

302827



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

6
2ej

ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS TECNICAS
COPROPARASITOSCOPICAS DE CONCENTRACION:
"FAUST Y CHURUBUSCO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A ;
MARIA EUGENIA MIER ORTEGA

TESIS CON
FALLA DE COPIA

MEXICO, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Capítulo I	INTRODUCCION	
1.1	Planteamiento del problema	pág. 1
1.2	Objetivos	2
1.3	Hipótesis	2
Capítulo II	ANTECEDENTES	
2.1	Las enfermedades Parasitarias intestinales	3
2.2	Importancia Mundial y en México	7
2.3	Métodos Coproparasitológicos	8
	2.3.1 Métodos Directos	9
	2.3.2 Métodos de concentración	10
	2.3.3 Métodos de flotación	13
	2.3.4 Métodos de concentración por	17
	sedimentación.	
Capítulo III	PARTE EXPERIMENTAL	
3.1	Diagrama Experimental	24
3.2	Material, Reactivos y Equipo	25
	3.2.1 Material Biológico	25
	3.2.2 Material de Laboratorio	25
	3.2.3 Reactivos	26
	3.2.4 Equipo	26
	3.2.5 Preparación de Reactivos	27

3.3	Metodología	28
3.4	Análisis Estadístico	30
Capítulo IV	RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1	Resultados	31
4.2	Discusión	36
Capítulo V	CONCLUSIONES	39
	BIBLIOGRAFIA	40

I

INTRODUCCION

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad es necesario llevar a cabo exámenes copro-parasitológicos, con el fin de determinar el diagnóstico de enfermedades que pudieran ser de origen parasitario.

Para ello ha sido de gran interés idear nuevas técnicas copro-parasitológicas con el fin de mejorar cada vez más el estudio parasitológico, en muchos casos son técnicas semejantes que sólo tienen modificaciones en cuanto a densidades, cantidades, o bien en cuanto a soluciones, teniendo la misma base casi todas. Por ello se decidió plantear un método que permitiera utilizar sustancias que estuvieran a cualquier alcance y que disminuyera el tiempo de preparación y análisis de cada muestra; por el hecho de que en la Clínica Churubusco (ISSSTE) se maneja un gran volumen de muestras, dicho método se comparará con el método descrito por Faust y así se verá si tienen la misma eficacia y sensibilidad, para poder incluirlo como un método de sedimentación-flotación efectivo. Una de las finalidades del presente estudio es la de comparar la utilidad de un método introducido por la Clínica Churubusco en relación con el método de Faust, los hallazgos tienen su principal aplicación y trascendencia en servir de base para reconocer el método que permitirá una disminución en cuanto a tiempo y costo se refiere.

1.2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio comparativo de dos técnicas coproparasitoloscópicas; la técnica de Faust y la técnica "Churubusco" .

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Estudiar la eficacia de la técnica "Churubusco" en forma comparativa con la técnica de Faust, en el diagnóstico de protozoarios y helmintos.

2.- Analizar las ventajas y/o desventajas de la utilización de la técnica "Churubusco" en forma comparativa con el método de Faust.

1.3 HIPOTESIS

Si la técnica "Churubusco" sigue una estrategia que permite la concentración de quistes y huevecillos de parásitos en forma semejante al método de Faust. Entonces la técnica "Churubusco" puede ser utilizada en sustitución de la técnica de Faust.

II

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

2.1 LAS ENFERMEDADES PARASITARIAS INTESTINALES

Las parasitosis intestinales en nuestro medio son frecuentes y de tal importancia que representan uno de los problemas de salud pública más difíciles de controlar. Generalmente este tipo de padecimientos se tratan en forma individual y raramente se complementan por medio del estudio epidemiológico a nivel del núcleo familiar del paciente o de su comunidad para su control y vigilancia. (16)

La frecuencia de parasitosis intestinales en los habitantes de los países en vías de desarrollo es elevada y generalmente está en relación directa con las condiciones sanitarias y ambientales en que se desenvuelven los núcleos de población. (16)

Entre las enfermedades parasitarias, el síndrome diarréico ocupa los primeros lugares como causa de enfermedad y muerte en la población infantil y preescolar, particularmente en menores de un año de edad, alrededor de 45 a 50 % en las muertes de este grupo de edad. (16)

En el ámbito Internacional, se calcula que el síndrome diarréico es el responsable de por lo menos 5 millones de defunciones anuales en niños menores de 5 años. En México, las infecciones gastrointestinales, presentan un patrón de alta morbilidad y letalidad media en las poblaciones infantiles. (16)

En estadísticas nacionales las infecciones gastrointestina-

les ocupan el segundo lugar como causa de muerte después de las infecciones respiratorias agudas. (16)

Debido a que en la actualidad se le da una mayor importancia al cuidado de este tipo de infecciones, la tendencia en la morbilidad por diarreas que se observa en nuestro país ha disminuido, sin embargo, el estancamiento y/o deterioro de las condiciones de vida en la última década de los sectores de población de escasos recursos ha contribuido a que se tengan incrementos en la morbilidad, hasta 1977, año en que ocuparon el primer lugar en la morbilidad de padecimientos infecciosos. (16)

En el año de 1985 se notificaron 3'204.419 casos con una prevalencia del 16.3 % en los menores de 5 años y según la encuesta nacional sobre práctica y prevalencia de la terapia de rehidratación oral levantada en 1987, el 76.6 % de los niños entrevistados tenían antecedentes de haber padecido una infección gastrointestinal en algún momento de sus vidas y el 12.8 % la había presentado en los 15 días previos a la encuesta. (16)

Aunque la tasa de mortalidad en los niños menores de 5 años de edad ha disminuido en los países de la región Latinoamericana entre los años de 1960 y 1986, aún se encuentran 2 naciones (Bolivia y Haití) con tasas muy altas de mortalidad infantil, otras dos (Rep. Dominicana y Afganistán) con tasas altas y sólo 3 con tasas bajas (Suecia, Costa Rica y Cuba). (20)

México se encuentra en medio de los países con tasa media -

de mortalidad infantil, con 71 padecimientos por cada 100,000 niños menores de 5 años de edad. Las tasas más bajas de la región son comparables a las que tenía Suecia en 1960 y las más altas equivalen casi a la mitad de las que se observan en otros países como Afganistán. En un estudio de Kumate y col. se señala la correlación casi perfecta que existe entre la tasa de mortalidad por todas las causas y la tasa de mortalidad infantil por diarreas en México. (20)

Es válido suponer que el control de las enfermedades diarréicas podra repercutir favorablemente en la disminución de las tasas de mortalidad en la edad pediátrica. (20)

La amibiasis es la infección de los humanos causada por el protozooario Entamoeba histolytica que en México tiene una distribución amplia y es uno de los causantes más importantes de diarrea aguda. La forma luminal asintomática medida por la presencia de los quistes en las heces se ha registrado desde el 2.4 % en Ometepec, Guerrero a más del 55 % en Mixquic, D.F, aunque sólo un porcentaje pequeño de quienes tienen la infección intestinal desarrollaran amibiasis invasora cuyas formas clínicas principales son la disenteria y el absceso hepático. En la Ciudad de México del 0.8 % al 14 % de los casos infantiles de diarrea aguda que requirieron de hospitalización se encontraron asociados a Entamoeba histolytica. (10)

Las encuestas serológicas de anticuerpos indica aproximadamente que el 5.98 % de los individuos habían tenido invasión -

de la mucosa intestinal o del hígado, pero la amibiasis disenterica suele ser de 5 a 50 veces más frecuente que el absceso hepático amibiano principalmente en los niños. (10)

La amibiasis puede causar la muerte cuando se manifiesta como una colitis fulminante o un absceso hepático. (10)

La letalidad en los adultos se ha estimado alrededor de 0.2 % a 2 % , aunque en los niños con absceso hepático puede ser tan alta como 1.1 % a 26 % y además de ser una enfermedad potencialmente letal, tiene repercusiones socioeconómicas importantes. En México la amibiasis se ha asociado consistentemente con la pobreza y los niveles de saneamiento bajo, más que con el clima y considerando las tasas de morbilidad y mortalidad altas--causada por Entamoeba histolytica. (10)

La desnutrición es la enfermedad más prevalente en todo el mundo en desarrollo. Se estima que en América Latina y el Caribe casi 30 millones de niños están afectados de desnutrición energética-proteínica. Estudios longitudinales sobre la salud de niños mostraron que las enfermedades infecciosas frecuentemente preceden, alterando el desarrollo y estado nutricional y es una manera sugestiva de causa y efecto. (14)

La relación entre parasitismo intestinal y desnutrición se ha analizado a diferentes niveles: experimentación animal, estudios clínicos y trabajos con poblaciones. Los experimentos con animales han permitido establecer una relación directa entre infestación masiva por parásitos y desnutrición tal como -

lo demostraron Triphaty y col; concluyendo que una infección - por A. lumbricoides en niños puede producir desnutrición, si se asocia con una carga alta de parásitos y una ingesta calórica baja. (14)

Es un hecho que la frecuencia del parasitismo es un indicador del nivel de desarrollo de la comunidad. (8)

2.2 IMPORTANCIA MUNDIAL Y EN MEXICO

La importancia de las enfermedades parasitarias se remonta muchos siglos atrás ya que se tienen informes que en el año de 1600 A.C. se describió un helminto en el Papiro de Ebers, que seguramente puede corresponder a Taenia saginata. (15)

Se tienen datos del conocimiento sobre protozoarios, desde el siglo XVII con los descubrimientos de Leewenhoek (Giardia lamblia) con el microscopio, así la parasitología científica data del siglo XIX, en donde se describían métodos experimentales. Aún cuando han pasado siglos de este hallazgo y que ya se cuenta con una mayor evolución científica y tecnológica, las enfermedades parasitarias siguen siendo hoy como ayer, un problema de salud pública mundial y debido a esto hay una gran cantidad de organismos internacionales que le están dando una gran importancia al estudio, investigación y control de las parasitosis. (15)

Varios autores han hecho cálculos estimativos de prevalencia mundial de las parasitosis intestinales más frecuen--

tes. (23,29)

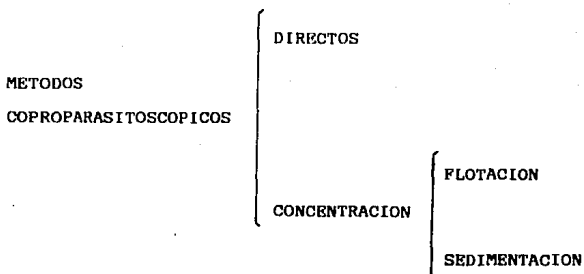
Recientemente, en 1979 se reporta que entre las enfermedades infecciosas más frecuentes en Africa, Asia y América Latina, las infecciones por *Ascaris* y *Uncinarias* ocupan el tercer y cuarto lugar respectivamente precedidas sólo por las enfermedades diarréicas y la tuberculosis; tricocefalosis, amibiasis y giardiasis quedan también incluidas dentro de las diez primeras enfermedades infecciosas de mayor prevalencia mundial. En nuestro país las helmintiasis intestinales afectan gran parte de la población en las zonas tropicales y templadas. (27) Como causa de muerte las enfermedades parasitarias tienen un papel importante, por ejemplo la amibiasis y la cisticercosis ocupan el 4º y 12º lugar respectivamente en estudios postmortem del Hospital General de México. (25)

Los daños a la salud ocasionados por los parásitos pueden ser desde mínimos hasta fatales. La repercusión económica que ejercen éstas enfermedades tanto en el individuo, la familia y la sociedad, se ven reflejadas en los gastos de atención médica, ausentismo o incapacidad para el desempeño de actividades productivas. (25)

2.3 MÉTODOS COPROPASITOSCÓPICOS.

El examen coproparasitológico es una metodología del laboratorio encaminada a la búsqueda e identificación de parásitos

presentes en las muestras fecales. Con este fin se pueden seguir ciertas estrategias que son: (3,9,15)



2.3.1 Métodos Directos

Consisten en la observación de las muestras fecales sin tratamiento alguno, más que el utilizar solución salina o un colgante.

Es una técnica recomendada para la observación de trofozoitos de protozoarios ya que el utilizar solución salina fisiológica no impide la observación de su movilidad, en el caso de utilizar lugol, sólo se pueden observar quistes o huevecillos.

El examen directo es empleado de rutina en laboratorios en donde la demanda o la falta de equipo no permite el empleo de las técnicas con mayor sensibilidad.

Incluyen el examen macroscópico de la muestra. Se monta en un portaobjetos dos preparaciones, en una se suspenden en solución isotónica de cloruro de sodio y la otra con solución de lugol diluido y se examinan al microscopio. Pueden hacerse también preparaciones fijadas y teñidas por técnicas especiales - como por ejemplo la técnica de la hematoxilina férrica y la coloración de Volat. (3,9,15)

2.3.2 Métodos de Concentración

Se pueden emplear tres tipos de métodos:

a) Sedimentación b) Flotación c) Sedimentación-flotación.

a) Sedimentación:

Se suspenden las heces en agua y se espera a que sedimente naturalmente o bien se acelera el proceso por centrifugación. Si en vez de agua se utiliza solución salina se pueden concentrar también trofozoitos de amibas. La sedimentación puede hacerse por dos procedimientos:

1) Sedimentación simple; es la suspensión en agua y la sedimentación espontánea. Se toman alrededor de 5 g de muestra, se suspenden en 200 ml de agua y se deja sedimentar por una hora; se decanta todo el líquido sobrenadante y se repite la operación, una o dos veces. El procedimiento es lento pero tiene la ventaja de que se puede usar una cantidad mayor de muestra (10

gramos) y además no hay deformación de algunos huevecillos delicados. (15)

ii) Sedimentación por centrifugación; se ponen alrededor de 2 gramos de muestra y se suspenden en 30 ml de agua. Se filtra a través de una manta de cielo recogiendo en tubos serológicos. Centrifugar a 1500-2000 r.p.m. durante dos minutos. Se vierte el sobrenadante y se le agrega agua para mezclarlo bien. Recentrifugar, por lo general 3 enjuagues son suficientes, cuando se desea fijar y preservar los elementos parasitarios, se puede dar un último lavado con formol y éter, con lo cual se eliminan también las grasas y aceites. Se pone una pequeña gota del sedimento en un portaobjetos con una gota de lugol al 2 %, se le pone el cubreobjetos y se observa al microscopio. (15)

b) Flotación:

Se utiliza un medio líquido más pesado que los quistes y huevecillos por lo cuál se logra que éstos suban a la superficie, después de la centrifugación de donde son recogidos en la película superficial. Originalmente se usó cloruro de sodio saturado que tiene una densidad de 1.2, pero los quistes y algunos huevecillos se contraen y se deforman. (15)

Actualmente se usa sulfato de zinc con una densidad de 1.180 peso específico.

c) Sedimentación-flotación:

Se suspenden 2 a 3 g de heces en 25 ml de agua. Se cuela por gasa o manta de cielo y se recibe en tubos serológicos y se centrifuga. Se repite 2 o 3 veces hasta la eliminación de partículas. Se decanta y se le agrega el medio de flotación. Se centrifuga y se deja reposar por 5 minutos, recogiendo la película superficial con asa. Se mezcla con una gota de lugol al 1 %. Se pone el cubreobjetos y se observa. El medio de flotación es el sulfato de zinc granular seco U.S.P. al 33 % - esta solución se ajusta a una densidad de 1.180 peso específico.

La evacuación normal consta casi exclusivamente de heces pero en enfermedades pueden encontrarse otros elementos como son: moco, sangre, residuos de tejido, de alimentos no digeridos, Ascaris, Enterobius, proglótidos de Taenia, entre otros. Por esta razón siempre deberá hacerse un exámen macroscópico de la muestra. La recolección de las muestras tiene un papel fundamental en el estudio y siempre debe hacerse en un recipiente limpio de boca ancha y tapanlo de inmediato, no debe estar contaminado con orina ni tener ningún tipo de contaminación externa. (15)

Las técnicas de concentración presentan mayor sensibilidad para el hallazgo de quistes o huevecillos de parásitos.

2.3.3 Métodos de Flotación

I.- Flotación de Willis:

Este método de flotación es adecuado, especialmente para - huevos de uncinarias, ascaris y tricocéfalos y a veces para - huevos de Tremátodos. Consiste en: una parte de materia fecal se diluye en una cantidad 20 veces mayor en solución saturada de cloruro de sodio (densidad de 1.130), se pasa por un tamiz, recogiénolo en un vaso que se llenara hasta el borde, pasados 15 minutos se toma con un asa de alambre de la capa superior y se coloca en el portaobjetos, examinándolo con el objetivo -- 10 x y con el 40 x .

II.- Flotación de Otto, Hewitt y Strahan:

Han simplificado la técnica de Faust, llevándola a cabo e- xactamente como el método de flotación de Willis, excepto que la solución de sulfato de zinc reemplaza la solución saturada de cloruro de sodio utilizada en el método de Willis.

Consideraron eficaz el no filtrar las muestras fecales, - siendo esto un factor que hacía el método más sencillo e igual de eficiente que el método original, además debido a los pocos utensilios que requiere, puede ser utilizado en laboratorios - en los que el personal y equipo son limitados. (11)

III.- Flotación de Bayona-González:

- a) Se emulsiona la muestra de heces con agua de la llave y se coloca la suspensión en un tubo de acetato de celulosa "Cellu-plastic", de 15 x 125 mm el cual se encuentra cerrado al calor por uno de sus extremos.
- b) Se centrifuga 2 minutos a media velocidad, se elimina el sobrenadante.
- c) Se agrega sulfato de zinc a una densidad de 1.180 Baumé, - hasta 2 cm abajo de la boca del tubo y se centrifuga 2 minutos a máxima velocidad.
- d) Se saca el tubo y haciendo una ligera presión en la parte media del tubo, se provoca que el líquido suba hasta la boca - del tubo, colectándose el velo al poner en contacto el portaobjetos y después un cubreobjetos.

Entre las ventajas del tubo plástico destaca el hecho de - brindar cuentas más abundantes y que el procedimiento es más - sencillo que sus similares. Además ahorra equipo, tiempo y su costo es mínimo ya que resulta menos frágil. Como desventaja - se tiene que el acetato de celulosa no resiste grandes presio- nes. Si se le deja con agua por algún tiempo se ablanda tanto que al someterlo a una centrifugación intensa se hincha peli- grosamente. El agua caliente lo deforma con rapidez. El lava- do debe hacerse con material que no lo raspe y evitando sustan- cias químicas que lo disuelvan o perjudiquen. (5)

IV.- Flotación de Caveness y Jensen (1955) :

Desarrollaron una modificación de la técnica de centrifugación-flotación para el aislamiento y concentración de nemátodos y sus huevos, a partir del suelo y tejido de plantas. Estos investigadores comunicaron que su método era muy superior y menos laborioso que la técnica de Baermann. (11)

V.- Flotación de Ferreira :

Es un procedimiento de concentración por centrifugación-flotación. Se realiza como fue descrito por Biagi y Portilla en 1957, suspendiendo las heces en agua 1:10 y usando 10 ml de esta suspensión para la centrifugación. Teóricamente, el número de huevos encontrados en la preparación debía dividirse entre 2.5 para deducir el número de huevos por gramo de heces, pero si no tiene la debida flotación o bien si se destruyen algunos huevos, la lectura no será correcta.

El procedimiento es como sigue: maneja el mismo procedimiento que Faust, sólo que en el último lavado, se le agregan 2 ml de solución de sulfato de zinc con una densidad de 1.191 Baumé (al 35 %) se agita y en este paso se coloca el embudo con la parte gruesa hacia abajo en el tubo de ensayo y la solución de sulfato de zinc se agrega hasta un centímetro abajo de la boca del tubo, así la materia fecal quedará en la parte alta del em

budo. (7)

VI.- Flotación de Lutz:

Aproximadamente de 2 a 4 g de heces se ponen en un recipiente y se homogeneizan con agua, se pasan por un tamiz y a este concentrado se le agrega solución salina, se deja reposar de 4 a 6 horas. Posteriormente se toma la película superior del tubo y se lee al microscopio. (13)

VII.- Técnica de centrifugación-flotación con sulfato de zinc:

- a) Se selecciona una pequeña muestra de heces (de preferencia formada) y se pone en un tubo de ensayo de 3 a 4 ml de agua.
- b) Se bate con un aplicador.
- c) Se le agrega agua hasta un cuarto antes de la parte alta del tubo y se centrifuga un minuto a 1600 r.p.m.
- d) Se tira el sobrenadante y se agita el residuo, tapando el tubo con el dedo.
- e) Se le agrega agua hasta la mitad del tubo y se agita.
- f) Se llena hasta un cuarto de la superficie y recentrifugar. Se repite este paso por 4, 5 o hasta 6 veces o hasta que el agua salga limpia.

- g) Se tira el sobrenadante y se refrigera.
- h) Se mezcla el sedimento hasta un cuarto de la superficie del tubo con sulfato de zinc y se vuelve a centrifugar.
- i) No se debe preparar más de 3 muestras a la vez para evitar que haya distorsión en la lectura de los huevos o parásitos.
- j) Del sobrenadante se toma, el menisco con un cubreobjetos y se observa al microscopio. (4,17)

VIII.- Flotación de Bass's Brine (Modificación de Willis)

Una cantidad de heces del tamaño de un chicharo se concentra en una solución de cloruro de sodio con una densidad de 1.200 Baumé. En una probeta se llena hasta el tope, con esta suspensión y con un portaobjetos se toma la superficie de esta solución, tapándolo por media hora, se invierte y se examina al microscopio. Este método se recomienda para Ascaris, Tricocefalos, larvas y quistes de Protozoarios. Los huevos de Tremátodos, los de Ascaris no fertilizados, huevos de Taenia, no flotan en este método. (30)

2.3.4 Métodos de concentración por sedimentación

I.- Ritchie (1948) :

Añade formol para fijar y preservar los elementos parasita-

rios y éter para separar las grasas y aceites. Se suspende la muestra en suficiente solución salina fisiológica, para dar 10 o 12 ml de suspensión, la cual se filtra a través de 2 capas de gasa quirúrgica húmeda en un tubo de centrifugación de 15 ml. La suspensión se centrifuga, el sobrenadante se decanta, y el sedimento se vuelve a suspender cuantas veces sea necesario, hasta que quede claro el sobrenadante. (22)

Después de una decantación adicional se mezcla el sedimento con 10 ml de formaldehído U.S.P. al 4 % y se deja reposar por 5 minutos, después de lo cual se añaden 3 ml de éter y se agita vigorosamente. Se centrifuga de nuevo a 1500 r.p.m. aproximadamente durante dos minutos y se decanta todo el sobrenadante. Se extiende un delgado frotis del sedimento en el portaobjetos, se le mezcla una gota de solución de yodo al 2 % y se monta la preparación con cubreobjetos para examinarla.

Este método produce un buen concentrado de quistes de protozoarios y huevos de helmintos que son satisfactorios para diagnóstico. (22)

II.- Sedimentación con Glycerol (Después Faust-Ingalls) :

Se mezclan cuidadosamente 10 g de heces en 10 a 20 veces su volumen con glicerol al 0.5 %. La suspensión se filtra por una gasa de 2 a 4 capas hacia un matraz de 250 a 500 ml y se deja reposar por una hora. (30)

Dos tercios del sobrenadante se decantan y al sedimento se le agrega la solución de glicerol, llenando el recipiente hasta el tope. Una vez asentado y decantado el sobrenadante se llena con la solución y se repite este paso 2 veces. La segunda sedimentación se reduce a tres cuartos de hora y una tercera a media hora. Cuando el sobrenadante se aclara se pone el portaobjetos y el cubreobjetos. Se analiza al microscopio. (30)

III.- Procedimiento con Fenol-Alcohol-Formaldehído :

Preparación de la solución F A F :

Solución No. 1

Cristales de fenol o fenol fundido	20g
Solución fisiológica	825ml

Solución No. 2

Alcohol etílico al 95 %	125ml
Formaldehído	50ml

Se mezclan las soluciones No.1 y No.2. Se usan tubos de 150 por 20 mm marcados a 12,13,14,15 ml. Se rotula para identificación y se agrega materia fecal del primer día hasta que alcance la marca de los 13 ml y se agita con aplicador de madera. Se agrega la muestra fecal del segundo día hasta alcanzar la -- marca de los 15 ml y se agita. De este concentrado se inicia la técnica de Faust de la manera ya conocida. (12)

IV.- Método de Centrifugación Acido-éter de Telemann :

Se mezclan en un mortero una muestra fecal del tamaño de un frijol con 5 ml de agua y agitar cuidadosamente, agregar 5 ml de solución de ácido clorhídrico al 25 % y se agita nuevamente. La mezcla se filtra con una gasa, hacia un tubo para centrifugar. Al filtrado se le agrega el mismo volumen de éter. Se mezclan ambas sustancias y se centrifuga por 10 minutos a - 2500 r.p.m. . Aparecen 4 capas: De arriba hacia abajo, éter, - desechos fecales, ácido clorhídrico, sedimento. Todos menos la última capa se decantan y el sedimento se coloca en un portaobjeto tapado con el cubreobjetos y se observa al microscopio. Esta técnica es apropiada para la concentración de huevos de - helmintos pero no para la de protozoarios. Ha sido modificada por Weller y Daming añadiendo unas gotas de Triton al 10 % --- como detergente. Se dice que es para producir una mejor concentración de huevos de Schistosoma.

Otra modificación se observa con Loughin y Stoll quienes - añadieron xileno y éter en lugar de solamente éter. Se dice - que es superior al método original de Telemann y se usa para - concentrar huevos de Ascaris no fertilizados y tricocéfalos. (30)

V.- Concentración con Merthiolate-Iodo y Formaldehído :

MIFC (Después Blag y cols.)

La materia fecal se bate con suspensión MIFC, se filtra sobre dos capas de gasa húmeda, hacia un tubo para centrifugar - de 15 ml. Se agregan 4 ml de éter y se cierra el tubo con una tapa de plástico y se agita. Se quita la tapa y el tubo se queda parado por 2 minutos y se centrifuga por un minuto a 1600 - r.p.m.. Aparecen 4 capas :

De abajo hacia arriba : sedimento que contiene ova, fluido de MIF, una capa de éter y residuos fecales. Se pipetea y se examina el sedimento. (30)

VI.- Método de Concentración de Bayer's :

A una suspensión de 1 o 2 g de heces en 10 ml de agua se le agregan 10 ml de la siguiente solución:

2 g de CuCl_2

2 g de $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$

100 ml de solución de formaldehído al 40 %

500 ml de agua alcanforada (10 ml de alcohol alcanforado con

190 ml de agua caliente)

400 ml de agua destilada

12 g de ácido acético glacial.

La mezcla se mueve y se permite que se sedimente por un corto tiempo. El sobrenadante se decanta en un embudo de separación. Se agregan de 10 a 15 ml de éter a la mezcla y se agita por 3 minutos. Se destapa de vez en cuando. Después el líquido sobrenadante se tira y se centrifuga por 2 minutos a 2500 r.p.m.. El sobrenadante se decanta y se examina el sedimento. Esta técnica es recomendada para quistes de protozoarios. (30)

A continuación se muestra un cuadro que indica los diferentes métodos coproparasitoscópicos, así como los géneros que se pueden encontrar en los métodos seleccionados para la investigación de helmintos y protozoarios.

CUADRO No.1

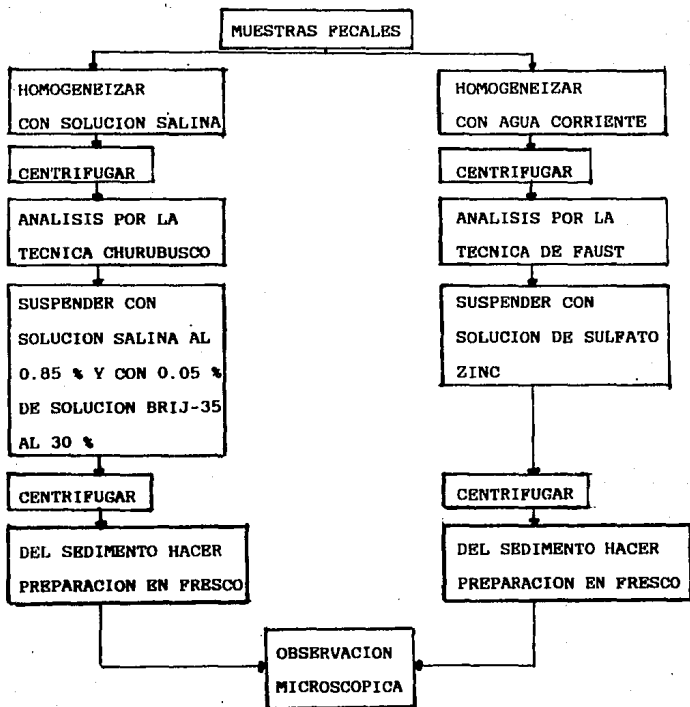
Especies que se pueden encontrar por los diferentes métodos de concentración, centrifugación y sedimentación-flotación.

<p><u>HUEVOS DE TREMATODOS</u></p> <p>*Sedimentación con agua simple.</p>	<p><u>HUEVOS DE SCHISTOSOMA</u></p> <p>*Centrifugación de Weller y - Daming.</p>
<p><u>HUEVOS DE HELMINTOS</u></p> <p>*Centrifugación de Ritchie.</p> <p>*Centrifugación de Telemann Acido-éter.</p> <p>*Centrifugación-flotación de Faust.</p>	<p><u>TRICOCEFALOS</u></p> <p>*Centrifugación de Loughin y Stöll.</p> <p>*Flotación de Willis.</p> <p>*Flotación de Bass's Brine.</p>
<p><u>HUEVOS DE UNCINARIA</u></p> <p>*Flotación de Willis.</p>	<p><u>HUEVOS DE TAENIA</u></p> <p>*Flotación de Willis.</p>
<p><u>QUISTES DE PROTOZOARIOS</u></p> <p>*Concentración de Bayer's</p> <p>*Centrifugación de Ritchie.</p> <p>*Flotación de Bass's Brine.</p> <p>*Centrifugación-flotación de Faust.</p>	<p><u>ASCARIDES</u></p> <p>*Flotación de Willis.</p> <p>*Flotación de Bass's Brine.</p> <p>*Centrifugación-flotación di- recta.</p>
<p><u>HUEVOS DE ASCARIS NO FERTILIZADOS</u></p> <p>*Centrifugación de Loughin y Stöll.</p>	<p><u>NEMATODOS</u></p> <p>*Centrifugación-flotación de Caveness y Jensen.</p>

III PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA EXPERIMENTAL



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 Material Biológico.

Se utilizaron 1031 muestras fecales que provenían de pacientes de 6 Clínicas del ISSSTE (Coyoacán, Ermita, - Ignacio Chávez, División del Norte y Talpan.)

El criterio de selección sólo fue el que contuvieran una cantidad suficiente de materia fecal para el estudio.

3.2.2 Material de Laboratorio.

Tubos de ensayo de vidrio de 13 x 100 mm

Portaobjetos de 26 x 76 mm

Cubreobjetos de 22 x 22 mm

Aplicadores de madera

Frascos de vidrio de boca ancha

Piseta de 250 ml

Pipetas de 1 ml

Densímetro

Matraz aforado de 100 ml

Matraz Erlenmeyer de 1000 ml

Embudo de vidrio de 7.5 cm de diámetro

Gradilla

Vaso de precipitado de 250 ml

Varilla de vidrio

Probeta de vidrio de 1000 ml

Gasa

3.2.3 Reactivos

Agente Humectante (Grado reactivo) (Technicon S.A.de
Brij-35 Sol.al 30 % C.V.)

Sulfato de Zinc (Q.P) (Productos Químicos
Monterrey S.A)

Cloruro de Sodio (Grado reactivo) (Merck México S.A)

Yodo cristaloides (Grado reactivo) (J.T.Baker)

Yoduro de Potasio (Grado reactivo) (J.T.Baker)

3.2.4 Equipo

Microscopio Optico (Carl Zeiss)

Centrifuga Clínica (International Centrifuge)

Modelo C-1

Balanza Analítica (P-115 Bosch)

3.2.5 Preparación de Reactivos

Solución de Sulfato de Zinc al 33 % con densidad 1.180: Pesar 330 g de sulfato de zinc y disolver en 1000 ml de agua destilada, agitar vigorosamente y ajustar la densidad a 1.180 Baumé.

Solución de Cloruro de Sodio al 0.85 % : Pesar 0.85 g de cloruro de sodio y disolver en 1000 ml de agua destilada en un matraz aforado.

Solución de lugol parasitológico : Pesar 5 g de yodo - cristaloides y 10 g de yoduro de potasio, colocar ambos en un matraz erlenmeyer, agregar 100 ml de agua destilada, y agitar vigorosamente para que se disuelva la mayor cantidad posible, una vez hecha la mezcla, guardar en - un frasco gotero de color ámbar.

Solución salina al 0.85 % con 0.05 % de la solución de Brij-35 al 30 % : Disolver 0.05 ml de la solución de Brij-35 al 30 % en 100 ml de solución salina al 0.85 % en un vaso de precipitados.

3.3 METODOLOGIA

" Técnica Churubusco " (Método modificado de Faust)

- 1.- Suspender la muestra en 5 a 10 ml de solución salina al 0.85 % .
- 2.- Centrifugar por 1 minuto a 1800-2000 r.p.m.
- 3.- Decantar el sobrenadante.
- 4.- Resuspender el sedimento en solución salina al 0.85 % con 0.05 % de la solución de Brij-35 al 30 % .
- 5.- Centrifugar por un minuto a 1800-2000 r.p.m.
- 6.- Desechar el sobrenadante.
- 7.- Agregar 2 o 3 gotas de la solución salina con Brij-35
- 8.- Con el sedimento hacer un frotis utilizando una gota de lugol.
- 9.- Observar al microscopio con el objetivo 10x .

" Técnica de Faust "

- 1.- Emulsionar una pequeña cantidad de heces (más o menos del tamaño de un guisante), en 10 veces su volúmen con agua corriente tibia.
- 2.- Filtrar 10 ml de la mezcla por una capa de gasa húmeda y recoger el líquido en un tubo de ensayo.
- 3.- Centrifugar el tubo a 2600 r.p.m. durante 45 a 60 segundos y decantar el sobrenadante. Añadir 2 o 3 ml de agua,

- resuspender el sedimento y llenar el tubo con agua.
- 4.- Repetir tres o cuatro veces hasta obtener un líquido sobrenadante claro.
 - 5.- Añadir al sedimento 3 o 4 ml de solución de sulfato de zinc al 33 % ajustada a una densidad de 1.180 Baumé.
 - 6.- Centrifugar durante 45 a 60 segundos a 2500 r.p.m. la suspensión.
 - 7.- Retirar la película de la parte superior del líquido con el aza y colocar sobre un portaobjetos con una gota de lugol y observar al microscopio con el objetivo de 40x.

Desarrollo de la metodología.

- 1.- Las muestras fecales seleccionadas fueron procesadas dentro de las 3 horas posteriores a su llegada al laboratorio.
- 2.- Tomar con el abatelenguas una muestra suficiente para realizar la técnica de Faust y homogeneizar con agua corriente en un frasco de vidrio de boca ancha.
- 3.- El homogeneizado obtenido se continua procesando siguiendo la técnica de Faust.
- 4.- Con un aplicador de madera tomar la muestra suficiente para el análisis con la técnica "Churubusco".
- 5.- La homogeneización se realiza en el mismo frasco donde se recibió la muestra y con solución salina en vez de agua

corriente como en el método de Faust.

3.4 ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico realizado fue la prueba de comparación de proporciones, usando la aproximación normal, con un valor de significancia del 5 % .

Se plantea como hipótesis nula (H_0) que no existen diferencias entre ambas técnicas utilizadas en el diagnóstico de las parasitosis, presentado en la tabla No.3, entonces :

Éxitos de la técnica de Faust en el diagnóstico de parásitos :

439

Éxitos de la técnica "Churubusco" en el diagnóstico de parásitos :

441

Tamaño de las muestras :

1031

$H_0 : p_1 - p_2 = 0$

Valor de la diferencia = 0

Nivel de significancia = 0

Distribución normal.

z_1	z	z_2	Índice de correlación
-3.420	-0.08	3.420	[-0.076 - 0.073]

Por lo que se acepta la hipótesis nula.

IV RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS

Se utilizaron 1031 muestras de pacientes de diferentes edades, sexo y posición económica, escogiéndose al azar cada muestra, dándole preferencia a las muestras que tuvieran una mayor consistencia.

A cada muestra se le realizaron 2 estudios coproparasitológicos, uno por la técnica de Faust y otro por la técnica "Churubusco", para comprobar si en realidad la técnica "Churubusco" tenía la misma sensibilidad que la técnica de Faust.

Como se puede ver en la Tabla No.1, los resultados obtenidos para los helmintos parásitos, fueron de un 3.29 % de Ascaris lumbricoides para la técnica "Churubusco" y de 3.49 % para la técnica de Faust, así mismo se obtuvo 1.35 % de muestras con Hymenolepis nana para la técnica "Churubusco" y un 1.26 % para la técnica de Faust.

El género Trichuris trichiura no se identificó en ambas metodologías.

En el caso de protozoarios parásitos (Tabla No.2), se observó que los géneros de E.coli y E.histolytica presentaron - 16.10 %, 16.48 %; 9.79 %, 10.08 % para las técnicas de "Churubusco" y de Faust respectivamente.

Para Endolimax nana, se encontró 16.87 % con la técnica "Churubusco" y un 17.45 % con la técnica de Faust.

Dentro de los porcentajes menores fueron los de Iodamoeba butschlii, ya que sólo fueron de 1.54 % y 1.45 % con "Churubusco" y Faust respectivamente.

Como se indica en la tabla No.2, se obtuvo 10.08 % de Giardia lamblia para la técnica "Churubusco" y 9.69 % en el método de Faust.

Al realizar la prueba de comparación de proporciones, usando la aproximación normal y con un valor de significancia del 5 %, se encontró que no existen diferencias significativas entre ambas técnicas empleadas.

En la tabla No.3 se muestra el total de muestras positivas empleando las técnicas de Faust y "Churubusco", teniendo un 42.58 % (439 muestras) para la técnica de Faust y 42.77 % (441 muestras) para la técnica "Churubusco" .

T A B L A 1
 PORCENTAJE DE MUESTRAS POSITIVAS EN EL DIAGNOSTICO
 DE HELMINTOS POR LOS METODOS :
 "Churubusco" y Faust.

HELMINTO	"Churubusco"	Faust
<u>Ascaris lumbricoides</u>	3.39 %	3.49 %
<u>Hymenolepis nana</u>	1.35 %	1.26 %
<u>Trichuris trichiura</u>	0.00 %	0.00 %

T A B L A 2

PORCENTAJE DE MUESTRAS POSITIVAS EN EL DIAGNOSTICO
DE PROTOZOARIOS POR LOS METODOS :
"Churubusco" y Faust.

PROTOZOARIOS	"Churubusco"	Faust
<u>E. coli</u>	16.10 %	15.48 %
<u>E. histolytica</u>	9.79 %	10.08 %
<u>Endolimax nana</u>	16.87 %	17.45 %
<u>Iodamoeba butschlii</u>	1.64 %	1.45 %
<u>Giardia lamblia</u>	10.08 %	9.69 %

T A B L A 3

TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS EMPLEANDO LAS TECNICAS
DE FAUST Y "CHURUBUSCO" AL ANALIZAR 1031 MUESTRAS

TECNICA	MUESTRAS POSITIVAS	PORCENTAJE
Faust	439	42.48 %
"Churubusco"	441	42.77 %

4.2 DISCUSION

El método "Churubusco", fue desarrollado debido a la necesidad de contar con un método coproparasitoscópico que pudiese ser utilizado en situaciones de desabasto de los reactivos indispensables para la realización de la técnica comúnmente empleada, que es el método de Faust.

La falta de reactivos para la realización del método de Faust, es una situación frecuente en los laboratorios del Sector Salud dado el gran volumen de muestras procesadas y el escaso presupuesto.

El método "Churubusco" representaba una alternativa viable para sustituir el método de Faust en las situaciones ya citadas dado que utiliza reactivos de fácil adquisición y bajo costo, siendo la base de este nuevo método una solución humectante tensoactiva llamada Brij-35.

Dadas las cualidades que ofrece el método "Churubusco" se procedió a evaluar su utilidad en forma comparativa con el método de Faust. Con este fin se evaluaron 1031 muestras fecales con ambas metodologías.

Los resultados mostrados en las tablas 1 y 2 dan idea de la semejanza en los porcentajes de hallazgo de estructuras parasitarias tanto de protozoarios como de helmintos parásitos.

Al realizar la prueba de comparación de proporciones, empleando la aproximación normal con un valor de significancia -

del 5 % se encontró que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambas metodologías. Por lo cual se puede decir que ambas técnicas presentan valores semejantes de sensibilidad en el diagnóstico de parasitosis intestinales.

Con esta nueva metodología se obtuvieron ciertas ventajas -- con respecto a la técnica de Faust :

- * Un ahorro en cuanto a tiempo de preparación de cada muestra ya que al preparar cada muestra por el método de Faust, se tarda aproximadamente el doble de tiempo que se tarda en preparar una muestra por el método "Churubusco" .
- * Con el método de Faust se llevan a cabo por lo menos 6 centrifugaciones y con el método "Churubusco" son solamente 2 veces las que se centrifuga cada muestra.
- * Disminución del costo por utilizar menos material que en el método de Faust.

Además si se toma en cuenta que con el método "Churubusco" -- la homogeneización se lleva a cabo en el mismo frasco donde se recoge la muestra, la cantidad de material utilizado disminuye considerablemente.

Conviene precisar, que el estudio tuvo que adaptarse a las -- circunstancias que fueron surgiendo como el cambio de grosor del poro para filtrar con el método de Faust, el tiempo de centrifugado, etc., que permitieron una mejor lectura comparativa con -- la obtenida por el método de Faust.

Si bien una de las finalidades del presente estudio fue la - de comparar la utilidad de un método introducido por la Clínica Churubusco, en relación con el método de Faust, los hallazgos - tienen su principal aplicación y trascendencia en servir de ba- se para reconocer el método que permitirá una disminución en -- cuanto a costo y tiempo se refiere.

Es necesario hacer énfasis en que los resultados se refie-- ren a una población de niños y adultos de diferentes edades y - sexo seleccionados por presentar en su orden de laboratorio "E- xamen Coproparasitoscópico", encontrándose desde uno hasta va- rios parásitos, así como resultados negativos.

V

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Los porcentajes de positividad en el diagnóstico coproparasitoscópico de protozoarios y helmintos parásitos por el método "Churubusco" y el método de Faust, presentan diferencias que no son estadísticamente significativas. Por lo tanto presentan semejante sensibilidad.
- 2.- El método "Churubusco" puede ser empleado en sustitución del método de Faust sin alterar en forma significativa - los resultados.
- 3.- Dado que el método "Churubusco" representa la inversión de menos tiempo para su realización y la simplificación de metodología, se recomienda la sustitución del empleo rutinario del método de Faust por el método "Churubusco".

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alves J., Rocha J. Parasitoses intestinais em crincan de -
0 a 11 meses de idade atendidas no Instituto Materno-In--
fantil de pernambuco. J. Pediatr. Rio de J. 55(3):199-202.
1983.
- 2.- Baez M. Manual de Parasitología Médica. Editorial La Pren--
sa Médica Mexicana. 2a. edición. México 1957.
- 3.- Bartlett M. y cols. Comparative evaluation of a modified--
Zinc Sulfate flotation technique. Journal of Clinical Mi--
crobiology. 7 (6) : 524-528. 1978.
- 4.- Bayona-González A. Plástico en Técnicas de Flotación para
investigar parásitos intestinales. Ciencias XIV. (11-12) -
265-268. 1955.
- 5.- Biagi F., González C. Estudio de métodos para el recuento
de huevos en materia fecal. Rev. Latinoamer. Microbiol. 2(1).
51-62. 1959.
- 6.- Biagi F., Portilla J. Comparison of methods of examining
stools for parasites. J. Trop. Med. 6 : 906-911. 1957.

- 7.- Botero D. Intestinal Parasitic Infectious. Antibiotics Chemoter. 30 : 1-19. 1985.
- 8.- Cable Raymund. An Illustrated Laboratory Manual of Parasitology. Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minn. 78-81. 1958.
- 9.- Calvo Fonseca R. Manual de Helminología y Protozoología con aplicación práctica en Cuba. Vol XX. 1943.
- 10.- Carrada-Bravo T. La amibiásis invasora como problema de salud pública. Bol. Med. Hosp. Infan. Méx. 46 (2) : 139-148. 1989.
- 11.- Carroll E., y cols. Comparative efficiency of various - techniques for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. The Journal of Parasitology. 241-262. 1939.
- 12.- Cruz-López A., Cortés R., Valerdi F., González E. Uso masivo de la coproparasitoscopia con FAP. Rev. Salud Pública Méx. 31 : 536-540. 1989.
- 13.- Chávez A., y cols. Estudio Comparativo dos métodos coprológicos de Lutz, Kato-Katz e Faust, modificado. Rev. Saude Publ. S. Paulo. 13 : 348-352. 1979.
- 14.- Domínguez-Vázquez A., Alzate-Sánchez A. Estado nutricional

- en niños menores de seis años y su asociación con malaria y parasitismo intestinal. Rev. Salud Pública Méx. 32 :52-63. 1990.
- 15.- Faust. E.C., y Russell P.F. Parasitología Clínica de Craig y Faust. UTEHA. 4a. Edición. México 1981.
- 16.- Garrido F., y cols. Mortalidad postneonatal por diarreas un estudio de casos y controles. Salud Pública Rev. 32 (3) . 261-268. 1990.
- 17.- Guinn E., M.T. The use of the Zinc Sulfate centrifugation-flotation technic as a routine diagnostic procedure. American Journal of clinical pathology. 31 : 87-88. 1958.
- 18.- Mancilla-Ramírez J., González Yunes R. Diarrea asociada a - Trichomonas hominis en un neonato. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 46 (9) : 623-625. 1989.
- 19.- Mitchel G.F. Problems specific to parasite vaccines. Parasitology. 98 : 19-28. 1989.
- 20.- Mota F., Pérez-Ricárdez M.L. El control de las enfermedades diarréicas en México y Latinoamérica. Bol. Med. Infant. Méx. 46 (5) : 360-365. 1989.

- 21.- Navarrete Cadena E., Trejo J., y cols. Exámen coproparasitoscópico. Utilidad y ventajas del uso de muestras preservadas. Rev. Med. IMSS. 20 : 565-571. 1982.
- 22.- Pagliusi V., y cols. Estudio comparativo entre os metodos - de Faust & Col. E de Ritchie, para exame parasitologico -- das fezes. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 22 (6) : 319-322. 1980.
- 23.- Peters W. Medical Aspects-Comments and discussion. Illin : Symposia of the British Soc. for parasitology. Blackwell, -- Oxford. 16. 1978.
- 24.- Prata A. Parasitología e Medicina Tropical. Rev. Mexicana de Parasitología. 1 (1) : 3-6. 1988.
- 25.- Ridaura S.C., y López C.E. Análisis de la mortalidad en el Hospital General de México. S.S.A. Rev. Med. Hosp. Gral. Méx. 1968.
- 26.- Robledo E., Navarrete F., Portilla J. Diagnóstico de Laboratorio de la amibiasis y otras protozoosis intestinales. Rev Mex. de Medicina. 39 (820) : 209-213. 1959.
- 27.- Sepúlveda B., Bautista O'Farril J., Gutiérrez G., y Pacheco

C.Historia Natural de la Amibiasis.Rev.Fac.Med.Méx.18(1):
5-31. 1975.

- 28.- Society Business.Procedures Suggested for use in examina-
tion of clinical specimes for parasitic infection.The Jour
nal of Parasitology. 63 (5) : 959-960. 1977.
- 29.- Støll N.R.This Wormy World.Journal Parasitol. 33 : 1-18.
1947.
- 30.- Swellengrebel Sterman.Animal Parasites in Man.Van Nostrand
Co.Inc.Canada. 1961.
- 31.- Tay J.,Salazar P.M.,De Hara I., y Bucio M.J. Frecuencia de
las helmintiasis en México.Rev.Inv.Salud Pública.Méx. 36 :
241-280. 1976.
- 32.- Telch J.,Vega Franco L.,Lara R.Parasitosis intestinal en
un Hospital de concentración.Bol.Med.Hosp.Infan.Méx.31(4)
733-745. 1974.
- 33.- Truant A.,Elliot S.,Kelly M.,Smith J.Comparison of Forma-
lin-Ethyl Ether sedimentation Formalin-Ethyl Acetate sedi-
mentation and Zinc Sulfate flotation techniques for detec-
tion of intestinal parasites.Journal of Clinical Microbio-
logy. 13 (5) : 882-884. 1981.

- 34.- Villar Ponce J.P., Alvarez-Chacón R., Pérez Amador N. Frecuencia de Parásitos intestinales en los niños afiliados a la Clínica Hospital No.68 del IMSS, Tulpetlac, Edo.de México. Rev.Salud Pública Méx. 20 : 93-97. 1978.
- 35.- Walsh J.A. & Warren K.S. Selective Primary Health Care. An interim.Strategy for disease control in developing countries. J.Med.New England. 301 : 967-974. 1979.
- 36.- World Health Organization. Intestinal protozoan and helminthic infections. Report of a WHO scientific group. Geneva : WHO. Teachn.Rep.Ser. 666. 1981.