army Meed. Dept. **8**: 326.
- 30 — MALDONADO, J., ACOSTA-MATIENZO, J. and VELEZ-HERRERA F. 1954. Comparative value of fecal examination procedures in the diagnosis of helminth infections. Exper. Parasit. **3**: 403-416.
- 31 — SAPERO, J. J. and LAWLESS, D. K. 1953. The MIF stain-preservation technique for the identification of intestinal protozoa. Am. J. Trop. Med. & Hyg. **2**: 613-619.
- 32 — BLAGG, W., SCHLOEGEL, E. L., MANSOUR, N. S. and KHALAF, G. I. 1955. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. Am. J. Trop. Med. & Hyg. **4**: 23-28.
- 33 — SANTOS, A. T., BLAS, B. L. and PORTILLO, G. 1968. An improved technique for the quantitative determination of *Schistosoma japonicum* eggs in stools. Bull. W.H.O. **38** (5): 825-828.
- 34 — STOLL, N. R. 1923. Investigation on the control of hookworm disease. XV. An effective method of counting hookworm eggs in feces. Am. J. Hyg. **3**: 59-70.
- 35 — STOLL, N. R. and HAUSCHEER, W. C. 1926. Concerning two options in dilution egg counting: Small drop displacement. Am. J. Hyg. **6**: March Suppl. 134-145.
- 36 — FULLEBORN, F. 1927. Zur "Hamburger Deckglassauszählung" für Hakenwurmeier, Arch. Schiffs-u. Tropenhyg. **31**: 232-236.
- 37 — BEAVER, P. C. 1949. Quantitative hookworm diagnosis by direct smear. J. Parasit. **35**: 125-135.

- 38 — BEAVER, P. C. 1950. The standardization of fecal smears for estimating egg production and worm burden. *Am. J. Parasit.* **36**: 451-465.
- 39 — FRICK, L. P., MOON, A. P. y LIN, S.S. 1956. Parasitologic studies in the Far East. XV. A preliminary survey for parasitism in Southern Formosa. *Metabolism*. **5** (3): 302-308.
- 40 — MAZZOTTI, L., GONZALEZ, D. y HRANAKA, H. 1957. Aplicación de la balanza rápida de precisión en la cuenta de huevos de helmintos. *Rev. Inst. Salubr. Enf. Troj.*, **17**: 127-128.
- 41 — BECK, J. W., GARCIA LAVERDE, A., HARTOG, E. M. y THANER, A. L. 1965. Empleo de la técnica de recuento de huevos de Ritchie Frick en el estudio de la efectividad del antihelmíntico Monopar. *Rev. Fac. Med. Bogotá. Colombia*. **33**: 33-36.
- 42 — WORLD HEALTH ORGANIZATION, Regional Office for the Western Pacific, 1966. Report on First Regional Seminar on Parasitic Diseases: Helminthic Infections, 6-16 December 1965, Manila, Philippines.
- 43 — KATZ, N. and CHAIA, G. 1968. Coprological diagnosis of Schistosomiasis I. Evaluation of quantitative techniques. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. **10** (5): 295-298.
- 44 — BELL, D. R. 1963. A new method for counting *Schistosoma mansoni* eggs in faeces with special reference to Therapeutic trials. *Bull. W.H.O.* **29**: 525-530.
- 45 — HOOD, M. 1947. The present status of hookworm infection in Floride. *Am. J. Trop. Med.* **27** (4): 505-516.
- 46 — TIGGERT, W. D., HUNTER, G. W. III. and RITCHIE, L. S. 1952. Parasitological studies in the Far East. I Methods and Review of Japanese literature. *Jap. Med. Sc. & Biol.* **5**(5): 357-385.
- 47 — BIAGI, F., y GONZALEZ, C. 1959. Estudio de métodos para el recuento de huevos en materia fecal. *Rev. Lat. de Microb.* **2** (1): 51-62.
- 48 — DUNN, F. L. 1968. The TIF direct smear as an epidemiological tool. *Bull. World. Health. Org.* **39** (3): 439-449.
- 49 — BEAVER, P. C. 1956. Small electric mixer with expendable stirring rod. *Am. J. Clin. Path.* **26**: 1490-1491.
- 50 — CORT, W. W., OTTO, G. F. and SPINDLER, L. A. 1930. Investigations on *Ascaris lumbricoides* and the associated intestinal helminths of man in southwestern Virginia. *Am. J. Hyg.* **11** (1): 1-55.
- 51 — MANALANG, C., 1928. Trichuriasis: Relation between the number of ova per gram of formed stool and the number of female worms harbored by the host. *Philip. J. Sci.* **36**: 11-22.
- 52 — CORREA, M. A., and MELLONE, O. 1938. Estudio sobre a postura do *Trichuris trichiura*, A. Folha. *Med.* **19**: 137-139.
- 53 — BURROWS, R. B. 1950. On the estimation of *Trichuris* worm burdens in patients. *J. Parasit.* **36**. 227-231.

- 54 — RIDLEY, D. S., and HAWGOOD, B. C. 1955. The value of Formalin-ether concentration of faecal cysts and ova. *J. Clin. Path. Lond.* 9: 74-76.
- 55 — WYKOFF, D. E., and RITCHIE, L. S. 1952. Efficiency of the formalin-ether concentration technic. *J. Parasitol.* 38 (4) Sect. 2, Suppl., 15.
- 56 — RITCHIE, L. S., PAN, C., and HUNTER III, G. W. 1952. A comparison of the zinc sulfate and the MGL (formalin-ether) technics. *J. Parasitol.* 38 (4) Sect. 2, Suppl., 16.
- 57 — BURROWS, R. B. 1965. Microscopic diagnosis of the parasites of man. Yale University Press, New Haven and Condon. Pag: 33.