



EHAS
ENLACE HISPANO AMERICANO DE SALUD

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS SANGUÍNEAS PARA DIAGNÓSTICO DE MALARIA

Proyecto AECID 2012

*“Nuevos procedimientos para el diagnóstico de enfermedades olvidadas
utilizando tele-microscopía de bajo coste”.*



TABLA DE CONTENIDOS

TOMA DE LA MUESTRA

Material necesario
Toma de la muestra

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. PREPARACIÓN DE LA GOTA GRUESA

- A) Tinción de Giemsa para Gota Gruesa.
- B) Tinción de Field para Gota Gruesa.
- C) Observación en el Microscopio de la Gota Gruesa.

2. PREPARACIÓN DE LA EXTENSIÓN DE SANGRE

- A) Tinción de Giemsa para Extensión de Sangre.
- B) Tinción de Field para Extensión de Sangre.
- C) Observación en el Microscopio de la Extensión de Sangre.

FUENTES FIGURAS



PARÁSITO	MÉTODO (1º PASO)	MÉTODO (2ª PASO)	OBSERVACIONES
<i>Plasmodium</i>	Gota gruesa	Tinción de Giemsa	Para cada paciente o enfermo recomienda realizar tanto gota gruesa como extensión de sangre periférica.
		Tinción de Field	
	Extensión de sangre	Tinción de Giemsa	
		Tinción de Field	

TOMA DE LA MUESTRA DE SANGRE

MATERIAL NECESARIO

- Lanceta.
- Algodón.
- Alcohol 70°.
- Portaobjetos.

TOMA DE LA MUESTRA

Para el diagnóstico de malaria, las muestras de sangre deben extraerse cuando el paciente presenta **fiebre** (de otro modo será más difícil lograr un diagnóstico correcto).

Las muestras de sangre pueden obtenerse a través de una vena y recogerse en un tubo con anticoagulante EDTA, o simplemente pinchando un **dedo con una lanceta** como se describe a continuación. Recuerde que en este caso **la preparación de la muestra se debe realizar inmediatamente tras la toma:**

- Tomar la mano izquierda del paciente con la palma de la mano hacia arriba y limpiar la yema del tercer dedo con un algodón empapado en alcohol al 70%. Si se trata de un niño, puede hacerse la toma en el talón.
- Secar el dedo con un algodón limpio y seco mientras se sostiene de forma enérgica.
- Con una **lanceta estéril** pinchar la yema del dedo de forma rápida. La primera gota de sangre que salga debe secarse con un algodón limpio y seco.
- Obtener una nueva gota de sangre presionando ligeramente el dedo y depositarla sobre un portaobjetos limpio y libre de grasa.
- Una vez en el portaobjetos, la manera de proceder será diferente según la preparación seleccionada como se indica en el siguiente punto.

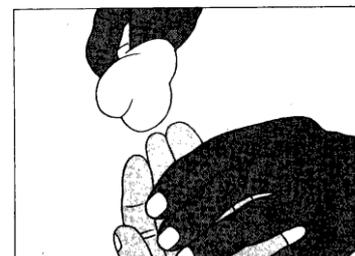
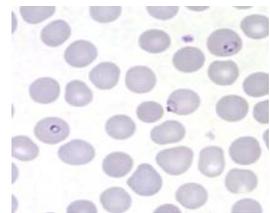
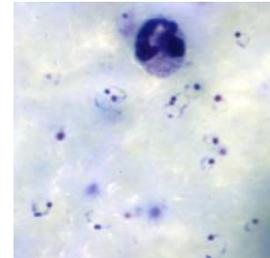


Figura 1

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se pueden realizar dos tipos de preparaciones para el diagnóstico de esta enfermedad:

- **Gota gruesa.** La gota gruesa es hasta 20 veces más densa que la extensión y, por ello, más sensible (varias capas de células sanguíneas depositadas sobre un portaobjetos). Los parásitos se observan libres, extracelulares ya que los hematíes se rompen durante el procesamiento.
- **Extensión de sangre:** Consiste en una extensión fina de la sangre sobre un portaobjetos (una sola capa de células). En ella, los parásitos (*Plasmodium*) se observan en el interior de los hematíes

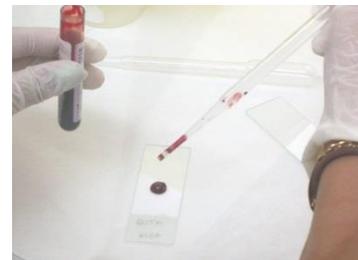


Figuras 2 (superior) y 3.

3. PREPARACIÓN DE LA GOTA GRUESA

Como se ha mencionado anteriormente, consiste en la visualización microscópica de una gruesa capa de sangre que se teñirá pero que **NO SE FIJA PREVIAMENTE.**

- Dispensar una gota de sangre sobre un portaobjetos limpio y extenderla ligeramente sobre la superficie del mismo para que no quede excesivamente gruesa (lo suficiente para que pueda leerse a su través la letra impresa de un periódico).
- Realizar movimientos circulares sobre la gota utilizando la esquina de otro portaobjetos para desfibrinar la gota de sangre como muestra la imagen.
- Dejar secar completamente a temperatura ambiente. En situaciones de urgencia puede acelerarse el secado por agitación o calor suave, pero evitando que la preparación quede fijada por el exceso de calor.
- Una vez preparada la gota, puede teñirse mediante tinción de Giemsa o mediante tinción de Field.



A) Tinción de Giemsa para Gota Gruesa

1. Material necesario: Agua y Giemsa.
2. Teñir la preparación cubriéndola con **GIEMSA** al 10% (diluir el colorante 1/10 en agua) durante 20 minutos.
3. Pasado este tiempo, lavar la preparación agitándola delicadamente **en el interior de una cubeta con AGUA**.
4. Dejar secar la preparación en posición vertical y, una vez seca, observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100x).



B) Tinción de Field para Gota Gruesa

1. Material necesario: Agua y 2 colorantes (Field A -COLOR AZUL- y Field B -COLOR NARANJA-, dispuestos cada uno de ellos en una cubeta o recipiente de tinción).
2. Sumergir la preparación en la cubeta con **FIELD A** durante **3 segundos**.
3. Lavar la preparación introduciéndola en una cubeta con **AGUA** del grifo durante **3 segundos**, suavemente y sin agitar.
4. Sumergir la preparación en la cubeta con **FIELD B** (sin diluir) durante **3 segundos**.
5. Lavar la preparación en una cubeta con **AGUA** del grifo durante **3 segundos**.
6. Dejar secar la preparación en posición vertical y, una vez seca, observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100x).

C) Observación en el Microscopio de la Gota Gruesa

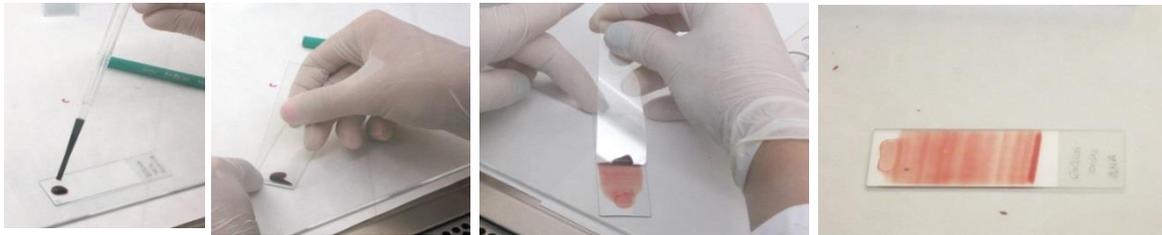
Las formas parasitarias deben distinguirse de los restos de hematíes, leucocitos y de los artefactos que hayan podido producirse durante el procedimiento. Se observarán 3 componentes del parásito:

- Citoplasma (teñido de AZUL).
- Cromatina (teñida de ROJO O VIOLETA).
- Gránulos de pigmento malárico (teñido de MARRÓN, NEGRO O AMARILLO).

4. PREPARACIÓN DE LA EXTENSIÓN DE SANGRE

Es una técnica más rápida que la gota gruesa y con la que se altera menos la morfología del parásito.

- Depositar una pequeña gota de sangre en un extremo de un portaobjetos limpio.
- **Extender la gota inmediatamente** con la ayuda de otro portaobjetos (manteniendo entre ambos un ángulo de unos 45°).
- Secar rápidamente la preparación agitándola manualmente para obtener una distribución homogénea de los hematíes.
- Una vez preparada la extensión, puede teñirse mediante tinción de Giemsa o mediante tinción de Field como se explica a continuación.



D) Tinción de Giemsa para Extensión de Sangre

1. Material necesario: Mechero de gas/alcohol o Metanol, agua y Giemsa.
2. Antes de teñir hay que **fijar la extensión** con **CALOR** o con **METANOL** durante, como máximo, 1 minuto.
3. Inclinar levemente el portaobjetos para que caiga el metanol.
4. Cubrir la extensión con **GIEMSA** al 10% durante **30 minutos**.
5. Pasado este tiempo, se **lava** la preparación sumergiéndola en una cubeta con **AGUA** del grifo agitándola fuertemente durante 3 segundos.





E) Tinción de Field para Extensión de Sangre

En la tinción de Field de las extensiones de sangre periférica son fundamentales los **VOLÚMENES** a utilizar:

1. Antes de teñir hay que **fijar la extensión** con CALOR o con METANOL durante, como máximo, 1 minuto.
2. Decantar el metanol sin lavar.
3. Cubrir el portaobjetos con **1 volumen** (ej, 1ml.) de **FIELD B diluido a 1/5**, en agua destilada o del grifo a ser posible tamponada a pH 7,2.
4. Inmediatamente se cubre el portaobjetos con el **mismo volumen (ej 1 ml) de FIELD A, se homogenizan** bien los 2 colorantes y se deja durante 1-2 minutos.
5. Pasado este tiempo, se **lava** la preparación sumergiéndola en una cubeta con **AGUA** del grifo agitándola fuertemente durante 3 segundos para quitar el exceso de colorante y los artefactos que hayan podido quedarse adheridos a la muestra.

F) Observación en el Microscopio de la Extensión de Sangre

Es necesario examinar numerosos campos microscópicos antes de realizar el diagnóstico. Como norma general se deben revisar un mínimo de 100 a 150 campos o unos 10 minutos por cada preparación.

Para la identificación de malaria deben observarse:

- Morfología de los parásitos que, además, nos permitirá determinar el estadio del ciclo vital en el que se encuentran (trofozoíto, esquizonte..).
- Tamaño de los hematíes parasitados (en relación a los no parasitados).
- Presencia de punteado, granulaciones y pigmento malárico en el interior de los hematíes.

La detección de estos parásitos debe acompañarse de un recuento semicuantitativo de los mismos (parasitemia), en el que se informa el número de hematíes parasitados por cada 100 glóbulos rojos:

$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{promedio hematíes parasitados por campo}}{\text{promedio de hematíes totales por campo}} \times 100$.

En el siguiente enlace pueden observarse imágenes de las diferentes especies de *Plasmodium*:

<http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html>

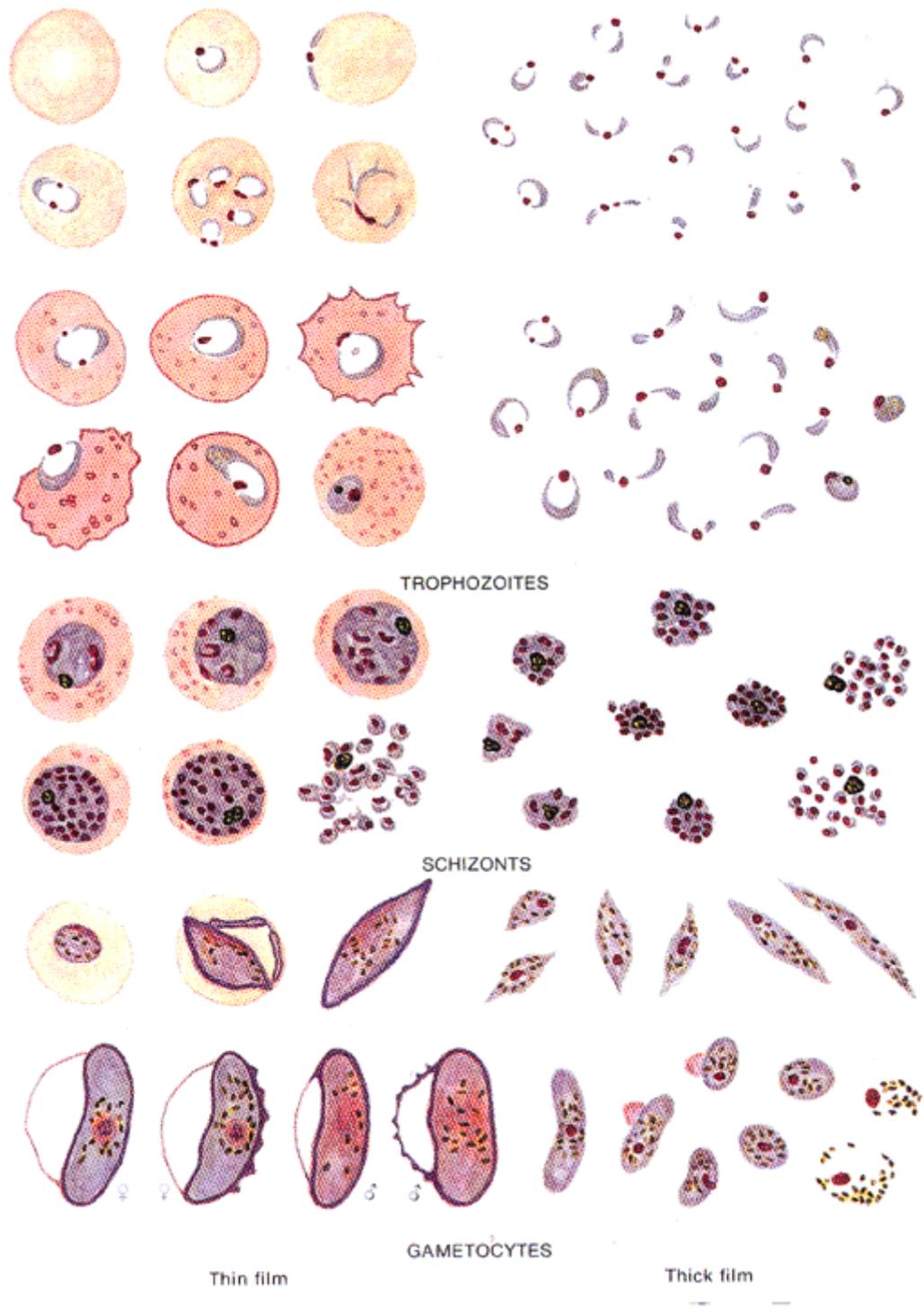


Figure 4: *Plasmodium falciparum*

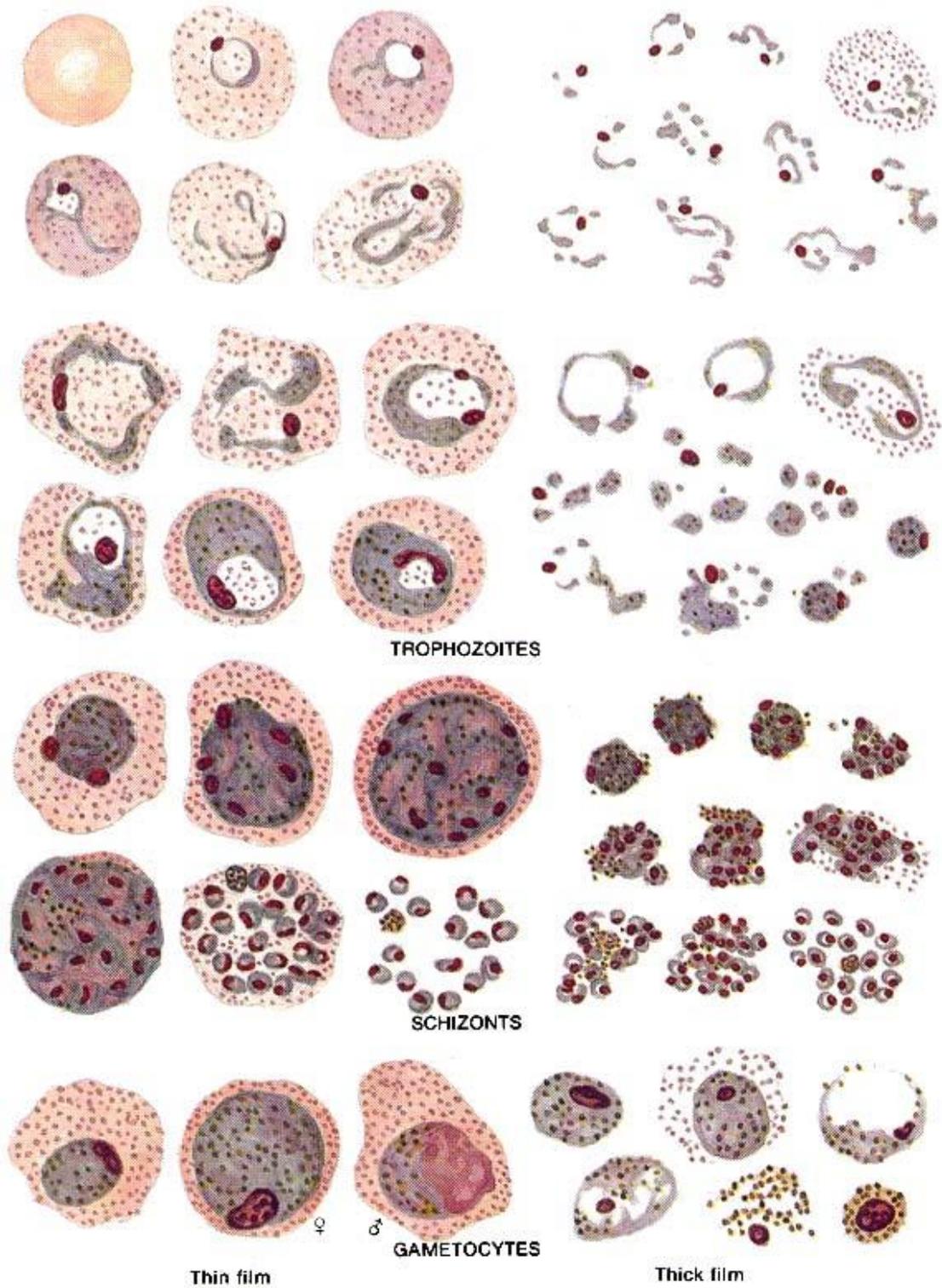


Figure 5: *Plasmodium vivax*

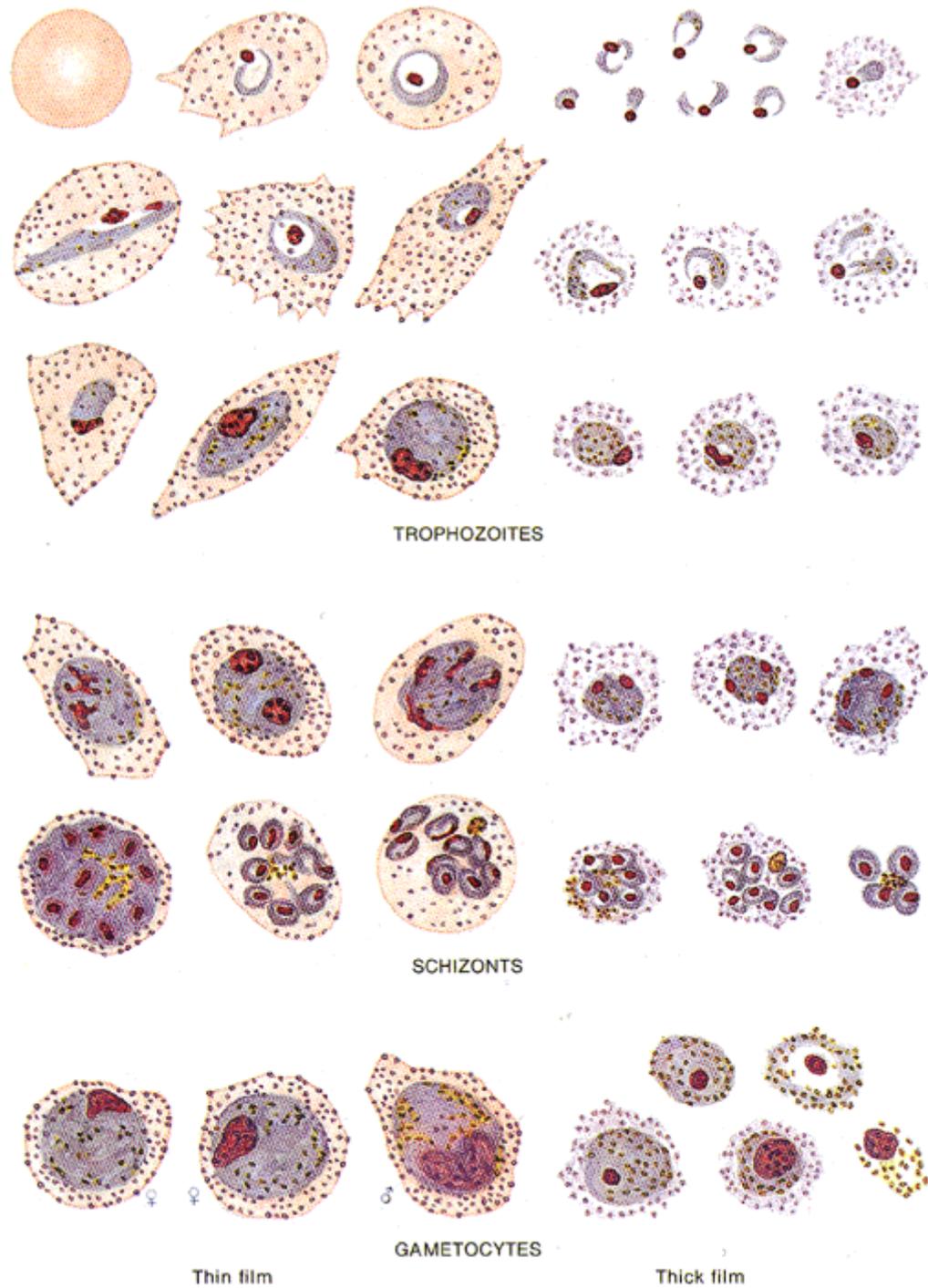


Figure 6: *Plasmodium ovale*

FUENTES FIGURAS

- **Figura 1:** Tomada de “Métodos básicos de laboratorio en parasitología médica”. OMS. 1992.
- **Figura 2:** Gota gruesa con trofozoítos de *P. falciparum*. Tomada de: <http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html>
- **Figura 3:** Extensión de sangre periférica en la que se observan trofozoítos de *P. falciparum*. Tomada de: <http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html>
- **Figuras 4, 5 y 6:** Tomadas de: <http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/gallery.html>