

Roteiro de aula prática Diagnóstico Laboratorial da Malária

a) Coleta e preparo do esfregaço delgado

- Trabalhar sobre superfície plana e horizontal.
- Usar duas lâminas: uma, para receber a gota de sangue (5 µl aproximadamente); outra, para espalhar o sangue.
- Calçar luvas de látex descartáveis.
- Com a mão direita, segurar a lâmina firmemente pelas bordas da extremidade onde se encontra a etiqueta de identificação.
- Tomar 5 µl de sangue heparinizado com uma pipeta e aplicar na extremidade próxima a etiqueta.
- Com a borda estreita da lâmina biselada em contato com a gota de sangue, formando um ângulo de 50°, espalhar o sangue com um movimento rápido para formar uma camada delgada (se possível, uma única camada de células), sem atingir a outra extremidade da lâmina.
- Deixar secar em temperatura ambiente, na posição horizontal.



b) Coloração do esfregaço utilizando o Panótico Rápido

- Submergir as lâminas na solução 1 mantendo-se um movimento contínuo de cima para baixo durante 10 segundos (10 imersões de 1 segundo cada) e deixar escorrer bem.
- Submergir as lâminas na solução 2 mantendo-se um movimento contínuo de cima para baixo 10 segundos (10 imersões de 1 segundo cada) e deixar escorrer bem.
- Submergir as lâminas na solução 3 mantendo-se um movimento contínuo de cima para baixo durante 10 segundos (10 imersões de 1 segundo cada) e deixar escorrer bem.
- Lavar com água deionizada (tamponada a pH 7,0), secar ao ar na posição vertical e com o final da extensão voltado para cima.

c) Avaliação da qualidade de coloração do esfregaço

O exame de esfregaço deve ser feito, preferencialmente, na parte mais fina (cauda) do esfregaço, onde as hemácias estão dispostas numa só camada, com as bordas separadas ou apenas com leve contato e sem superposição, sendo facilmente observada a camada única de células fixadas formando “franjas”. A detecção de baixas parasitemias requer o exame de todo o esfregaço.

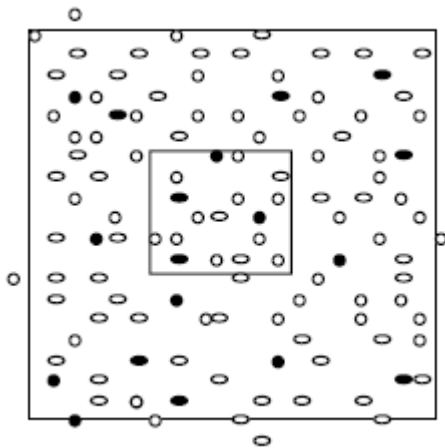
As seguintes características devem ser observadas para a avaliação da qualidade de coloração do esfregaço:

- A coloração do esfregaço depende da espessura da camada de hemácias, bem como do método de coloração.
- O esfregaço deve apresentar uma película fina e uniforme que não atinja as bordas, com diminuição progressiva da quantidade de sangue em direção ao final da lâmina, sem alcançar a extremidade da mesma, mas formando franjas.
- A cor do esfregaço pode variar de cinza-claro a rosa-pálido.

d) Método de avaliação pelo percentual de hemácias parasitadas (utilizado apenas para esfregaço delgado)

Critérios:

- Usar ocular de 7,5x ou 10x e 100x na objetiva do microscópio.
- Número de campos a examinar: aqueles que levem ao alcance do número de 100 hemácias (em geral, de 5 a 10 campos).



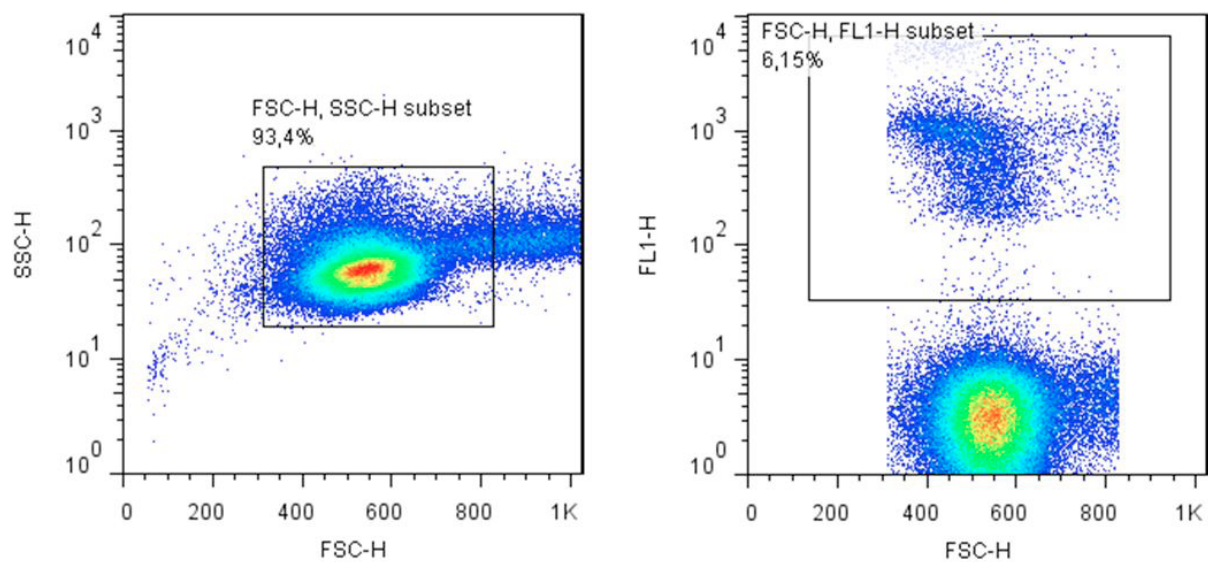
- Contar simultaneamente o número de parasitos assexuados, até alcançar 100 hemácias.
- Realizar uma regra de três para obter a parasitemia percentual. Por exemplo: Se encontrarmos 10 parasitos assexuados contra 100 hemácias teremos um percentual de 10% de hemácias parasitadas, ou seja:

$$10 \leftrightarrow 100$$

$$(10 \div 100) \times 100 = 0,1 \times 100 = 10\%$$

e) Detecção de eritrócitos infectados marcados com GFP

Para cada amostra, coletar dois microlitros de sangue por compressão da cauda do camundongo infectado com *Plasmodium berghei* ANKA GFP (que expressa a proteína verde fluorescente) adicionar em 400 µl de tampão de FACS (PBS 1x, 1% FBS, azida 0.05%). A amostra deve ser bem homogeneizada. Os eritrócitos não infectados não possuem GFP já que não estão infectados pelo parasita que produz este fluorocromo. A parasitemia é expressa em percentual de células marcadas dentro do *gate* de eritrócitos.



Atividades

1. Calcular a parasitemia na amostra recebida.
2. Identificar as principais formas evolutivas do *Plasmodium berghei* presentes no material, esquematizando-as na forma de desenho.
3. Alguma(s) das formas encontradas sobrevive(m) no inseto vetor e dá(ão) continuidade ao ciclo? Qual (is)?