

Coloración para hemoparásitos

FECHA: 30/Jul/2024

1. Objeto

Describir el procedimiento de la coloración y recuento de hemoparásitos con la técnica microscópica de Gota gruesa

2. Alcance

Aplica para la coloración para hemoparásitos que se realiza en la sede Centro y la sede Tesoro.
Los bacteriólogos son los responsables de realizar la coloración y la lectura.

3. Principio

El diagnóstico parasitológico de Malaria se realiza evidenciando el parásito o sus antígenos. La técnica de Gota Gruesa tiene por objeto concentrar la muestra para así facilitar el hallazgo de los hemoparásitos. La identificación de la especie infectante se basa en claves morfológicas de la apariencia (forma y tamaño) del parásito(s) en sangre periférica (extendido y gota gruesa) y de los glóbulos rojos infectados. Estas características no son absolutas. El diagnóstico final se basa en reunir una serie de hallazgos para revelar la especie o especies más probables.

La correcta identificación de la (s) especie (s) infectante (s) y el recuento (parásitos/ μ l de sangre) suministra información para:

- . Conducta adecuada.
- . Tratamiento acertado.

Tipo de muestra

Sangre total sin anticoagulante tomada del dedo índice o medio de la mano para los niños y adultos, para los bebés se debe tomar del primer dedo del pie (dedo gordo) o el talón.

Recogida y almacenamiento de la muestra

- . Limpiar con alcohol la cara lateral de la yema del dedo del paciente, presionando el pulpejo del dedo se punciona con la lanceta el borde lateral del dedo a la altura del nacimiento de la uña.
- . Presionar para extraer una gota de sangre la cual se limpia con algodón seco, luego se presiona para obtener una gota pequeña que se coloca en el tercio externo de la lámina porta objeto, con cuidado para no tocar la piel del paciente con la lámina, presionar nuevamente y obtener otra gota de sangre y colocarla a 0,5 cm de la anterior.
- Se repite el procedimiento para otra placa de gota gruesa y además una placa para extendido de sangre periférica.
- . Con el extremo de otra placa o un cubreobjetos, extender ambas gotas formando un pequeño rectángulo (forma de N) sin llegar a los bordes con cada una de ellas, con un diámetro aproximado de 1 cm x 1 cm .
- . Marcar la muestra.
- . Dejar secar a temperatura ambiente sobre superficie plana, colorear después de las dos horas de tomada la muestra.

Procedimiento**Materiales**

- . Solución A (Azul)
- . Solución B (Naranja)
- . Azul de Metileno Fosfatado
- . Solución Amortiguadora o Buffer PH 7,2
- . Lámina concava
- . Microscopio

Técnica de la Coloración

1. Deshemoglobinizar la muestra sumergiendo la placa en AZUL DE METILENO FOSFATADO con la muestra hacia abajo por 3 s, (o hasta que se impregne completamente la muestra) limpiar el exceso de colorante, filtrar el colorante cada 8 todos los días, mantener en frasco de boca ancha protegido de la luz. Descartar luego de quince días si es de poco uso.
2. preparar el colorante así: por cada placa usar 3 cm³ de BUFFER más una gota de SOLUCIÓN A y una gota de SOLUCIÓN B. los cuales deben estar en frascos protegidos de la luz, usar goteros que dispensen el mismo tamaño de gota.
3. Utilizar la cantidad de buffer necesaria para llenar el frasco de coloración sumerja la placa durante 10s y retírela con cuidado sin movimientos bruscos para evitar desprendimiento de la muestra.
4. Colocar la placa invertida con la muestra hacia abajo porque permite una deshemoglobinización completa por el alto peso molecular de la hemoglobina; en la lámina cóncava. Verter el COLORANTE (previamente preparado) justo debajo de la placa, sin que se formen burbujas.
5. La muestra debe quedar totalmente sumergida durante 10 min.
6. Retirar la muestra y secarla a temperatura ambiente.
7. Observar al microscopio con objetivo de 100x y aceite de inmersión.

Protocolo para el diagnóstico

- . Ficha epidemiológica.
- . Confirmar la positividad o negatividad empleando la gota gruesa.
- . Negatividad: ausencia de parásitos después de observar por lo menos 300 campos microscópicos en 100 X.
- . Positividad: confirmar especie; descartar una posible Infección Mixta. Duda en especie: realizar extendido
- . Recuento: se realiza en campos microscópicos los cuales deben tener entre 10 - 20 leucocitos por campo.

Recuento de parásitos

Formula: Mayor o igual a 100 formas parasitarias x 8000 leucocitos/ μ l)/200 leucocitos observados preferiblemente usar el recuento de leucocitos del paciente, ya que 8000 es el recuento leucocitario de una población normal.

Menor o igual a 10 formas parasitarias x 8000 leucocitos/ μ l)/500 leucocitos observados

preferiblemente usar el recuento de leucocitos del paciente, ya que 8000 es el recuento leucocitario de una población normal.

Nota: Cuando en 200 glóbulos blancos se observan menos de 10 parásitos se debe continuar el conteo hasta 500 glóbulos blancos.

Para altas parasitemias se debe utilizar la siguiente formula:

En parasitemias muy altas y durante el recuento se llega a 500 parásitos antes de observar los 200 glóbulos blancos, se suspende el recuento en 500 parásitos, se toma el valor de los leucocitos observados y este será el valor con el cual se realiza la división al despejar la formula:

(500 parásitos contados*8000 leucocitos/ μ l)/número de leucocitos observados

Plasmodium vivax: Se realiza un solo recuento de todas las formas parasitarias observadas (sexuada y asexuadas) en 200 glóbulos blancos

Recuento= (numero de formas parasitarias x 8000 o número de glóbulos blancos del paciente)/200=número de parásitos de plasmodium vivax/ mm³

Reporte: Positivo para Plasmodium vivax, # de Parásitos Plasmodium vivax/mm³.

Ejemplo:

Positivo Plasmodium vivax 5240 parásitos de Plasmodium vivax/mm³

Plasmodium falciparum:

Se realiza el recuento de formas asexuadas (trofozoitos) y se informa la presencia de formas sexuadas (gametocitos) y ezquizontes sin realizar el recuento de estos en 200 glóbulos blancos.

Recuento= (Número de formas asexuadas x 8000 o el recuento de glóbulos blancos del paciente)/200= # de formas asexuadas de plasmodium falciparum/mm³.

Reporte: Positivo Plasmodium falciparum # de formas asexuadas de Plasmodium falciparum/mm³.

Ejemplo:

Positivo Plasmodium falciparum 5240 formas asexuadas de Plasmodium falciparum/mm³ . Presencia de gametocitos y/o ezquizontes de plasmodium falciparum.

El diagnostico basado en el hallazgos de parasitemias muy bajas (2-3 parásitos en 500 campos) la gota gruesa se debe repetir en un periodo de 8 a 12 h.

Si después de observar la gota gruesa es negativa, se debe informar así: No se observan Hemoparásitos en la muestra analizada.

Malaria mixta:

Se llama así cuando se encuentran dos especies parasitarias en el mismo paciente, al examen microscópico en la malaria mixta se pueden dar dos situaciones:

* Plamodium vivax en todas sus formas mas gametocitos de Plasmodium falciparum.

Recuento: informe en un solo recuento todas las formas parasitarias de Plasmodium vivax y coloque la presencia de gametocitos de Plasmodium falciparum.

Ejemplo: Positivo malaria mixta 8520 parásitos de Plasmodium vivax/mm³, presencia de gametocitos de Plasmodium falciparum.

* Trofozoitos de Plasmodium falciparum mas las formas clásicas de Plasmodium vivax. Los anillos típicos de Plasmodium falciparum deben ser superiores al 40 % de todos los parásitos observados.

Recuento: Informe el recuento separado de ambas especies.

Ejemplo: Positivo malaria mixta 25800 formas asexuadas de Plasmodium falciparum/mm³ y 4240 parásitos de Plasmodium vivax/mm³

Recuento: Se cuentan las formas maduras típicas de Plasmodium vivax y las formas de anillos de Plasmodium falciparum hasta contar 100 parásitos, si los anillos sobrepasan los 40 parásitos se considera como una malaria mixta.

SERIADO:

Siempre que un paciente sea altamente sospechoso que reúna los criterios epidemiológicos debe hacerse gota gruesa cada día o cada veinticuatro horas según la gravedad hasta por 48 h .

Control post tratamiento se debe realizar al tercer y séptimo día.

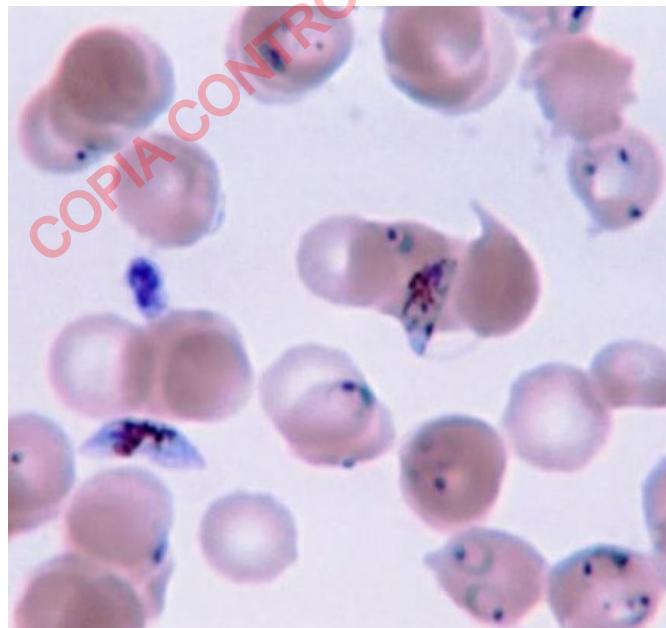
Mujer embarazada y niño menor a dos años se debe realizar a los dos, cuatro y séptimo día de iniciado el tratamiento y una gota gruesa al mes al niño y a la embarazada mensual hasta el post-parto.

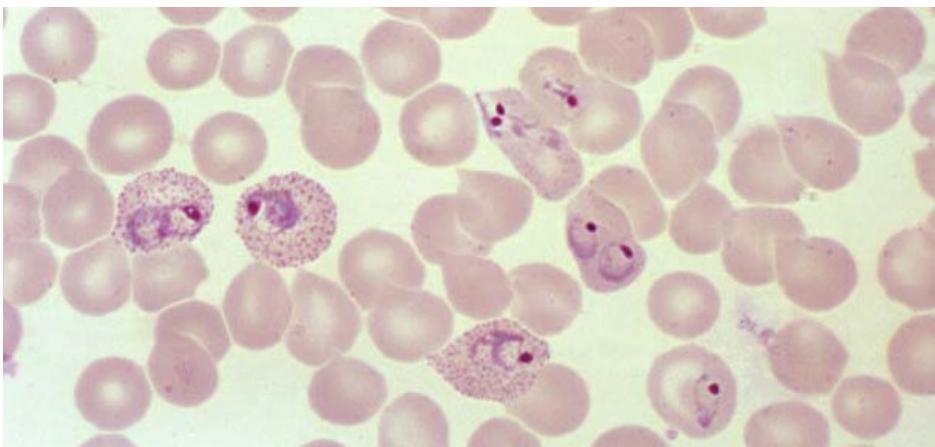
Los pacientes hospitalizados con complicaciones de malaria deben realizarse controles cada doce o veinticuatro horas según la gravedad.

4. CLAVES MORFOLOGICAS DIAGNOSTICO PARASITARIO EN MALARIA

Plasmodium falciparum	ESTADIOS EN SANGRE	APARIENCIA DEL GLÓBULO ROJO
	-Trofozoito joven: Común. citoplasma delicado, 1-2 pequeñas cromatinas, formas	Normal. Multiparasitismo más común en esta especie.
	-Trofozoito maduro : citoplasma compacto. Pigmento malárico.	Normal. Ocasionalmente granulaciones de Maurer
	-Esquizonte: Raro. 8-24 merozoitos.	
	-Gametocito: Común. Forma creciente. Microgametocito en forma de salchicha, macrogametocito frecuentemente más largos delgados.	-Normal. Ocasionalmente granulaciones de Maurer -Distorsionado por el parásito.
Plasmodium vivax	ESTADIOS EN SANGRE	APARIENCIA DEL GLÓBULO ROJO
	-Trofozoito joven: citoplasma agrandado con seudópodos ocasionales. 1 punto de cromatina. Ocasionalmente 2 cromatinas.	-Normal o ligeramente agrandado. Ocasionalmente multiparasitismo y granulaciones de Shüffner.
	-Trofozoito maduro: citoplasma grande y ameboide. Cromatina grande. Pigmento malárico amarillo	-Agrandado*, puede estar distorsionado. Finales granulaciones de Shüffner.
	-Esquizonte: grande, puede ocupar el GR. 12-24 merozoítos. Pigmento malárico en masa de color carmelito amarillento.	- Agrandado*, puede estar distorsionado. Finales granulaciones de Shüffner.
	-Gametocito: Redondo u ovalado. Puede llenar el glóbulo rojo. Cromatina grande periférica o central, laxa en el microgametocito. Pigmento carmelito disperso.	-Agrandado*, puede estar distorsionado: granulaciones de Shüffner. *: estadios que más agrandan el glóbulo rojo, dándole formas irregulares.
Plasmodium malariae	ESTADIOS EN SANGRE	APARIENCIA DEL GLÓBULO ROJO
	- Trofozoito joven: citoplasma robusto, compacto. 1 punto de cromatina grande.	- Normal o disminuido en un 25 %.
	-Trofozoito maduro: citoplasma compacto no ameboide. Cromatina grande. Ocasionalmente forma bandas. Pigmento malárico grueso y carmelito.	- Normal o disminuido en un 25 %. Eventualmente se observan granulaciones de Ziemann.
	-Esquizonte: 6-12 merozoítos con cromatinas grandes, ordenadas alrededor del pigmento malárico el cual se observa grueso de color carmelito oscuro. Ocasionalmente forma rosetas.	- Normal o disminuido en un 25 %. Se observan granulaciones de Ziemann.

	-Gametocito: Redondo u ovalado. Puede llenar el glóbulo rojo. Cromatina grande periférica o central, laxa en el microgametocito. Pigmento carmelito oscuro disperso.	- Normal o disminuido en un 25 %. Se observan granulaciones de Ziemann.
Plasmodium ovale	ESTADIOS EN SANGRE	APARIENCIA DEL GLÓBULO ROJO
	-Trofozoito joven: citoplasma robusto. 1 punto de cromatina grande.	- Normal o ligeramente agrandado. Redondo u ovalado. Ocasionalmente fimbriados y presencia de multiparasitismo. Granulaciones de James.
	-Trofozoíto maduro: citoplasma compacto. Cromatina grande. Presencia de pigmento malárico.	- Normal o agrandado, Redondo u ovalado Algunos glóbulos rojos fimbriados. Presencia de granulaciones de James.
	-Esquizonte: 6-14 merozoítos con núcleos grandes, ordenados alrededor del pigmento malárico el cual se observa de color carmelito oscuro.	- Normal o agrandado, Redondo u ovalado. Algunos glóbulos rojos fimbriados. Presencia de granulaciones de James.
	-Gametocito: Redondo u ovalado. Puede llenar el glóbulo rojo. Cromatina grande periférica o central, laxa en el microgametocito. Pigmento carmelito oscuro disperso.	- Normal o agrandado, Redondo u ovalado. Algunos glóbulos rojos fimbriados. Presencia de granulaciones de James





5. Bibliografía

Manual para la lectura de gota gruesa para malaria. Secretaría seccional de salud y protección social de Antioquia. Tercera edición año 2020.

Si este documento se encuentra impreso no se garantiza su vigencia, por lo tanto es copia NO CONTROLADA, la versión actual se encuentra en Isolución

VERSION	FECHA	RAZON DE LA ACTUALIZACION
02	27/Jul/2009	Se actualiza coloración,recuento y se anexa controles.
03	12/Ago/2010	Se modifican criterios de infección mixta.
04	15/Sep/2011	se modifica tiempos de coloración,recuento de parásitos,y criterios de infección mixta
04	11/Oct/2013	Se revisa el documento y no es necesario realizar cambios.
05	29/Oct/2013	Se adiciona criterio en las parasitemias bajas. Se adiciona el tiempo para realizar hemoparásitos seriados.
05	15/Ene/2015	Se revisa el instructivo y no es necesario modificarlo.
06	20/Ene/2016	Se adiciona fórmulas para el recuento. Se adiciona bibliografía.
07	12/Sep/2016	Se adapta según el manual para la lectura de gota gruesa para malaria de la gobernación de Antioquia.
07	18/Sep/2017	Se revisa y no se modifica.
07	13/Feb/2020	Se revisa y no se modifica.
07	04/Ene/2021	Se revisa y no se modifica.
07	17/Ene/2022	Se revisa y no se modifica.
07	16/Ene/2023	Se revisa y no se modifica.
07	04/Ene/2024	Se revisa y no se modifica
08	30/Jul/2024	Se modifica la técnica de la coloración.



ELABORO	REVISÓ	APROBO
Nombre: Yulime Andrea Monsalve Martínez Cargo: Dirección Fecha: 30/Jul/2024	Nombre: Xiomara Gutiérrez Cargo: Bacteriólogo(a) de Hematología Tesoro Fecha: 30/Jul/2024	Nombre: Carlos Gonzalo Robledo Restrepo Cargo: Director General Fecha: 31/Jul/2024