



INDUSTRIA NACIONAL  
DE MICROBIOLOGÍA

**DESARROLLO DE LÁMINAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA  
COLORACIÓN DE GIEMSA Y ROMANOWSKY MODIFICADO  
UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DIRECTO DE *Trypanosoma cruzi*.**

**JAIRO IVAN ORTIZ CARREÑO**

**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C. DICIEMBRE 4 DE 2019**



INDUSTRIA NACIONAL  
DE MICROBIOLOGÍA

***DESARROLLO DE LÁMINAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA  
COLORACIÓN DE GIEMSA Y ROMANOWSKY MODIFICADO  
UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DIRECTO DE Trypanosoma cruzi.***

**Dr. NELSON ARTURO SALAZAR BUITRAGO**  
**UCMC**  
**Asesor Interno**

**Dra. DIANA RAQUEL TAPIAS SALDAÑA**  
**INDEMIC.SAS**  
**Asesora Externa**

**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**TRABAJO DE GRADO**  
**BOGOTÁ D.C. DICIEMBRE 4 DE 2019**

# INTRODUCCIÓN

## Enfermedad de Chagas

*Tripanosomiasis americana*



Causada por *Trypanosoma cruzi*



<https://sp.depositphotos.com/252394324/stock-photo-trypanosoma-cruzi-parasite.html>

- Problema de salud pública en Sudamérica - inmigración
- 25 – 90 millones de personas están en riesgo en contraer la enfermedad.



*Triatoma infestans*



*Rhodnius prolixus*

Contato  
con las heces

## FASE AGUDA

Entre 7 días y 84 días\*  
Generalmente pasa desapercibida porque no muestra síntomas o exhibe solo signos y síntomas leves que no son exclusivos de la enfermedad de Chagas

- Dolores corporales
  - Fiebre
  - Esplenomegalia
- Signo de Romaña 45,8 % \*

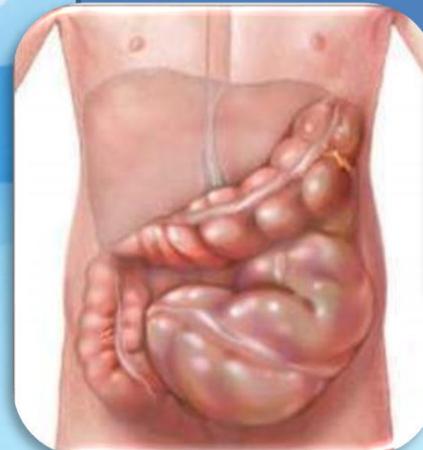


## FASE CRONICA

Entre 3650 días y 10950 días\*  
La infección puede permanecer asintomática durante décadas o incluso de por vida. Sin embargo, algunas personas presentan:

- Complicaciones cardíacas, miocardiopatía, muerte súbita
- Complicaciones intestinales megaesófago, megacolon

\*El riesgo promedio de presentar una o más de estas complicaciones en el transcurso de la vida es de aproximadamente 30%.



# Transmisión



*Vectorial*



*Vertical*



*Trasplantes o transfusiones*

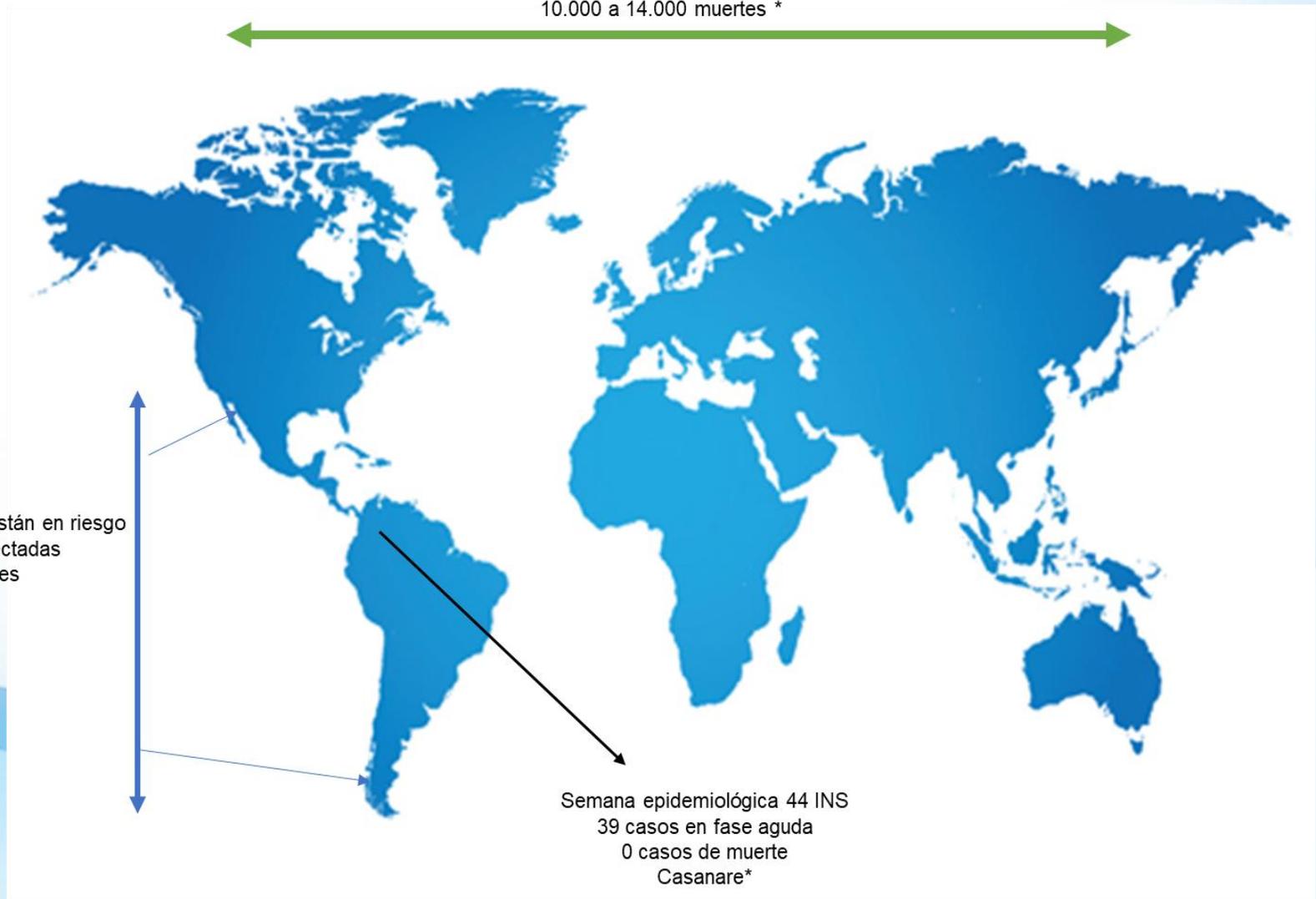


*Oral*



*Accidente de laboratorio*

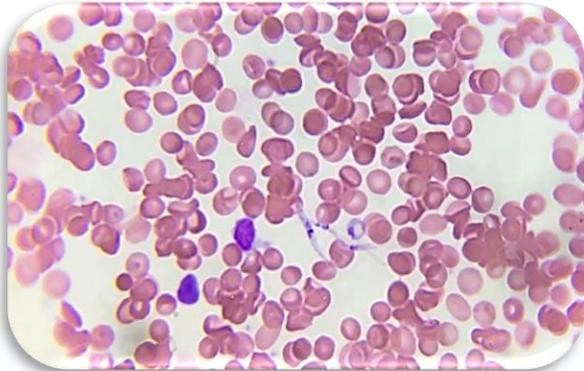
# Epidemiología



- Organización Mundial de la Salud, Tripanosomiasis americana - Abril de 2019
- Center for Diseases control and prevention – 2019
- Boletín Epidemiológico 44 – Instituto Nacional de Salud - 2019

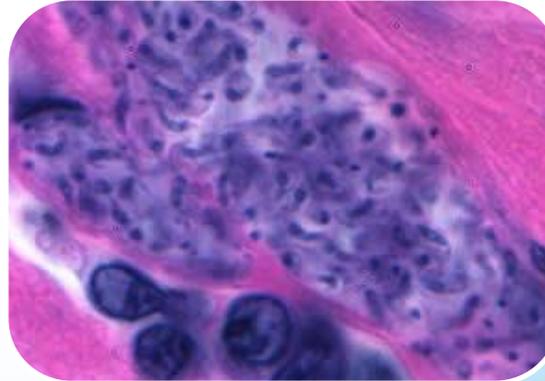
# Trypanosoma cruzi

<b>Reino:</b>	Protista
<b>Filo:</b>	Euglenozoa
<b>Clase:</b>	Kinetoplastea
<b>Orden:</b>	Trypanosomatida
<b>Familia:</b>	Trypanosomatidae
<b>Género:</b>	Trypanosoma
<b>Especie:</b>	Cruzi



Fuente: Jairo Iván Ortiz Carreño- Industria Nacional de Microbiología

Tripomastigote. FSP



Fuente: CDC/Dr. Myron G. Schultz

Amastigotes, Tejido cardiaco

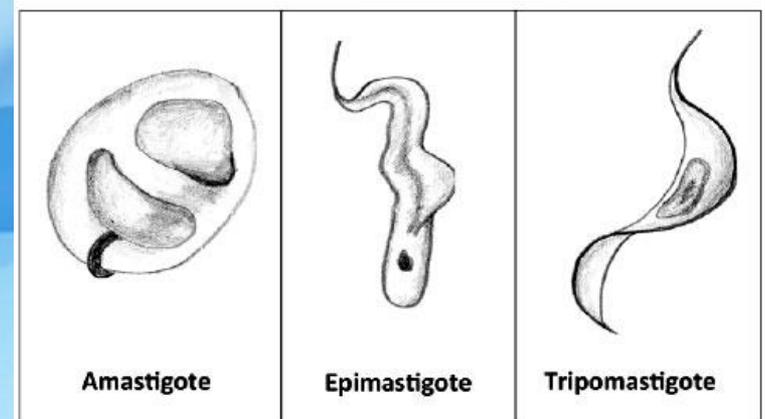


Fuente: CDC/Dr. Myron G. Schultz

## Tratamiento con benzonidazol y nifurtimox

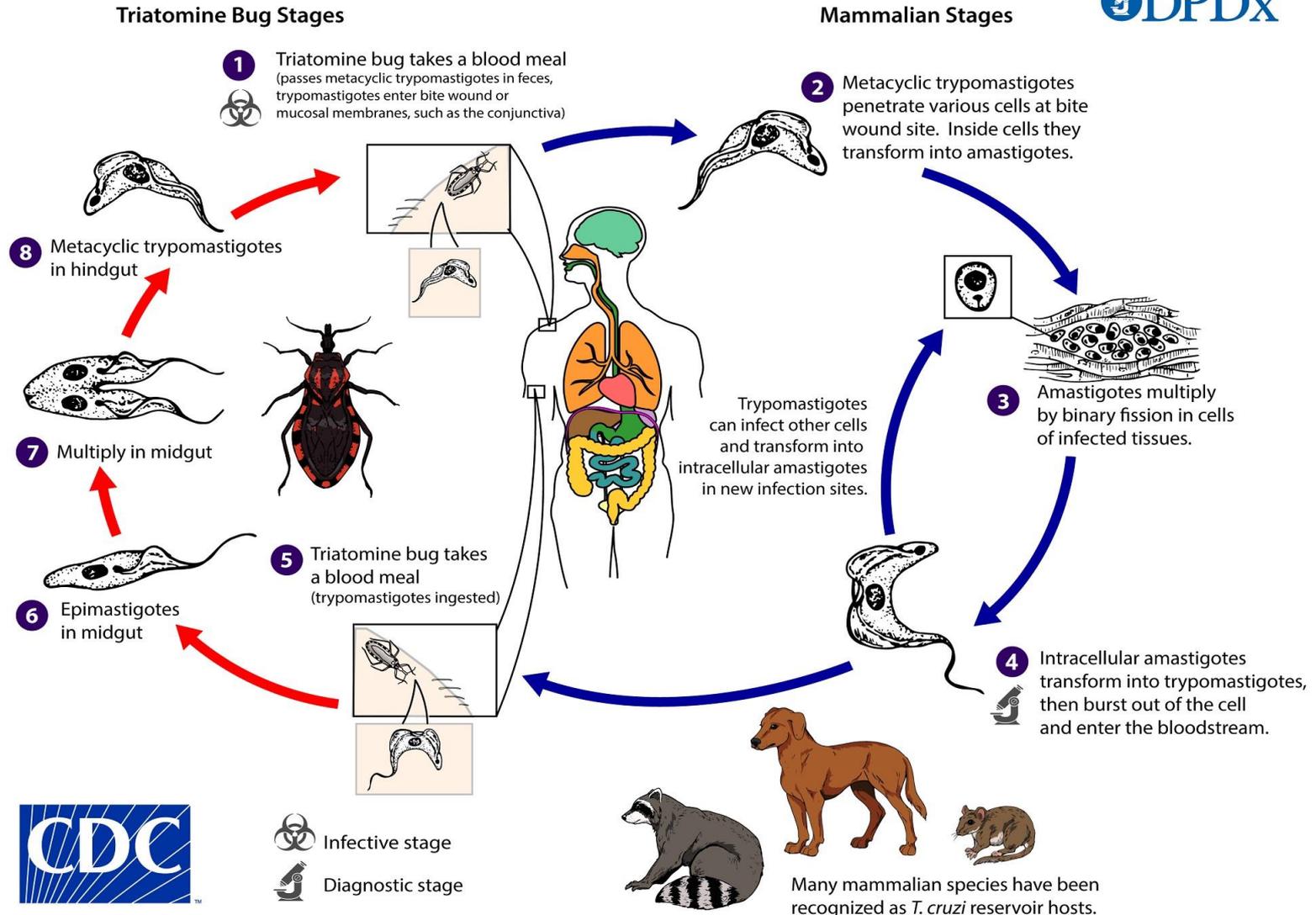
Caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria, cuyo genoma se encuentra ordenado en una compleja región dentro de la propia mitocondria, y cerca de la base del flagelo denominada cinetoplasto.

- Gray ML y colaboradores. Bacteriol Rev. 1966
- Directorate F y colaboradores. Microbiol Rev. 1991
- Lee Wong AC y colaboradores. J Dairy Sci. 1998



# Ciclo de vida

## Trypanosoma cruzi



# OBJETIVOS

## GENERAL

Desarrollar láminas para el control de calidad de la coloración de Field y Giemsa con el fin de suministrar un control de calidad interno a los laboratorios clínicos, que realicen diagnósticos en enfermedades causadas por hemoparásitos, por medio de la técnica de gota gruesa, que contribuya al aseguramiento de los resultados confiables en el diagnóstico..

# ESPECÍFICOS

Desarrollar los controles de calidad internos a los laboratorios clínicos, para facilitar la evaluación de los colorantes con los que se realizan los diagnósticos directos.

Ofrecer comercialmente a las instituciones de educación superior de programas de medicina, bacteriología, biología y otros relacionados, las láminas de control de calidad interno con la presencia de *Trypanosoma cruzi* como material de docencia de fácil disponibilidad.

Contribuir con la estandarización interna para el uso correcto de los colorantes, describiendo los errores técnicos más frecuentemente cometidos que afecten la calidad de las coloraciones y por ende el diagnóstico.

Desarrollar un proyecto de innovación en la industria microbiológica colombiana, para la producción de controles de calidad internos de coloraciones para laboratorios clínicos del país.

# NORMATIVIDAD

LEY 87 DE 1993

Dicta las normas para el cumplimiento del control de calidad interno y externo

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Decreto 1917 de 1994, dicta las recomendaciones para el control de calidad interno

SECRETARIA DISTRITAL DE SALUD

CONTROL INTERNO

Todos los procedimientos realizados por el laboratorio para asegurar la calidad en sus resultados.

CONTROL EXTERNO

Evaluación de desempeño externo, enviado por entes de control.

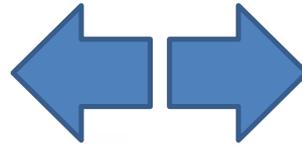
COLORACIONES

# **DISEÑO METODOLÓGICO**

## OBTENCION DE AISLAMIENTOS DE PARASITOS PARA EL CONTROL POSITIVO



INDUSTRIA NACIONAL  
DE MICROBIOLOGÍA

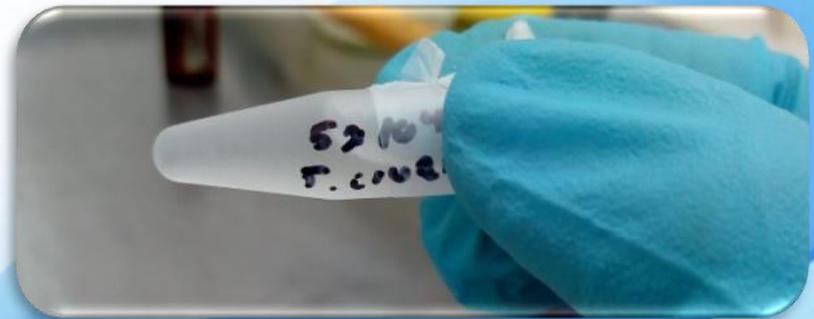


**UAN**  
UNIVERSIDAD  
ANTONIO NARIÑO

Laboratorio de Genética



Fuente: Jairo Iván Ortiz Carreño- Industria Nacional de Microbiología



Fuente: Jairo Iván Ortiz Carreño- Industria Nacional de Microbiología

Los parásitos se lavan con glutaraldehído y se envían en PBS

10X

Viales por 500  $\mu$ l

Temperatura de 9°C

## CONCENTRACIONES DEL PARASITO Y MUESTRAS CLINICAS

Concentración de <i>Trypanosoma cruzi</i> (parásitos por ml)	Volumen del vial concentrado ( $\mu$ l)	Volumen final (ml)
$4,5 \times 10^6$	500	4.5
$5 \times 10^4$	500	4.5
$5 \times 10^5$	500	4.5
$1 \times 10^6$	500	4.5



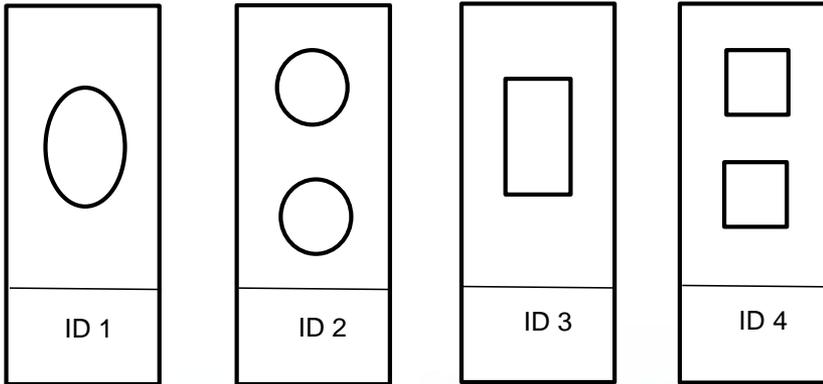
- 20 ensayos
- Promedio de parásitos en 200 campos
- Volumen de muestra conocido

Sangre venosa anticoagulada  
10 tubos EDTA  
8 Tubos Citrato de sodio

Personas sanas

Conteos leucocitarios y plaquetarios normales

## ESTANDARIZACION DE DISTRIBUCION Y VOLUMEN DE MUESTRA



\*ID: identificación de lámina o rotulo

Cantidad de muestra por lamina

Calidad de coloración

Proceso de producción

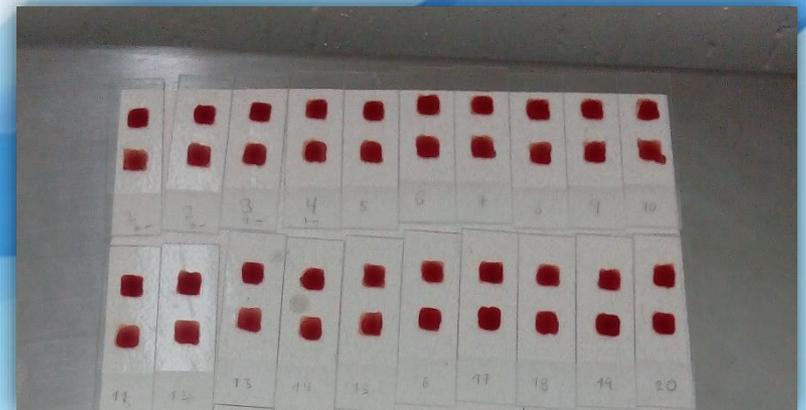
Se realizaron 20 gotas gruesa con volúmenes diferentes

2  $\mu$ l a 11.5  $\mu$ l

Deshemoglobinización

Coloración de plaquetas

Grados de coloración



Fuente: Propia

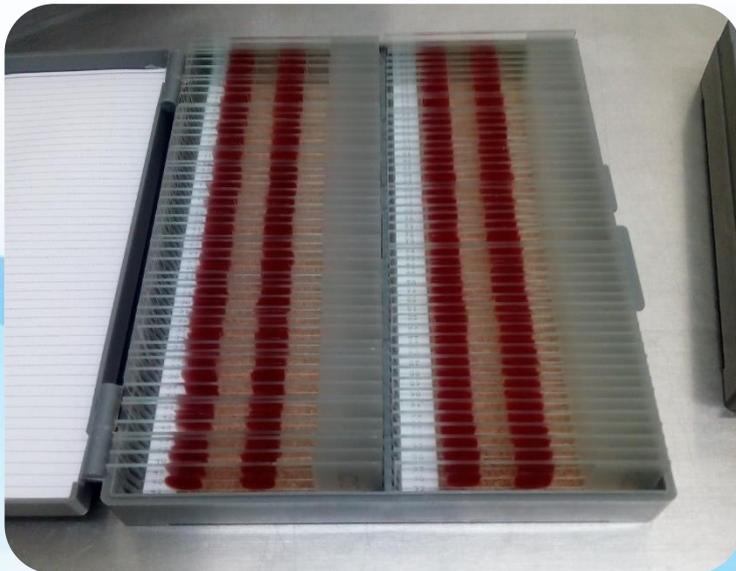
## COLORANTES Y PRUEBAS DE ESTABILIDAD

Se utilizaron colorantes de Field y Giemsa – Químicos Albor

Se estandarizaron los tiempos de coloración.



Fuente: Propia



Fuente: Propia

Lote piloto de 100 laminas  
Coloreadas en distintos periodos de  
tiempo – 1 día a 6 meses

Valoración macroscópica y microscópica

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## VOLUMEN IDEAL DE LA MUESTRA EN LA LAMINA PORTAOBJETOS

Lamina	Volumen (μl)	Deshemoglobinización	Plaquetas	Grado de Coloración
V1	2	Caída de la muestra	-----	-----
V2	2.5	Caída de la muestra	-----	-----
V3	3	Caída de la muestra	-----	-----
V4	3.5	Caída de la muestra	-----	-----
V5	4	Caída de la muestra	-----	-----
V6	4.5	Completa	No visibles	Grado I o II
V7	5	Completa	No visibles	Grado I o II
V8	5.5	Completa	Rosa intenso	Grado III
V9	6	Completa	Rosa intenso	Grado III
V10	6.5	Completa	Violeta	Grado VI
V11	7	Completa	Violeta	Grado V
V12	7.5	Completa	Violeta intenso	Grado V
V13	8	Completa	Violeta intenso	Grado V
V14	8.5	Completa	Violeta intenso	Grado V
V15	9	Incompleta	Rosa intenso	Grado II
V16	9.5	Incompleta	No visibles	Grado I
V17	10	Incompleta	No visibles	Grado I
V18	10.5	Incompleta	No visibles	Grado I
V19	11	Incompleta	No visibles	Grado I
V20	11.5	Incompleta	No visibles	Grado I

\*Resultados de volúmenes de muestra en la lámina portaobjetos – Industria Nacional de Microbiología

## ELECCION DE CONCENTRACION DE PARASITOS IDEAL

Concentración de <i>Trypanosoma cruzi</i> (parásitos por mililitro)	Volumen de muestra de sangre anticoagulada (mililitros)	Volumen final (mililitros)	Numero de parásitos por campo
$4,5 \times 10^6$	4	4.5	9 a 13
$5 \times 10^4$	1.5	2	0 a 4
$5 \times 10^5$	1.5	2	4 a 7
$1 \times 10^6$	1.5	2	7 a 10

❖ Promedio de parásitos por campo en 200 campos

❖ Romanowsky modificado

❖ Gota gruesa

**\*La presencia de un parásito de *Trypanosoma cruzi* en 200 campos microscópicos es positivo para Enfermedad de Chagas**

## INFORMACION DEL CONTROL DE CALIDAD

	FICHA TECNICA DE PRODUCTO			Código del documento	
	TITULO				
	INDUSTRIA NACIONAL DE MICROBIOLOGIA			Página	1 de
	INEMIC S.A.S.			Fecha emisión	
Creado por: JAIRO IVAN ORTIZ	Fecha: JULIO 2019	Revisado por: DIRECCION TECNICA	Fecha: 2019	Aprobado Por: DIRECCION TÉCNICA	Fecha:

PRODUCTO	LAMINAS CONTROL DE CALIDAD FIELD Y GIEMSA CON PRESENCIA MICROSCOPICA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>
MARCA COMERCIAL	INEMIC
PRODUCTOR	INDUSTRIA NACIONAL DE MICROBIOLOGIA S.A.S
PAIS DE ORIGEN	COLOMBIA
COMPONENTES	Caja de acrílico de tamaño 10 x 6.5 cm que contiene 10 unidades de láminas portaobjetos cada una con un control positivo y negativo
VIDA UTIL	Seis (6) meses
EMPAQUE	Empaque primario: Caja de acrílico que contiene 10 láminas control coloración Field y Giemsa. Empaque secundario: Bolsa plástica con cierre Ziploc, que contiene el empaque primario
PRESENTACION COMERCIAL	Caja x 10 Unidades
ESTANDARES DE CALIDAD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Instituto Nacional de Salud - Grupo de parasitología. Guía para la vigilancia por laboratorio del <i>Trypanosoma cruzi</i>. Vol. 1. Bogotá D.C.; 2017. Reporte No.: 1. Available from: <a href="https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Gu%C3%ADa%20para%20la%20Vigilancia%20por%20laboratorio%20de%20Trypanosoma%20cruzi.pdf">https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin de laboratorio/Guía para la Vigilancia por laboratorio de Trypanosoma cruzi.pdf</a></li> <li>2. Ministerio de Salud - Dirección General de Promoción y Prevención. Guía de Atención de la Malaria. In: Ministerio de Salud y Protección Social, editor. Memorias Malaria [Internet]. Bogotá D.C.; 2012.</li> <li>3. Organización Mundial de la Salud. La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana) [Internet]. 2018.</li> <li>4. Villamarin MG. Procedimientos técnicos para el diagnóstico de malaria [Internet]. Primera Ed. Secretaria de salud de Bogotá, editor. Bogotá D.C.: Editorial Linotipia Bolívar y Cía. S. en C.; 2009. 72 p. Available from: <a href="http://www.saludcapital.gov.co">www.saludcapital.gov.co</a></li> </ol>
INSTRUCCIONES DE DESECHO	Eliminar los elementos, utilizados según protocolos de eliminación de residuos peligrosos de la institución.

- ✓ Método Cualitativo
- ✓ Asegura el correcto funcionamiento de los colorantes
- ✓ Láminas portaobjetos con dos cuadros
- ✓ El objetivo es evidenciar la calidad de la coloración mediante un control positivo y un control negativo
- ✓ El control positivo, contiene la características de una gota gruesa tradicional mas la presencia de *Trypanosoma cruzi* en estado de Tripomastigote

## PROCESO DE PRODUCCION

- Las laminas portaobjetos se marcan con un lápiz grabador de vidrio.
- Se lavan y se desengrasan con alcohol

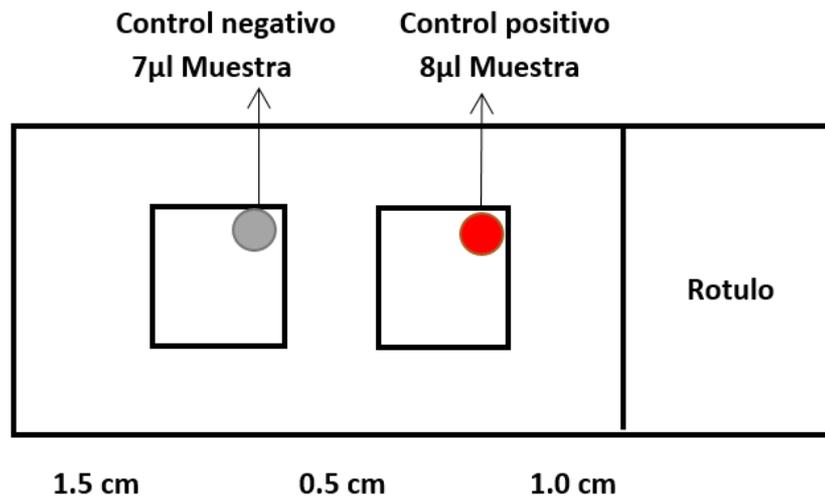
Se extraen 2 tubos de sangre venosa, en tubo tapa lila (Anticoagulante EDTA) o tubo tapa azul (Citrato de Sodio)

Vial de parásitos a temperatura ambiente

Tubo tapa rosca estéril  
Pipeta automática y puntas estériles

Se mezclan 1.5 mililitros de sangre con el vial de parásitos

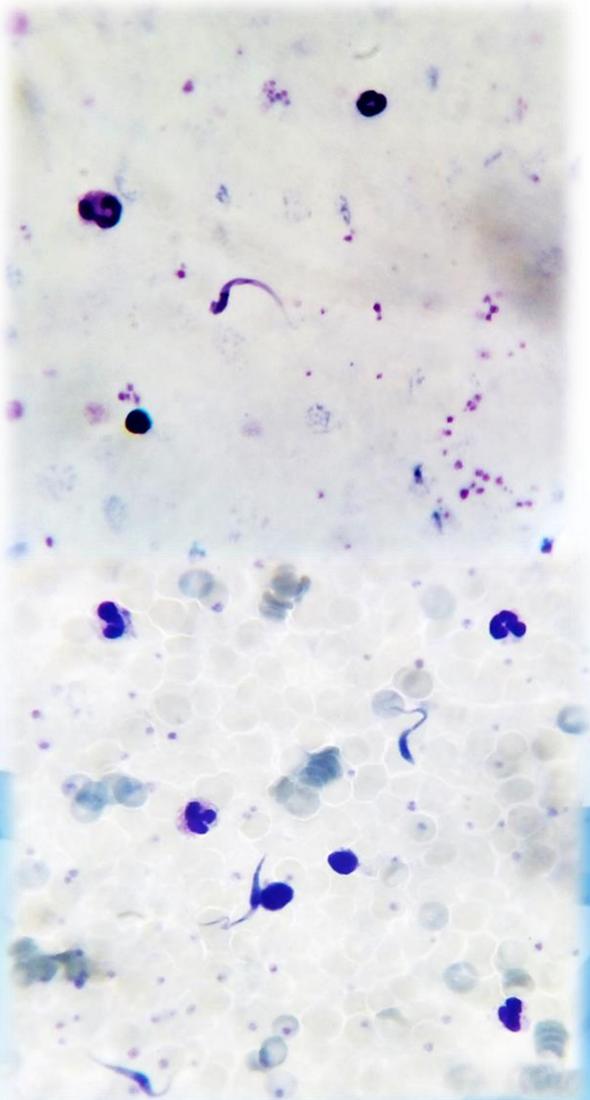
Se realizan 5 laminas



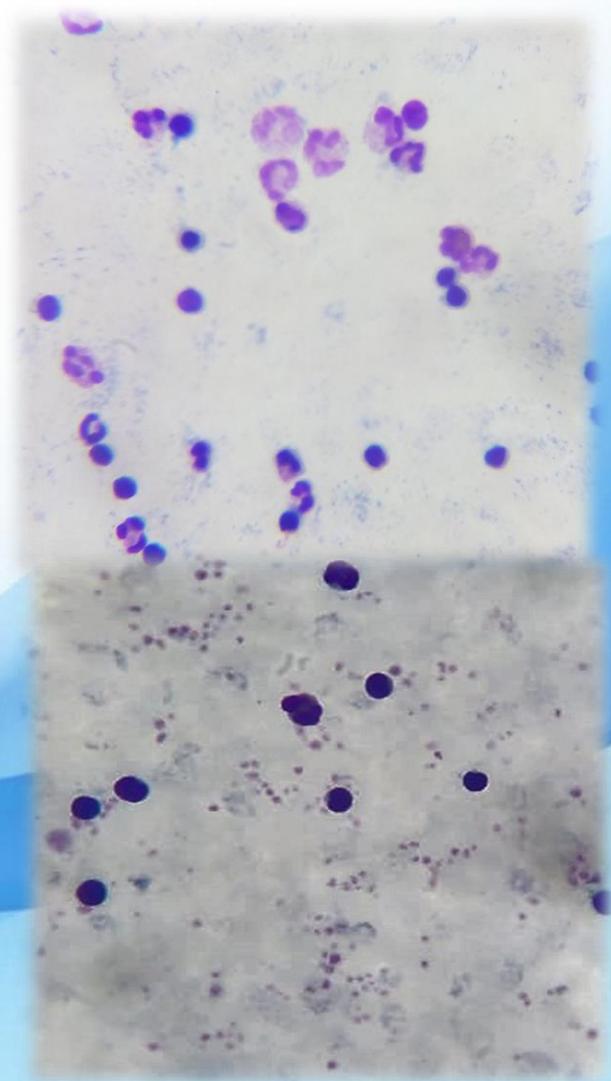
Se verifica los controles de calidad  
Validación

# CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO VISUALIZACION MICROSCOPICA

POSITIVO



NEGATIVO



Se inicia la producción

- Industria Nacional de Microbiología – Laminas para control de calidad en coloraciones de Fiel y Giemsa
- Escala sugerida por Field et al 1963.

## PRUEBAS DE ESTABILIDAD

Nº de lamina	Tiempo transcurrido después de producción	Grado de coloración	Presencia del parásito
P1	1 día	5	Si
P2	1 día	5	Si
P3	2 días	5	Si
P4	2 días	5	Si
P5	1 semana	5	Si
P6	1 semana	5	Si
P7	2 semanas	5	Si
P8	2 semanas	5	Si
P9	1 mes	5	Si
P10	1 mes	5	Si
P11	1 mes y 14 días	5	Si
P12	1 mes y 14 días	5	Si
P13	2 meses	5	Si
P14	2 meses	5	Si
P15	2 meses y 14 días	5	Si
P16	2 meses y 14 días	5	Si
P17	3 meses	5	Si
P18	3 meses	5	Si
P19	3 meses y 14 días	4	Si
P20	3 meses y 14 días	4	Si
P21	4 meses	4	Si
P22	4 meses	4	Si
P23	4 meses y 14 días	4	Si
P24	4 meses y 14 días	4	Si
P25	5 meses	4	Si
P26	5 meses	4	Si
P27	5 meses y 14 días	4	Si
P28	5 meses y 14 días	4	Si
P29	6 meses	4	Si
P30	6 meses	4	Si

# DISCUSION

No existía en Colombia un control de calidad comercial para coloraciones de Field y Giemsa



1. Desinterés de las empresas en la producción de controles de calidad
2. No es un producto de consumo masivo

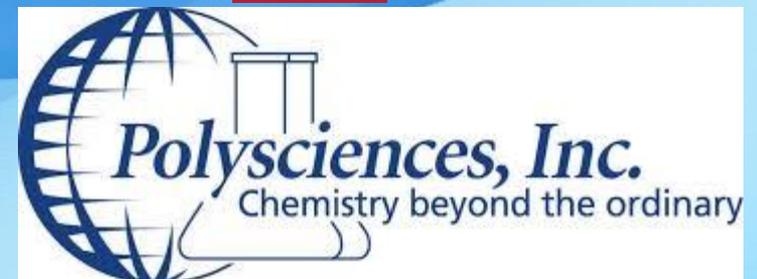
1. Existe gran interés en algunos laboratorios para obtenerlas

Situaciones similares ...  
No evalúan desempeño de los colorantes



<https://www.microbiologics.com/qc-microbiology-slides-blood-parasite-control-slide>

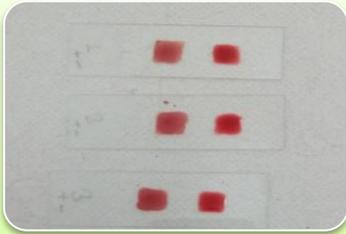
 **Microbiologics®**





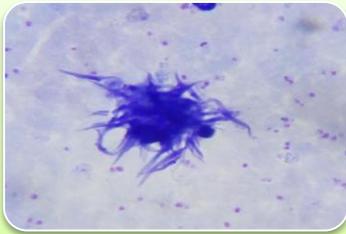
## Proceso de Deshemoglobinización

- Crucial en el proceso de coloración
- Calidad de la muestra
- Buen funcionamiento del azul de metileno
- Cantidades superiores a 8.5  $\mu$ l



## Proceso de fijación

- Laminas limpias y desengrasadas
- Tiempos de fijación a temperatura ambiente y a 37°C



## Determinación del control positivo

- 1 a 10 parásitos por campo microscópicos \*
- Revisar los 200 campos microscópicos



## Aseguramiento del desempeño del colorante

- Malaria, Leishmaniasis
- Modelo experimental

\* Vega S, Mendoza A, Cabrera R, Cáceres AG, et al. Primer caso de enfermedad de Chagas aguda en la Selva Central del Perú

# CONCLUSIONES

- Se desarrolló un control de calidad comercial para las coloraciones de Romanowsky modificado y Giemsa para mejorar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas agudo en Colombia y otras hemoparasitosis
- Se contribuyó a la estandarización interna del uso adecuado de los colorantes mencionados anteriormente, adoptando las recomendaciones del Instituto Nacional de Salud, para el diagnóstico de Chagas agudo y otras hemoparasitosis.
- Se generó la disponibilidad de láminas con la presencia de *Trypanosoma cruzi*, de fácil adquisición como material de enseñanza con fines de docencia y diagnóstico clínico a un bajo costo.

# AGRADECIMIENTOS



A mi universidad, mi *alma mater* y a los diferentes docentes quienes con el trascurso del tiempo fueron ayudando a mi formación integral

A la Industria Nacional de Microbiología que permitieron el desarrollo de este trabajo, por darme la oportunidad de ser el primer trabajo de grado de esta institución y por generar más conocimiento para mi profesión

A mis asesores de tesis quienes fueron parte importante y fundamental para el desarrollo, elaboración y culminación de este lindo trabajo

A los jurados por su dedicación y paciencia

**GRACIAS**



## CARACTERÍSTICAS DE GRADOS DE COLORACION IV Y V DE FIELD

Elemento o aspecto teñido	Color esperado
Fondo de la muestra. Efecto de deshemoglobinización de los glóbulos rojos	Azul pálido, Rosado tenue, Violeta tenue
Reticulocitos	Mallas Azules
Plaquetas	Rosado fuerte a violeta con ligero punteado
Neutrófilo	Citoplasma rosado, Núcleo azul o violeta bilobulado
Linfocitos	Citoplasma azul claro, Núcleo azul o violeta fuertemente coloreado
Monocitos	Citoplasma azul ceniza, Núcleo azul ceniza no segmentado irregular
Eosinófilo	Está cubierto de granulaciones color naranja , Núcleo azul o violeta lobulado
Basófilo	Está cubierto de granulaciones color azul oscuro, Núcleo azul o violeta lobulado
Núcleo o cromatina del parásito	Rojo o violeta
Citoplasma parasitario	Azul

Parámetros basados en la escala sugerida por Field et al. en 1963.

## COLORACION DE FIELD COMPONENTES

COLORANTE	COMPONENTE
AZUL DE METILENO DE FIELD	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cloruro de azul de metileno para microscopía</li><li>• Ortofosfato disódico anhidro (<math>\text{Na}_2 \text{HPO}_4</math>)</li><li>• Ortofosfato monopotásico (<math>\text{KH}_2 \text{PO}_4</math>)</li></ul>
SOLUCION A ROMANOWSKY MODIFICADO	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cloruro de azul de metileno para microscopía</li><li>• Azur I o Azur B para microscopía</li></ul>
SOLUCION B ROMANOWSKY MODIFICADO	<ul style="list-style-type: none"><li>• Eosina amarillenta hidrosoluble para microscopía</li></ul>
BUFFER O SOLUCION AMORTIGUADORA (SALES FOSFATADAS)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ortofosfato disódico anhidro (<math>\text{Na}_2 \text{HPO}_4</math>)</li><li>• Ortofosfato monopotásico (<math>\text{KH}_2 \text{PO}_4</math>)</li></ul>

