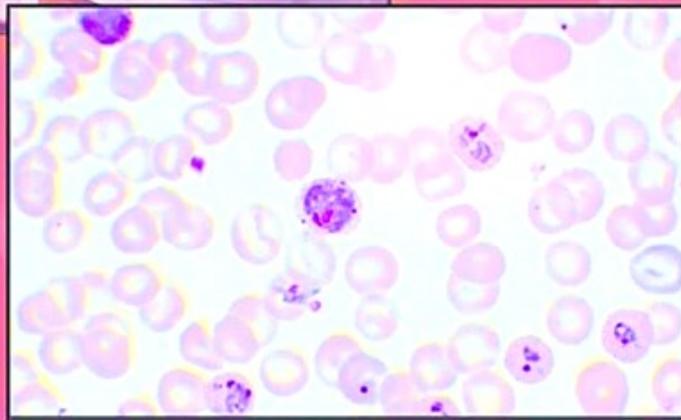




República de Guatemala

2017

Manual de Normas y Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Malaria



Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

Dirección General de Regulación, Vigilancia
y Control de la Salud

Laboratorio Nacional de Salud

**Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
Dirección de Regulación, Vigilancia y Control de la Salud
Laboratorio Nacional de Salud**

**MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL
DIAGNÓSTICO DE MALARIA
Segunda Edición**

Guatemala, Noviembre de 2017



Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
Laboratorio Nacional de Salud
Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Malaria

MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA Segunda Edición

ELABORADO POR:

Lic. Q.B. Erick Durán
Licda. Q.B. Sheilee Díaz
Licda. Q.B. Amalia Girón

Área de Parasitología
Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica
Laboratorio Nacional de Salud
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

APROBADO POR:

Licda. Q.B. Leticia Castillo
Coordinadora de Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica
Laboratorio Nacional de Salud
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

Licda. Q.F. Paulina Castellanos
Jefe del Laboratorio Nacional de Salud
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social

Dra. Karla Pamela Chávez Chéves
Directora de la Dirección General de Regulación, Vigilancia y Control de la Salud
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social



Este libro fue impreso con el apoyo de la Subvención Malaria del Fondo Mundial y el Ministerio de Salud y Asistencia Social de Guatemala

“Los puntos de vista y recomendaciones expresados en este documento son responsabilidad exclusiva de los autores y no representan necesariamente las opiniones del Fondo Mundial de lucha contra el SIDA, la Tuberculosis y la Malaria, ni de su Junta Directiva. Este material no ha sido producido, ni aprobado de forma explícita o implícita por el Fondo Mundial de lucha contra el SIDA, la Tuberculosis y la Malaria.”



ACTUALIZADO POR:

Dr. Rodolfo Zeissig
Epidemiólogo
Sub programa de malaria DRPAP, MSPAS

Licda. Q.B. Selene González
Supervisora de Parasitología
UCREVE / LNS / MSPAS

Licda. Q.B. Andrea Boy
Supervisora de Malaria
Sub programa de malaria / DRPAP / MSPAS

Licda. Q.B. Anaité Sánchez
Supervisora de Malaria
Sub programa de malaria / DRPAP / MSPAS

Lic. Q.B. José Miguel Echeverría
Supervisor de Malaria
Sub programa de malaria / DRPAP / MSPAS

Licda. *Inf.* Q.B. Luz Elena Vásquez
Supervisora de Malaria
Sub programa de malaria / DRPAP / MSPAS

Licda. Dina Cruz
UCREVE / LNS / MSPAS

Sr. César Portillo
Microscopista ETV
DAS Jalapa / MSPAS

Lic. Mario Quixchán
Microscopista
DAS Peten Norte / MSPAS

Sr. Vicente Álvarez
Microscopista
DAS Alta Verapaz

Sr. Noel Gómez
Microscopista
DAS Escuintla

Sra. Dionicia López
Microscopista
DAS Huehuetenango

Sra. Olga Bol
Área de Parasitología
UCREVE / LNS / MSPAS

Sra. Sandra Hernández
Área de Parasitología
UCREVE / LNS / MSPAS

COLABORACION POR:

Licda. Zoraida Morales Monroy
Coordinadora del Programa Nacional
de ETV/DRPAP

Dr. Julio Raúl Hernández Ponce
Facilitador Malaria
Sub programa de malaria / DRPAP, MSPAS



GLOSARIO

CV: colaborador voluntario.

Deshemogloblinización: este proceso tiende a disminuir la cantidad de sangre existente en la gota gruesa para permitir visualizar mejor a los parásitos.

Fagocitosis: es un proceso por el cual algunas células (fagocitos y protistas) rodean con su membrana citoplasmática partículas sólidas y las introducen al interior celular. En muchos organismos superiores, la fagocitosis es tanto un medio de defensa ante microorganismos invasores como de eliminación (e incluso reciclaje) de tejidos muertos.

Hemoglobina: es una hemoproteína de la sangre, de color rojo característico, que transporta el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, el dióxido de carbono desde los tejidos hasta los pulmones que lo eliminan y también participa en la regulación de pH de la sangre.

Hifas: son una red de filamentos cilíndricos que conforman la estructura del cuerpo de los hongos multicelulares.

LL: Laboratorio Local

LLR: Laboratorio Local de Referencia

Micelio: el micelio es la masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo.

Microlitro: Unidad de volumen equivalente a la millonésima parte de un litro, representada por el símbolo μl .

Morfología: rama de la biología que estudia la forma o estructura de los seres vivos.

Parasitemia: presencia de parásito en sangre.

pH: Coeficiente logarítmico que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa.

PNETV: Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores.



CONTENIDO

	Página
Introducción	5
Capítulo 1: Descripción de la enfermedad	6
Capítulo 2: Bioseguridad en el laboratorio	12
Capítulo 3: Toma de muestra y preparación de extendidos sanguíneos	14
Capítulo 4: Coloración de la muestra	22
Capítulo 5: Observación microscópica de muestras sanguíneas	25
Capítulo 6: Densidad parasitaria	40
Capítulo 7: Otros métodos diagnósticos para malaria	44
Capítulo 8: Red de laboratorios y sistema de información	50
Capítulo 9: Supervisión y control de calidad	54
Capítulo 10: Limpieza y almacenamiento de láminas	62
Capítulo 11: Lineamientos para el diagnóstico rápido y tratamiento oportuno	63
Referencias	64
Anexos	66



INTRODUCCION

Los laboratorios de Salud Pública son la base vital del sistema de salud, al proveer la evidencia científica necesaria para apoyar la toma de decisiones en Salud Pública. Los sectores de control y prevención de enfermedades, epidemiología, prevención y respuesta de urgencias están estrechamente vinculados al sistema nacional de laboratorios, razón por la cual, estos deben generar resultados analíticos precisos y exactos, de forma oportuna.

Guatemala se encuentra actualmente en un proceso de eliminación de la malaria, habiendo logrado una reducción de más de 90% de los casos desde el año 2000. En el año 2014 se firmó un acuerdo entre los ministros de salud de los países de Mesoamérica e Isla La Española para eliminar la malaria de la región para el año 2020, conformando la iniciativa EMMIE (Eliminación de la Malaria en Mesoamérica e Isla la Española). Este acuerdo ha fortalecido las acciones del país con miras a lograr la eliminación y teniendo como base fundamental de estas acciones el diagnóstico de calidad accesible y oportuno. Esto conlleva el incrementar la cantidad de servicios de diagnóstico de malaria, incluyendo a todos los prestadores de servicios de salud del país y el aumento de la vigilancia epidemiológica activa y pasiva para la detección de casos.

El Laboratorio Nacional de Salud, en calidad de Laboratorio Nacional de Referencia, emite este “Manual de Normas y Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Malaria, Segunda Edición”, teniendo como objetivo mejorar la calidad de los servicios que prestan los laboratorios de diagnóstico, como parte de la Red Nacional de Laboratorios de Malaria, bajo un sistema de monitoreo, control de calidad, flujo de información bidireccional, capacitación y mejora continua.

Este manual contempla la aplicación de las técnicas estandarizadas en el diagnóstico microscópico de la malaria, tanto a través del uso en conjunto de la gota gruesa y el frote fino, según los criterios de la Organización Mundial de la Salud –OMS– y los Centros para Control y Prevención de Enfermedades –CDC–. Se incluye la toma, preparación, coloración y observación de la muestra sanguínea, trabajando bajo normas de bioseguridad y el uso adecuado del equipo de laboratorio. Además se establecen los criterios para el diagnóstico, determinando especie, estadios y densidad parasitaria utilizando la gota gruesa. Adicionalmente se describen otras técnicas diagnósticas, como el uso de pruebas rápidas y la toma de muestra en papel filtro tratado para estudios moleculares.

CAPÍTULO 1

DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

1.1 Agente causal:

El agente causal de la malaria es un protozooario de la clase de esporozoarios del género *Plasmodium* que es un parásito intracelular obligado. Las principales especies causantes de la enfermedad en humanos son *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* y *P. malariae*.

La edad del eritrocito es un factor determinante en la infección de las células, a excepción de *P. falciparum*. Las infecciones por *P. vivax* y *P. ovale* se limitan al reticulocito o a eritrocitos muy jóvenes. *P. malariae* parasita a eritrocitos viejos, *P. falciparum* invade a eritrocitos de todas las edades, de ahí su alta parasitemia.

1.2 Modo de transmisión:

Generalmente, la malaria se transmite por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* infectado. También se puede transmitir por la inyección o transfusión de sangre infectada y el empleo de agujas y jeringas contaminadas con el parásito. En muy pocos casos hay transmisión congénita. En las zonas de transmisión intensa, *P. falciparum* puede infectar la placenta y ocasionar bajo peso al nacer, así como anemia grave en la mujer gestante.

1.3 El vector:

El vector de este parásito es el mosquito del género *Anopheles*. Presenta un comportamiento de preferencia alimenticia peri- e intradomiciliaria y pica durante toda la noche, pero la mayor actividad ocurre al anochecer y al amanecer.

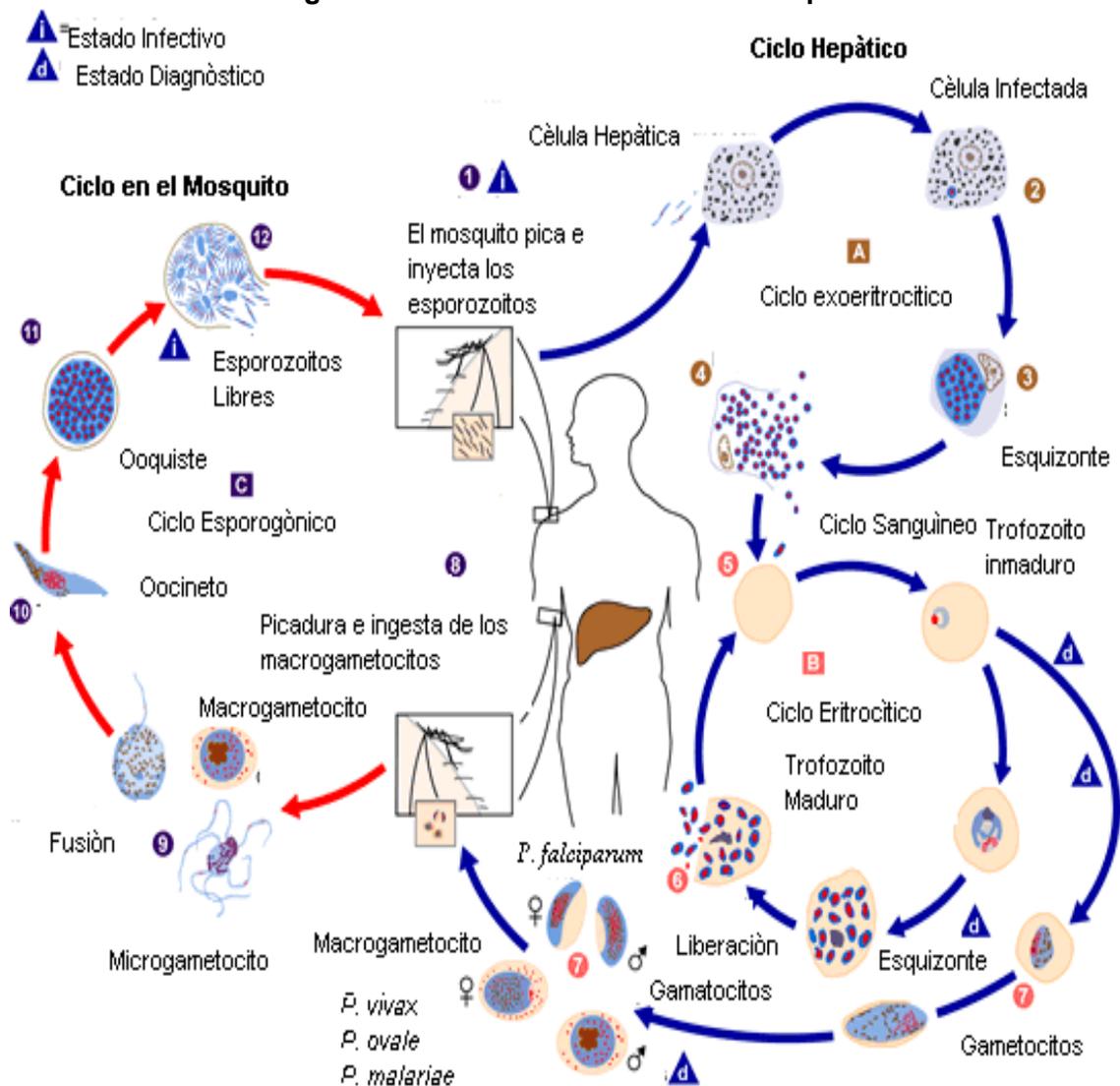
1.4 Ciclo vital del parásito:

La infección en los humanos comienza con la picadura del mosquito *Anopheles* infectado. Durante el proceso de alimentación del insecto, los esporozoítos presentes en la saliva de éste, pasan a la sangre. Dentro de una hora después de la infección, todos los esporozoítos han sido retirados de la sangre por el hígado y ocurre el desarrollo inicial de los parásitos (ciclo asexual). En esta fase hepática, el parásito crece y su núcleo se divide varias veces, lo que origina la formación de merozoítos tisulares. Algunos merozoítos de *P. vivax* y de *P. ovale* se convierten en formas latentes (hipnozoítos), que permanecen en los hepatocitos y, al madurar meses o años después, producen recaídas.

Los merozoítos rompen el hepatocito y penetran a la circulación y se fijan a sitios receptores específicos sobre la membrana de los glóbulos rojos e inicia su desarrollo. La primera forma reconocible del parásito dentro del eritrocito (fase eritrocítica) es el trofozoíto. El núcleo del trofozoíto se divide y con esta división pasa al estadio de esquizonte. Los esquizontes así formados rompen el eritrocito y se fijan a la membrana de otros eritrocitos con lo que se inicia un nuevo ciclo de la fase eritrocítica.

Un número reducido de los esquizontes se diferencia en gametocitos femeninos y masculinos, forma infectiva al vector. Dichos gametocitos no rompen el glóbulo rojo, sino que son ingeridos por un mosquito para continuar su desarrollo, esta fase es el ciclo sexual del parásito. En la Figura 1 se muestra gráficamente el ciclo vital de *Plasmodium sp.*

Figura 1.1 Ciclo vital de *Plasmodium sp.*



Fuente: División de Enfermedades Parasitarias, CDC, Atlanta, GA, Estados Unidos de América. Sitio web: <http://www.cdc.gov>

1.5 Período de incubación:

El lapso entre la picadura del mosquito infectivo y la aparición de los síntomas es de:

- <i>Plasmodium vivax</i>	De 12 a 18 días
- <i>Plasmodium falciparum</i>	De 9 a 14 días
- <i>Plasmodium ovale</i>	De 12 a 18 días
- <i>Plasmodium malariae</i>	De 18 a 40 días

Algunas cepas de *P. vivax*, principalmente de zonas templadas, pueden tener un período de incubación de 8 a 10 meses o más largo. Cuando la infección se debe a una transfusión de sangre los periodos de incubación dependen del número de parásitos inoculados y suelen ser breves, pero pueden llegar hasta dos meses. La supresión sub óptima con medicamentos, como sucede con el tratamiento supresivo, ocasiona periodos de incubación prolongados.

1.6 Período de transmisibilidad:

Los seres humanos pueden infectar a los mosquitos durante todo el tiempo que alberguen gametocitos infectantes en la sangre; esto varía según la especie del parásito y la respuesta al tratamiento. Los pacientes no tratados o insuficientemente tratados pueden ser fuente de infección para los mosquitos durante varios años en el paludismo por *P. malariae*, hasta cinco años en el caso de *P. vivax*, y, por lo regular, no más de un año con *P. falciparum*. El mosquito se mantiene infectivo durante toda su vida. La sangre almacenada puede ser infectante durante un mes, como mínimo.

1.7 Diagnóstico clínico:

Todos los signos y síntomas varían en función de la especie de *Plasmodium*, la carga parasitaria y el estado inmune del paciente. Por ejemplo, el cuadro clínico clásico de fiebre se repite cada 48 o 72 horas según la especie de *Plasmodium*. Cuando existen infecciones mixtas se modifica la periodicidad de la fiebre. Clásicamente (pero no frecuentemente observado) los ataques de fiebre ocurren cada segundo día en los casos de *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale*, y cada tercer día en casos de *P. malariae*. Estos síntomas pueden ser fácilmente confundidos con gripe, influenza, gastroenteritis o, inclusive, fiebre tifoidea, fiebre reumática o meningitis bacteriana, por lo que si el personal de salud no está alerta sobre esta posibilidad puede errar en el diagnóstico.

Primeros Síntomas de la Malaria

Adultos	Niños
Fiebre, sudores y escalofríos	Tos
Sentimiento de debilidad	Respiración corta y rápida
Letargo e incomodidad	Convulsiones por fiebre
Mareos, vómito	
Dolor muscular y abdominal	
Diarrea	

La malaria causada por *P. falciparum* y no tratada puede provocar la muerte en pocas horas (alrededor de 24 hrs.), razón por la que es muy importante sospechar de este evento en cualquier paciente con antecedentes de viajes o residencia en áreas endémicas. En estos casos la anemia puede ser lo bastante grave como para poner en riesgo la vida del paciente ó puede ocurrir falla renal o pulmonar aguda.

Características de la malaria severa o complicada

Adultos	Niños
Malaria cerebral: pérdida del conocimiento, convulsiones, espasmos musculares causando arqueado del cuerpo, rostro pálido	Malaria cerebral: pérdida del conocimiento, convulsiones, espasmos musculares causando arqueado del cuerpo, rostro pálido
Mal funcionamiento de los riñones: baja eliminación de orina (menos de 400ml por día.	Dificultad respiratoria: respiración profunda.
Líquido en los pulmones: "Respiración corta, dificultosa o rápida, falta de oxígeno en los tejidos.	Bajos niveles de glucosa en la sangre: comportamiento inquieto/agresivo, coma, convulsiones y sudo.

Las mujeres embarazadas están más expuestas a complicaciones. El sistema inmune de la embarazada está debilitado y los efectos adversos pueden afectar a la madre y al feto.

Consecuencias de la malaria en el embarazo

Madre	Feto
Riesgo incrementado de malaria severa.	Aborto, nacimiento de un bebé muerto
Riesgo incrementado de muerte, especialmente si es el primer embarazo.	Bajo peso corporal del bebé.
Sepsis o sangrado después del parto.	Crecimiento retardado del feto.
Es más fatal que en mujeres no embarazadas	Parto prematuro y bebé nacido con malaria.



Las infecciones por *P. vivax* son muy debilitantes y este plasmodio presenta la particularidad de mantener formas "durmientes" (hipnozoitos) en el hígado, lo que da la posibilidad de recurrencia de la enfermedad. La complicación más grave es que, por el aumento del tamaño del bazo (esplenomegalia), se produzca la ruptura del órgano con la hemorragia interna concomitante. Generalmente, *P. vivax* no causa la muerte.

Si no se trata adecuadamente, la enfermedad provocada por *P. falciparum* puede evolucionar hacia un cuadro grave cuya manifestación más importante es una encefalopatía aguda o paludismo cerebral. Los glóbulos rojos infectados por este parásito, se tornan adhesivos y se pegan en las paredes de los vasos capilares como los del cerebro. El paciente entra en coma y, si sale de éste, puede quedar con daño cerebral permanente. La muerte por paludismo cerebral puede ocurrir en las 24 horas después de presentar los primeros síntomas; o sea, antes de poder llegar al médico. Por tal razón, es indispensable el tratamiento inmediato del paludismo por *P. falciparum*, aún en los casos leves, porque pueden aparecer rápidamente complicaciones irreversibles.

1.8 Epidemiología en Guatemala

El comportamiento del paludismo en Guatemala es endémico, geográficamente se distribuye en 20 departamentos, únicamente Totonicapán y Sacatepéquez aun no reportan casos de malaria. La transmisión de malaria presentó un descenso importante en Guatemala entre los años 2005 y 2008 (81.87%), a partir de entonces se ha tenido un descenso sostenido, teniendo una reducción del 32% entre el 2012 y el 2014.

En el 2015, 93 % de los casos de malaria se concentraron en 5 áreas de salud: Escuintla (66 %), Alta Verapaz (15 %), Izabal (7 %), Suchitepéquez (3%), Retalhuleu (2%); constituyéndose estas áreas de salud en el grupo prioritario para las intervenciones, tanto de búsqueda de casos como de control en general. Las 22 áreas restantes representan el 7% de los casos.

A pesar de la reducción en el número de casos de malaria y en los índices malariométricos, lograda en los últimos años, el cambio climático, la receptividad o mantenimiento de las condiciones ecológicas y ambientales propicias para la transmisión de la malaria en varias áreas geográficas del país, constituyen un riesgo permanente para el recrudecimiento de la misma. En estas áreas persisten criaderos extensos, producto de las lluvias o del rebalse de los ríos, con riesgo considerable de elevación de densidades de las poblaciones adultas del vector y la posibilidad de ocurrencia de brotes en áreas de pre eliminación.

La situación de Escuintla durante el 2015 continua siendo de alta endemicidad; el 94 % de la malaria de esa área de salud, se concentra en 5 distritos, siendo en Masagua donde se presentaron los 36 casos de *P. falciparum* del país.



Se contempla la implementación de un mecanismo efectivo de vigilancia, un eficiente sistema nacional de registro, notificación y reporte inmediato de casos; investigación epidemiológica de todos los casos y la capacidad de detección temprana y respuesta rápida en el abordaje de brotes de malaria. Siendo la red de laboratorios para el diagnóstico de malaria el pilar de los servicios de salud para la detección temprana y diagnóstico de calidad para el tratamiento efectivo de los casos de malaria.

1.9 Indicaciones para realizar la toma de muestra para el diagnóstico de malaria según el manual de normas de atención de MSPAS:

Signos y Síntomas. Antecedentes de vivir o haber viajado a un área endémica que presenta los siguientes signos y/o síntomas:

- Fiebre que se repite cada 2 ó 3 días
- Sudoración y escalofríos

Más uno o varios de los siguientes:

- Malestar general
- Hepato-esplenomegalia
- Anemia.

Laboratorio. Gota gruesa en el primer contacto con el paciente, la cual debe ser examinada en las primeras 72 horas.

1.10 Lineamientos para el diagnóstico oportuno y vigilancia epidemiológica

Los lineamientos para el diagnóstico oportuno se basan en el Protocolo de Vigilancia Epidemiológica del Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Por lo tanto se recomienda su lectura y estudio.

El diagnóstico oportuno es aquel que es realizado en menos de 72 horas; es decir, desde el momento toma de muestra hasta su diagnóstico y tratamiento. Por esta razón es indispensable buscar la organización comunitaria para el traslado oportuno de la muestra hasta el laboratorio respectivo o bien mediante el uso de pruebas rápidas donde no existe laboratorio cercano.

1.10.1 Diagnóstico pasivo

Es aquel que se realiza por demanda, es decir que la persona afectada llega al lugar de toma de muestra para realizarse una prueba.

1.10.2 Diagnóstico activo

Es el que se realiza en búsqueda de casos, cuando hay un brote o bien en algún estudio especial.

CAPITULO 2

BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Trabajar con muestras de sangre aumenta el riesgo de enfermarse por la exposición a los agentes biológicos, ya sea a través de accidentes con agujas o materiales punzocortantes contaminados, aerosoles, manejo de material contaminado o por falta de vacunación. El personal que participa a lo largo de los procesos para el diagnóstico de malaria debe aplicar las siguientes normas de Bioseguridad.

2.1 Medidas de protección

- No comer, no fumar, no beber ni maquillarse en áreas donde se manipulan muestras.
- No tocarse los ojos, nariz u otras mucosas expuestas, ni la piel con los guantes puestos.
- Está prohibido colocar alimentos y bebidas dentro de termos o refrigeradoras que sirvan para el transporte y almacenamiento de muestras respectivamente.
- Usar guantes y bata blanca de manga larga abotonada cada vez que maneje sangre o productos de sangre.
- Antes de colocarse los guantes, cubrir cualquier corte o herida de las manos con bandas adhesivas (curitas).
- La bata de trabajo debe quitarse antes de salir del laboratorio.
- Los objetos afilados y punzantes (punzo cortante) deben manejarse con sumo cuidado.
- Nunca utilizar lancetas o agujas más de una vez.
- Lavarse las manos cada vez que sea necesario. Se aconseja que sea antes y después de tomar la muestra, cuando se observe presencia de sangre en el guante y antes de salir del laboratorio.
- Clasificar adecuadamente los desechos. (ver inciso 2.2).
- Descontaminar los desechos (ver inciso 2.3).
- Realizar una desinfección y limpieza adecuada de superficies y derrames (ver inciso 2.4 y 2.5).
- Asegurarse que las láminas estén bien secas antes de empacarlas, nunca juntar dos láminas aunque sean del mismo paciente

2.2 Clasificación de desechos

- El material punzocortante debe descartarse dentro de una caja de plástico duro o en cualquier otro recipiente que no se perfora por su contenido.
- El descarte de objetos no punzocortantes pero contaminados con sangre debe ser en bolsa roja gruesa o en bolsa gruesa rotulada como “biopeligroso”.
- El descarte de basura común debe realizarse en una bolsa negra o bolsa común.



2.3 Descontaminación

La descontaminación es un tratamiento necesario para el descarte de desechos contaminado con sangre. Para este procedimiento se agrega cloro al 1% (ver preparación en inciso 2.6) al recipiente que contiene el material contaminado. En caso de incineración de los desechos, **NO tratarlos con cloro**, solamente incinerarlos.

2.4 Limpieza y desinfección de superficies

- Se inicia la limpieza con cloro al 1% (Ver preparación en inciso 2.6). Secar con papel absorbente.
- Luego se desinfecta con alcohol etílico al 70%. Secar con papel absorbente.
- Este procedimiento se debe realizar antes de iniciar y al finalizar el trabajo diario.

2.5 Limpieza y desinfección de derrames

En caso de derrame accidental de muestras de sangre se debe hacer lo siguiente:

- Colocarse los guantes. Utilizarlos a lo largo de todo el proceso.
- Colocar papel absorbente sobre el derrame.
- Cubrir el papel absorbente con cloro al 1%.
- Dejar actuar por 15 minutos.
- Recoger este papel y descartarlo en bolsa roja.
- Continuar con el procedimiento descrito en el inciso 2.4.

2.6 Preparación de cloro al 1%

Generalmente el cloro comercial (hipoclorito) se encuentra a una concentración del 5% (p/v). Por tal razón, para el cloro al 1% se hace una dilución 1 en 5, es decir, se mezcla una (1) parte de cloro por cuatro (4) partes de agua.

2.7 Acción en caso de accidentes de laboratorio

En caso de cortarse o punzarse con material contaminado es indispensable que provoque el sangrado de la herida. Luego lavar la herida con suficiente agua y jabón. Proceder a desinfectar con alcohol etílico al 70%. Vendar la herida. Realizar consulta y notificación del caso al personal médico y jefe inmediato superior.

En caso de derrame accidental de sangre sobre piel intacta o sobre banda adhesiva, lavarse con suficiente agua y jabón. Proceder a desinfectar con alcohol etílico al 70%.

Nota: Para los trabajadores de campo y colaboradores voluntarios que apoyan en la toma de muestra, es importante que utilicen guantes como protección personal.

Todos los desechos generados, tales como lancetas y guantes, deben ser descartados adecuadamente.

CAPITULO 3

TOMA DE MUESTRA Y PREPARACIÓN DE EXTENDIDOS DE SANGRE

En el diagnóstico microscópico de paludismo se utilizan dos tipos de extendidos sanguíneos: gruesas y finas.

Gota gruesa

Utilizada para detectar al parásito, debido a sus múltiples capas de glóbulos rojos y blancos. Durante la tinción, la hemoglobina de los glóbulos rojos se disuelve (deshemoglobinización), de esta forma puede examinarse grandes cantidades de sangre, rápida y fácilmente. De estar presentes los plasmodios en esta extensión, están más concentrados y son más fáciles de ver e identificar.

Frotis

Consiste en una única capa de glóbulos rojos y blancos extendidos sobre menos de la mitad del portaobjetos y es utilizada para la confirmación de la especie de los plasmodios cuando no se consiga hacerlo en la gota gruesa.

La mejor muestra para la preparación de la gota gruesa y extendido fino es sangre periférica obtenida por pinchazo con lanceta y antes de recibir tratamiento antipalúdico.

Es importante mencionar que de obtenerse resultado negativo de un paciente que posea evidencia clínica y epidemiológica de la enfermedad, se debe tomar una o dos muestras consecutivas durante o después del episodio de fiebre, debido a que en la infección de *P. falciparum* solamente circulan los estadios más jóvenes, después de la ruptura del esquizonte.

Para la confirmación de casos en malaria complicada y casos de muerte por malaria, el personal forense o patólogo debe referir al LNS sangre completa con anticoagulante y necropsia de órganos (cerebro, hígado) en frasco estéril sin preservantes, en cadena de frío, respectivamente.

3.1 Preparación del material

Se debe contar con el siguiente material:

- Alcohol Etilico al 70% para desinfección
- Algodón absorbente o gasa para limpiar el área.
- Lancetas estériles nuevas.
- Láminas porta objetos nuevos, limpios y libres de grasa.
- Guantes desechables para evitar contacto con la sangre.
- Bata blanca de manga larga con botones.

- Material para descarte de material utilizado (caja de bioseguridad, bolsa roja, bolsa negra).
- Lápiz para rotular las muestras.
- Boletas de solicitud de examen (una por cada paciente, ver anexo 1).

3.2 Preparación del paciente

- Luego de registrar los datos del paciente en el formulario o libro adecuado, explicar al paciente lo que se le va a realizar y por qué se le realizará de esa manera.
- Pedir al paciente que se siente proporcionándole una silla y que coloque su brazo sobre una mesa o escritorio.
- Colocarse los guantes desechables para evitar el contacto con la sangre.

3.3 Procedimiento

- Sostener la mano izquierda del paciente, con la palma hacia arriba.
- Seleccione el dedo anular (dedo No.4), para ello haga que el paciente extienda el dedo seleccionado y flexione los demás. En niños pequeños puede usarse el dedo gordo del pie o el talón, también puede usarse el lóbulo de la oreja.

Figura 3.1 Selección del dedo anular.



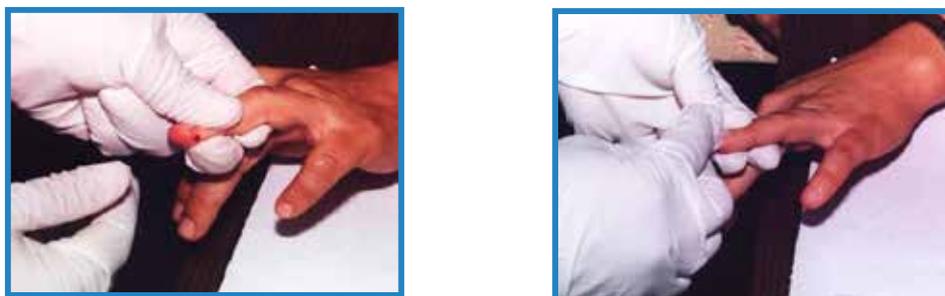
- Limpiar el dedo con una torunda de algodón, ligeramente humedecida en alcohol para limpiar y desinfectar el área.

Figura 3.2 Limpieza del dedo.



- d) Dejar secar el alcohol del dedo.
- e) Sostener el dedo del paciente con la mano izquierda manteniendo una suave presión para favorecer la salida de la sangre.
- f) Pinchar con la lanceta estéril, el costado del dedo elegido. Hacerlo con un movimiento rápido y firme. **NOTA:** Se elige el costado del dedo ya que es donde la sensibilidad es menor.
- g) Dejar salir la primera gota de sangre, limpiándola con una torunda de algodón seca, retirando cualquier fibra de algodón que pueda permanecer en el dedo para que esta no se mezcle con la sangre.

Figura 3.3 Limpieza de la primera gota



- h) Colectar una a dos gotitas de sangre. Colocarlas en contacto con el primer tercio de la superficie de una lámina porta objetos, la cual servirá para la gota gruesa.
- i) Luego colocar una segunda gotita de sangre (más pequeña que la del inciso anterior) en el segundo tercio de la lámina, la cual servirá para preparar un frotis y, en el cual, se rotulará la muestra.

Figura 3.4 Toma de muestra



- j) Limpiar la sangre restante del dedo con una torunda de algodón humedecida con alcohol. Indicar al paciente que la presione contra el lugar de la punción hasta que la sangre deje de salir.

3.4 Preparación de frotis:

Sobre la segunda gota de sangre, colocar otra lámina porta objeto (lámina auxiliar) en un ángulo de 45°. Asegurarse que se disperse sangre en todo el borde de la lámina auxiliar. Extender rápidamente a lo largo de la lámina porta objeto que tiene las muestras. La gota se debe dispersar en 1/3 del porta objetos.

Figura 3.5 Preparación de frotis



3.5 Preparación de gota gruesa:

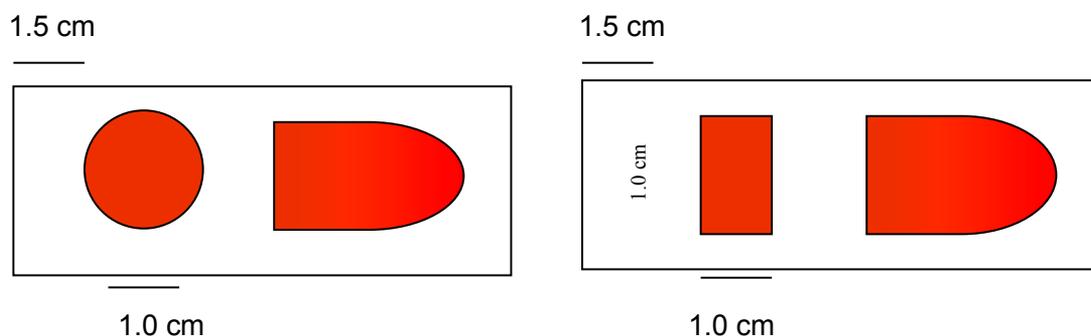
Utilizando uno de los ángulos de la lámina auxiliar, esparcir rápidamente la gota de sangre y extenderla uniformemente hasta formar una gota gruesa de 1 cm de lado ó de diámetro. La sangre no debe ser excesivamente revuelta, es suficiente con 3 a 4 movimientos. De preferencia, realizar el homogenizado de la muestra en una sola dirección.

La lámina auxiliar para preparar la gota gruesa y el frotis se debe de limpiar con alcohol etílico para poderla utilizar para colocar sobre ella la siguiente muestra.

No utilice la misma lámina auxiliar para preparar más de una muestra, sin previa limpieza de la misma.

La lámina con gota gruesa y frotis debe seguir cualquiera de los patrones mostrados en la figura 3.6.

Figura 3.6 Lámina con gota gruesa y frotis



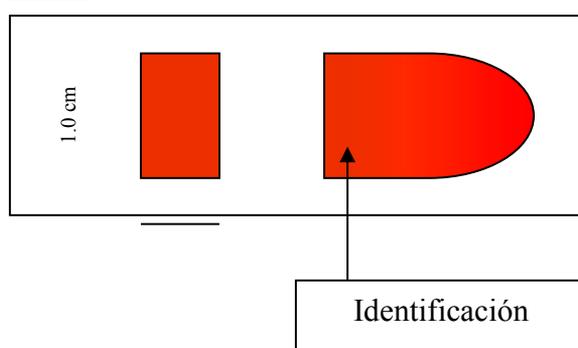
3.6 Secado de la muestra:

Deje secar sus frotis y gotas gruesas a temperatura ambiente, protegidas del polvo, la luz solar directa y de los insectos. El tiempo para secado del frote es de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. El calor fija la gota gruesa por lo que no debe acelerarse el proceso de secado por métodos mecánicos (hornos, lámparas etc.). En climas cálidos y húmedos la auto fijación de las muestras ocurre muy rápidamente, por ello deben ser coloreadas lo más pronto posible.

3.7 Identificación de la muestra y la boleta de solicitud de examen:

Se debe tener un cuidado especial para la identificación de la muestra, siendo necesario cumplir con este requisito antes de tomar una nueva muestra. El frote o la gota gruesa deben de tener la clave del microscopista según el código del PNETV que refiere la muestra y el número correspondiente del paciente. Este dato debe de ser anotado con un lápiz de grafito (nunca con bolígrafo o pluma) y debe de colocarse en la base del frotis.

Figura 3.7 Lámina con gota gruesa y frotis

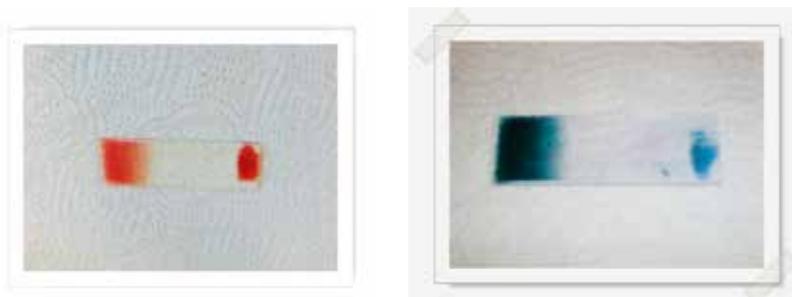


Los datos que van en la boleta de solicitud deben de coincidir con los datos que aparecen en la lámina. Además, la boleta debe tener completos los datos del paciente y de la persona que envía la muestra (Anexo 1).

3.8 Errores más comunes al preparar las muestras:

- Muestra mal colocada: si se deposita la muestra cerca de los extremos de la lámina, será difícil su examen microscópico. Además una proporción de la muestra puede rayarse y hasta desaparecer durante el proceso de coloración.

Figura 3.8 Láminas con muestra mal colocada



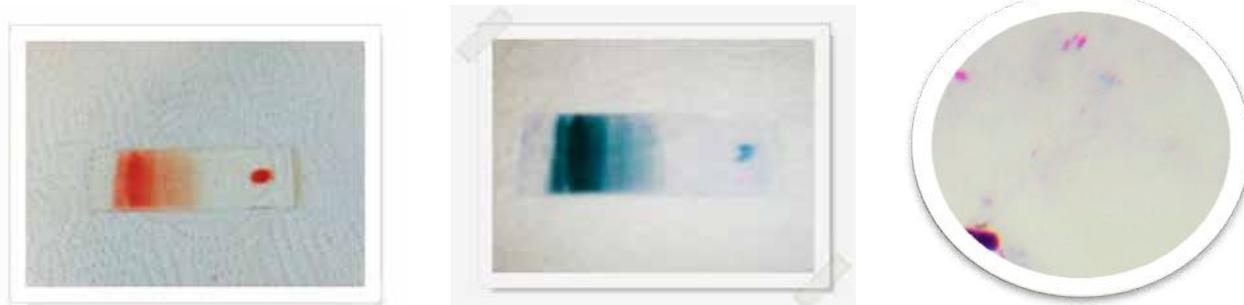
- Exceso muestra: al colorear la lámina con mucha sangre, la gota gruesa se observa demasiado azul ya que no se deshemoglobinizan todos los glóbulos rojos, habrá numerosas células blancas por campo y estos factores pueden oscurecer los campos o cubrir algunos parásitos presentes. Además, los glóbulos rojos pueden estar unos encima de otros imposibilitando el examen.

Figura 3.9 Láminas con exceso muestra



- Poca muestra: si se coloca poca sangre en la preparación, no habrá suficientes células blancas por campo y no se examinará suficiente cantidad de sangre, disminuyendo la probabilidad de encontrar parásitos (disminución de la sensibilidad de la prueba).

Figura 3.10 Láminas con poca muestra



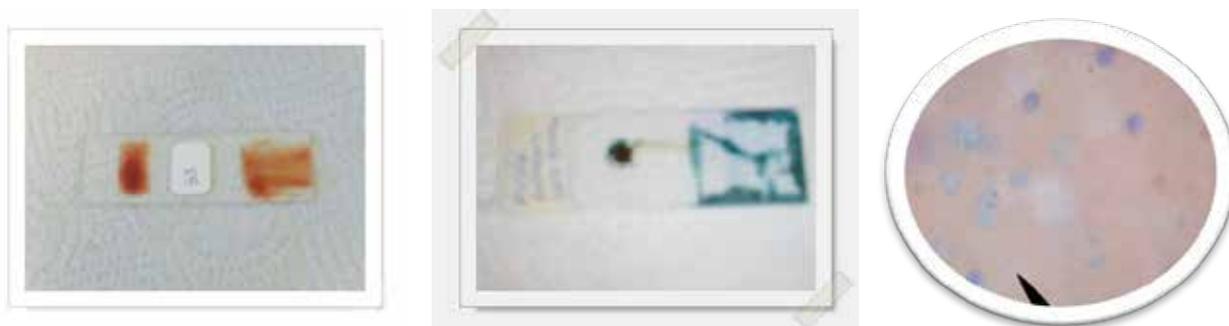
- Guardar las muestras en condiciones inadecuadas
- Preparar las muestras sobre láminas mal lavadas o en láminas rayadas: lo que causará que el extendido presente un patrón irregular.

Figura 3.11 Láminas mal lavadas



- Teñir las muestras mucho tiempo después de obtenerlas, lo que hace difícil la coloración y obtiene resultados insatisfactorios.

Figura 3.12 Láminas teñidas después de mucho tiempo de obtenerlas



3.9 Transporte de muestras:

Se debe esperar que las muestras se sequen completamente antes de proceder a envolverlas en su respectivo formulario E1. La muestra hemática se envía al laboratorio más cercano tan pronto como sea posible, utilizando para tal motivo los cajas porta láminas que debe proveer la Dirección de Área, los cuales tienen capacidad para distinto número de láminas (desde 1 hasta 100).

Si no se cuenta con las cajas porta láminas, pueden envolverse las muestras en un papel grueso, bien identificado y colocados en una caja de cartón grueso previamente identificado. Se debe evitar que durante el transporte las muestras no se expongan a temperaturas extremas o golpes.



3.10 Recepción de muestras en el laboratorio:

Al recibir las muestras el laboratorio debe de observar: que las muestras estén bien identificadas con la clave del servicio y el número del paciente; que éstas coincidan con los datos proporcionados por las boletas de solicitudes. Cada muestra debe llevar su respectiva boleta.

Toda muestra de primer examen de áreas no endémicas, con personal no entrenado en el diagnóstico microscópico, que se desee enviar al Laboratorio Nacional de Salud, tiene que ser canalizado a través de su respectiva Dirección de Área.

3.11 Registro:

Es necesario llevar un registro de todas las muestras que procesen en el laboratorio, utilizando un espacio para cada paciente. En el anexo No. 2 está el Formulario SIGSA L-1 que es la hoja de registro de exámenes positivos realizados en el diagnóstico de malaria.

3.12 Criterios de rechazo de muestras en el laboratorio para diagnóstico primario

Es fundamental para la obtención de un diagnóstico de calidad que la muestra al igual que la información requerida del paciente se haya recolectado correctamente. A continuación se describen los criterios para rechazo de muestras:

- Gota gruesa y extendido fino sin el respectivo formulario de notificación (E1 o ficha epidemiológica) o viceversa.
- Gota gruesa y extendido fino sin clave de identificación en la lámina.
- La identificación de la gota gruesa y extendido fino no concuerdan con la información proporcionada en el formulario de notificación E1 o ficha epidemiológica.

CAPÍTULO 4 COLORACION DE LA MUESTRA

4.1 Coloración de Giemsa:

Es el método específico para la tinción de parásitos de la sangre. El colorante de Giemsa es una mezcla de colorantes (eosina y azul de metileno), la solución debe conservarse totalmente protegida del aire con el fin de evitar su hidratación. Coloreando los componentes acidófilos (cromatina) rojizos y basófilo (citoplasma) azul (Anexo 3).

4.1.1 Preparación del colorante para su uso

Hacer una dilución del colorante de Giemsa 1 en 5, una parte del colorante de Giemsa y cuatro partes de agua bufferada (o agua desmineralizada).

Figura 4.1

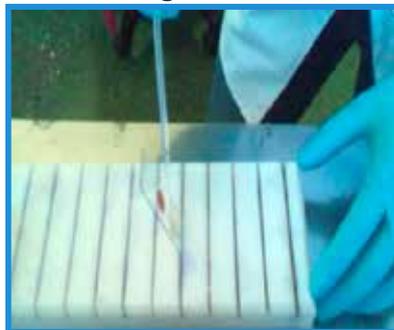


4.1.2 Tratamiento antes de colorear:

Ambas muestras deben de estar bien secas antes de colorear.

- Frotis: cubra con alcohol metílico absoluto por 30 segundos para fijar (ver figura No. 4.2).
- Gota gruesa: **No** necesita fijación.
- Dejar secar a temperatura ambiente y se procede a la coloración. Las láminas se dejan secar en posición vertical.

Figura 4.2



4.1.3 Procedimiento de coloración

- Colocar un par de varillas de vidrio sobre un lavatrastos o un recipiente adecuado de tal forma que facilite la eliminación de los líquidos que se usarán.
- Colocar las láminas a teñir en posición horizontal sobre las varillas
- Verter la solución del colorante sobre las láminas hasta que este cubra la muestra. Dejar reposar por cinco minutos (ver figura No. 4.3).

Figura 4.3



- Descartar el colorante en el lava trastos y posteriormente lavar las láminas con el agua bufferada (ver figura No. 4.4).

Figura 4.4



- Dejar secar las láminas de forma que queden inclinadas. (ver figura No. 4.5).

Figura 4.5

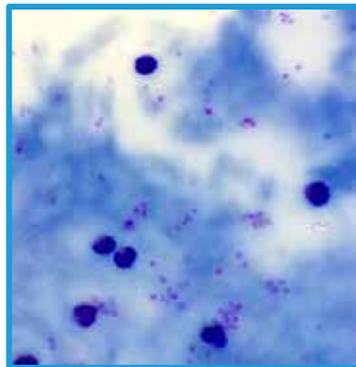


4.2 Estandarización de la coloración

La estandarización de la coloración es parte del control de calidad interno que se debe realizar para garantizar coloraciones óptimas y se realiza cuando se cambia de lote en uno de los componentes de la coloración (Anexo 4).

El proceso se puede hacer con sangre negativa debido a que el tiempo indicado lo dan las plaquetas. Por lo tanto, se procede a realizar 3 o 4 gotas gruesas negativas, las cuales se secan y se colorean. Por ejemplo, si el tiempo con el que se estaba trabajando era de 10 minutos, se puede aplicar la siguiente serie de tiempos para las cuatro gotas gruesas elaboradas: 8, 10, 12 y 14 minutos. La coloración será aquella en la cual las plaquetas se observen bien teñidas, pero que se observen “coposas o esponjosas”, es decir, con un fino punteado y en ocasiones se pueden observar sus prolongaciones. Ver figura 4.6 La coloración que aún no tiene el tiempo indicado se evidencia con la presencia de plaquetas teñidas pero con aspecto liso. Se ha de tener precaución con la presencia de precipitado el cual es un factor indeseable

Figura 4.6





CAPÍTULO 5

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

El diagnóstico microscópico de malaria se hace demostrando la presencia de parásitos en la muestra hemática del paciente y para hacerlo, se debe observar en el microscopio los extendidos sanguíneos coloreados con Giemsa. Para poder realizar un diagnóstico adecuado, es necesario conocer los diferentes elementos que se observan en la sangre que son: células sanguíneas, microorganismos y artefactos.

5.1 Células normales de la sangre:

5.1.1 Glóbulo rojo o eritrocito:

La forma de un glóbulo rojo se describe como un disco bicóncavo sin núcleo y son los componentes más abundantes en una muestra hemática. Los glóbulos rojos en el frotis, teñidos adecuadamente con Giemsa, se observan de color rosado-grisáceo pálido. Sin embargo en la gota gruesa, el agua de la solución del buffer disuelve el contenido de los glóbulos rojos (hemoglobina) y esto es lo que se refiere a deshemoglobinización. Por lo anterior, en una gota gruesa teñida con Giemsa, **NO SE DEBEN OBSERVAR** glóbulos rojos

5.1.2 Glóbulo blanco o leucocito:

Cada leucocito tiene un núcleo rodeado de citoplasma. Algunas veces el citoplasma tiene apariencia granular; los núcleos pueden ser de varios lóbulos o de uno sólo, se tiñen de forma distinta unos de otros. De acuerdo a su clasificación se dividen en:

Leucocitos multilobulados, se dividen en:

- **Neutrófilos:** son la mayor cantidad de glóbulos blancos en una persona sana. Tienen gránulos bien definidos en el citoplasma y su núcleo se tiñe de morado profundo. En casos de malaria, es común observar neutrófilos conteniendo pigmento residual marrón oscuro del parásito fagocitado.
- **Eosinófilos:** constituyen del 1 a 4% del conteo total de glóbulos blancos en la sangre de una persona sana. Es muy característico ya que los gránulos que contiene adquieren color rojo con la tinción.
- **Basófilos:** son leucocitos muy escasos, constituyen menos del 1% del conteo total. Luego de teñirlos, pueden verse grandes gránulos azules en el citoplasma.

Leucocitos no multilobulados, se dividen en:

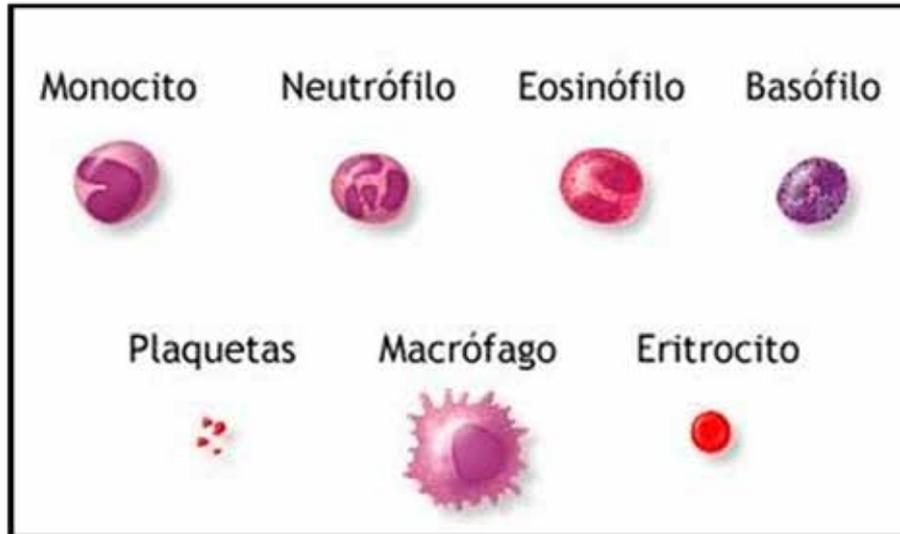
- **Monocitos:** son los glóbulos blancos más grandes. Poseen un gran núcleo en forma de riñón o frijol y el citoplasma puede contener unos cuantos gránulos que se tiñen de color rosado o rojo. Al igual que los neutrófilos, pueden fagocitar parásitos de malaria.

- **Linfocitos:** hay linfocitos grandes y pequeños. El núcleo de los linfocitos es redondo y se tiñe de color azul oscuro y el citoplasma se tiñe de color azul o celeste. Los linfocitos grandes pueden contener unos cuantos gránulos azul oscuro. Los linfocitos pequeños son solo un poco más grandes que un glóbulo rojo normal y tienen muy poco citoplasma.

5.1.3 Plaquetas (trombocitos):

Las plaquetas son cuerpos pequeños que se tiñen de color rojo o lila, tienen forma irregular y no tienen núcleo. Frecuentemente aparecen en grupos de 5 a 10 pero pueden conglomerarse en mayor número si no se realizó una extracción de sangre adecuada o el frote no se hizo bien. Es importante ser capaz de identificarlos ya que pueden ser confundidos con parásitos de malaria por microscopistas con poca experiencia.

Figura 5.1 Células sanguíneas



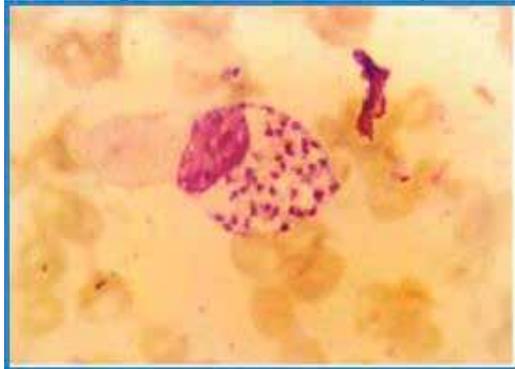
Fuente: www.nlm.nih.gov

5.2 Otros microorganismos:

En las muestras también se pueden detectar otros parásitos o microorganismos, los cuales deben ser informados. A continuación se describen brevemente algunos microorganismos que se pueden detectar en la gota gruesa y/o extendido fino.

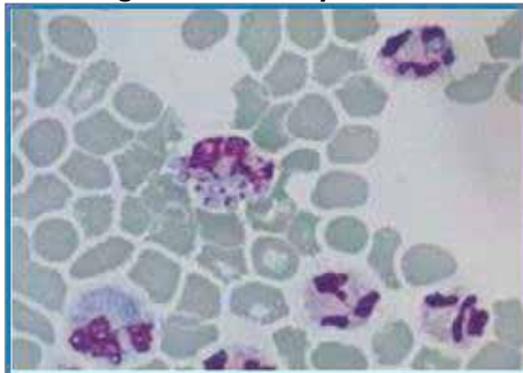
- ***Leishmania* sp:** Los amastigotes de *Leishmania* sp. se pueden observar libres o intracelulares en monocitos. Tienen una forma esférica a ovoide; contienen un núcleo grande y un kinetoplasto (esto es ADN extranuclear) de forma ovoide o de barra (Figura 5.2).

Figura 5.2 *Leishmania* sp.



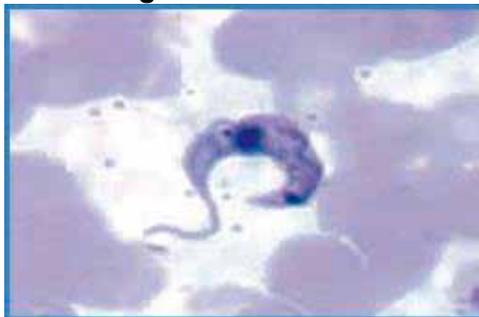
- ***Histoplasma capsulatum***: las esporas de *H. capsulatum* se pueden observar libres o intracelulares en leucocitos polimorfonucleares o mononucleares; tienen una forma esférica a ovoide y contienen un núcleo grande (Figura 5.3).

Figura 5.3. *H. capsulatum*



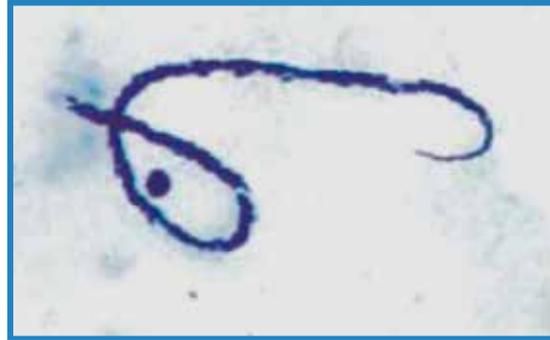
- ***Trypanosoma cruzi***: los tripomastigotes de *T. cruzi* poseen un núcleo central y un kinetoplasto subterminal en el extremo posterior del parásito. El flagelo, adherido al cuerpo a través de una membrana ondulante, abandona el cuerpo en el extremo anterior (Figura 5.4).

Figura 5.4. *T. cruzi*



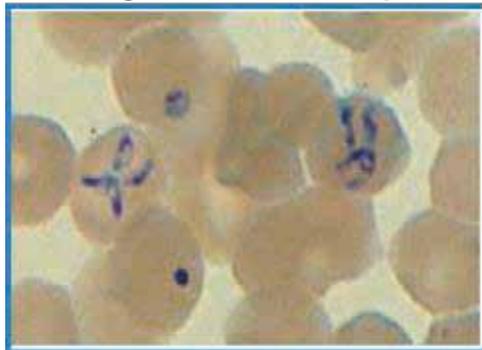
- **Microfilarias:** Existen ocho especies de filarias (nemátodos) que infectan varios tejidos del ser humano. Los parásitos pueden vivir varios años y las hembras producen microfilarias que circulan por la sangre y otros tejidos. La microfilaria que se observa en la figura es *Mansonella ozzardi* (Figura 5.5).

Figura 5.5 Microfilaria



- **Babesia sp.:** Este parásito, al igual que *Plasmodium*, infecta eritrocitos. Tiene formas múltiples: anillo, pera, huso, redonda, ameboide. Puede observarse individual, en parejas o múltiples de dos (tétradas), dependiendo de la especie (Figura 5.6).

Figura 5.6 Babesia sp.

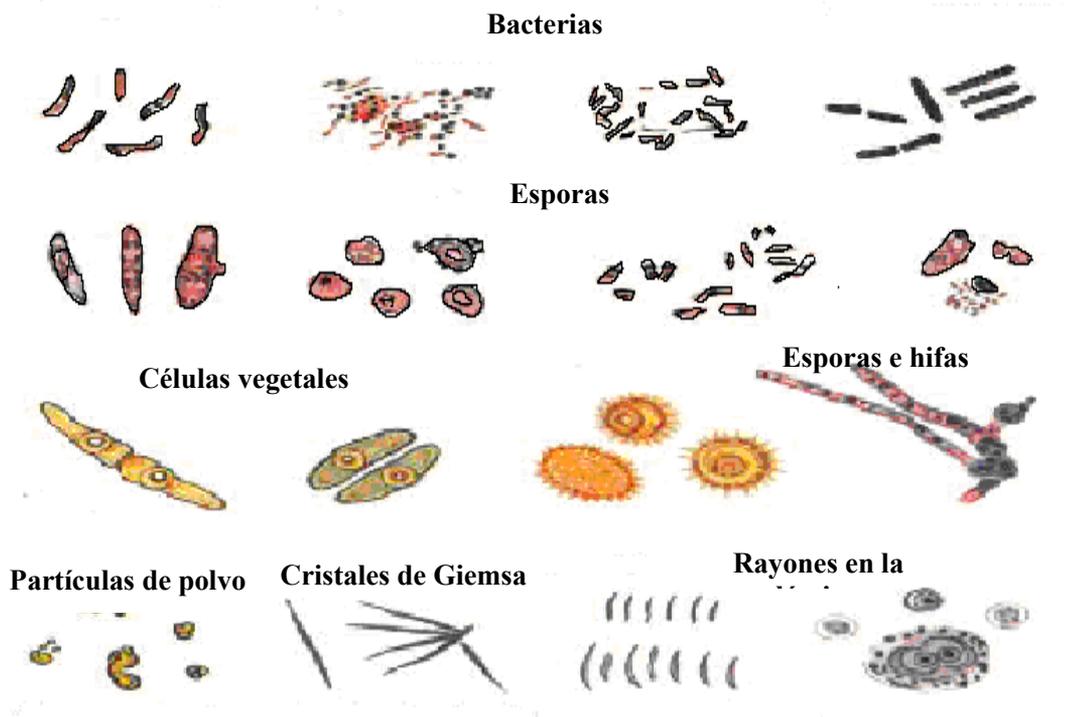


5.3 Artefactos:

Las muestras sanguíneas en gota gruesa y extendido fino pueden demostrar algunas características que producen confusión y dificultan el diagnóstico. Estas características se conocen como artefactos. Dentro de los artefactos pueden estar: colorante precipitado, restos de piel del paciente, polvo, bacterias, células vegetales, levaduras y esporas.

Para prevenir la presencia de artefactos es importante: filtrar el colorante, cubrir el extendido sanguíneo mientras se seca, no contaminar el colorante, guardar las láminas protegidas del sol y humedad.

Figura 5.7 Artefactos comunes en extendidos sanguíneos



Geneva 1991. Sitio Web: <http://www.who.int>.

5.4 Observación *Plasmodium* sp.

Según la OMS y los Centros para Control y Prevención de Enfermedades (CDC de sus siglas en inglés, Centers for Disease Control and Prevention) se deben emplear dos extendidos sanguíneos para el correcto diagnóstico de malaria siendo estos:

Gota gruesa: extendido sanguíneo que posee más sangre por campo en comparación con el frotis, incrementándose así la posibilidad de detectar parásitos. Se utiliza para determinar la presencia o ausencia de parásitos así como para realizar el cálculo de la densidad parasitaria. Para la observación de las láminas, se debe iniciar con la gota gruesa. Si se observan parásitos en la gota gruesa, proceder a examinar el frotis. Posee la utilidad de ayudar a determinar la gravedad de la enfermedad y es en la evaluación de la respuesta al tratamiento

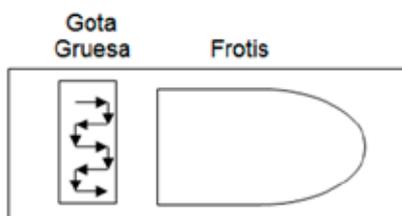
Frote: extendido de sangre fino el cual se utiliza para identificar la especie de *Plasmodium* sp. El frote tiene la ventaja sobre la gota gruesa (debido al proceso de coloración) de conservar los glóbulos rojos, lo que facilita la observación de las características morfológicas de los parásitos presentes por lo que es útil en la diferenciación de las especies. En el frotis no es posible realizar la cuantificación parasitaria, únicamente la ausencia o presencia del *Plasmodium*.

5.4.1 Examen de la gota gruesa:

Después del proceso de coloración con Giemsa, el fondo debe aparecer limpio, exento de residuos, los parásitos deben encontrarse en forma libre y aparecer teñidos con la cromatina (núcleo) rojo oscuro y el citoplasma azul purpúreo pálido, su morfología podría deformarse. Se deben observar leucocitos o glóbulos blancos teñidos de púrpura oscuro intenso. La observación microscópica debe ser cuidadosa antes de identificarlos, enfocando y usando el tornillo micrométrico cada vez que se mueva un campo microscópico (Anexo 5). **Por este motivo, la gota gruesa es útil para el diagnóstico y para el recuento parasitario.**

Para el examen en la gota gruesa, desplazar la lámina siguiendo el movimiento en zigzag (ver figura 5.8). Recordar usar el ajuste fino para enfocar, accionando el tornillo micrométrico hacia delante y atrás, con el fin de observar el mayor número posible de capas sanguíneas. Se debe observar 100 campos microscópicos óptimos a un aumento final de 1000 (lente de inmersión 100x). Si se encuentran parásitos, se debe realizar el cálculo de la densidad parasitaria según lo normado en el **Capítulo 6** del presente manual.

Figura 5.8 Movimiento en zigzag en la gota gruesa

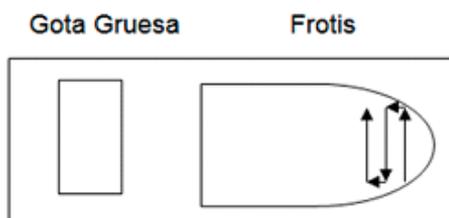


5.4.2 Examen del frotis de sangre

Este examen requiere mayor tiempo de observación en comparación con la gota gruesa, debido a que la concentración de los parásitos sanguíneos es mucho menor. **Es en este extendido sanguíneo donde se realiza la identificación de la especie del parásito.** La forma para distinguir los parásitos está descrita más adelante.

Para observar el frotis se debe enfocar y examinar la película de sangre siguiendo el movimiento de zigzag (Figura No. 5.9).

Figura 5.9 Movimiento en zigzag en el frotis



NOTA: Cuando la parasitemia es menor de media cruz (+/2) ó menor de 100 parásitos/ul (ver Capítulo 9), es poco probable encontrar parásitos en el frotis. Por tal motivo y **SOLAMENTE EN ESTE CASO**, bastará con identificar la especie en la gota gruesa.

Los parásitos de malaria, coloreados con Giemsa, tienen el núcleo (cromatina) generalmente redondo y de color rojo intenso; el citoplasma toma diferentes formas (desde una forma de anillo a una totalmente irregular) y se colorea siempre de azul (aunque la tonalidad puede variar ligeramente, azul violáceo hasta azul cielo); también se observa un pigmento amarillo pálido o castaño oscuro o negro (dependiendo de la especie y de las formas maduras del parásito).

Las características en los diferentes estadios de los parásitos que se observan en la gota gruesa y frotis se muestran en las tablas y figuras siguientes.

Tabla 5.1 Características morfológicas de *Plasmodium vivax*

ESTADÍO	MORFOLOGÍA DEL PARASITO	MORFOLOGÍA DEL ERITROCITO
Trofozoito inmaduro (en anillo)	Citoplasma grande con pseudópodos ocasionales. Punto grande de cromatina.	Un poco más grande, redondo, ocasionalmente con finos gránulos de Schüffner.
Trofozoito maduro	Citoplasma ameboideo grande, cromatina grande, pigmento fino café amarillo (pigmento palúdico).	Ligeramente agrandado puede estar distorsionado, con finos gránulos de Schüffner.
Esquizonte	Grande, puede llenar todo el eritrocito, la forma madura puede contener 16 a 18 merozoítos; pigmento fino café amarillo (pigmento palúdico).	Ligeramente agrandado puede estar distorsionado, con finos gránulos de Schüffner.
Gametocito	Redondo a oval, compacto. Puede llenar todo el eritrocito, presenta cromatina difusa (microgametocito) o compacta y excéntrica (macrogametocito). Pigmento café disperso (pigmento palúdico).	Ligeramente agrandado puede estar distorsionado, con finos gránulos de Schüffner.

- La invasión múltiple de glóbulos rojos es rara con *P. vivax*
- *P. vivax* tiene afinidad por los glóbulos rojos jóvenes (reticulocitos).

Figura 5.10. Morfología de *Plasmodium vivax*



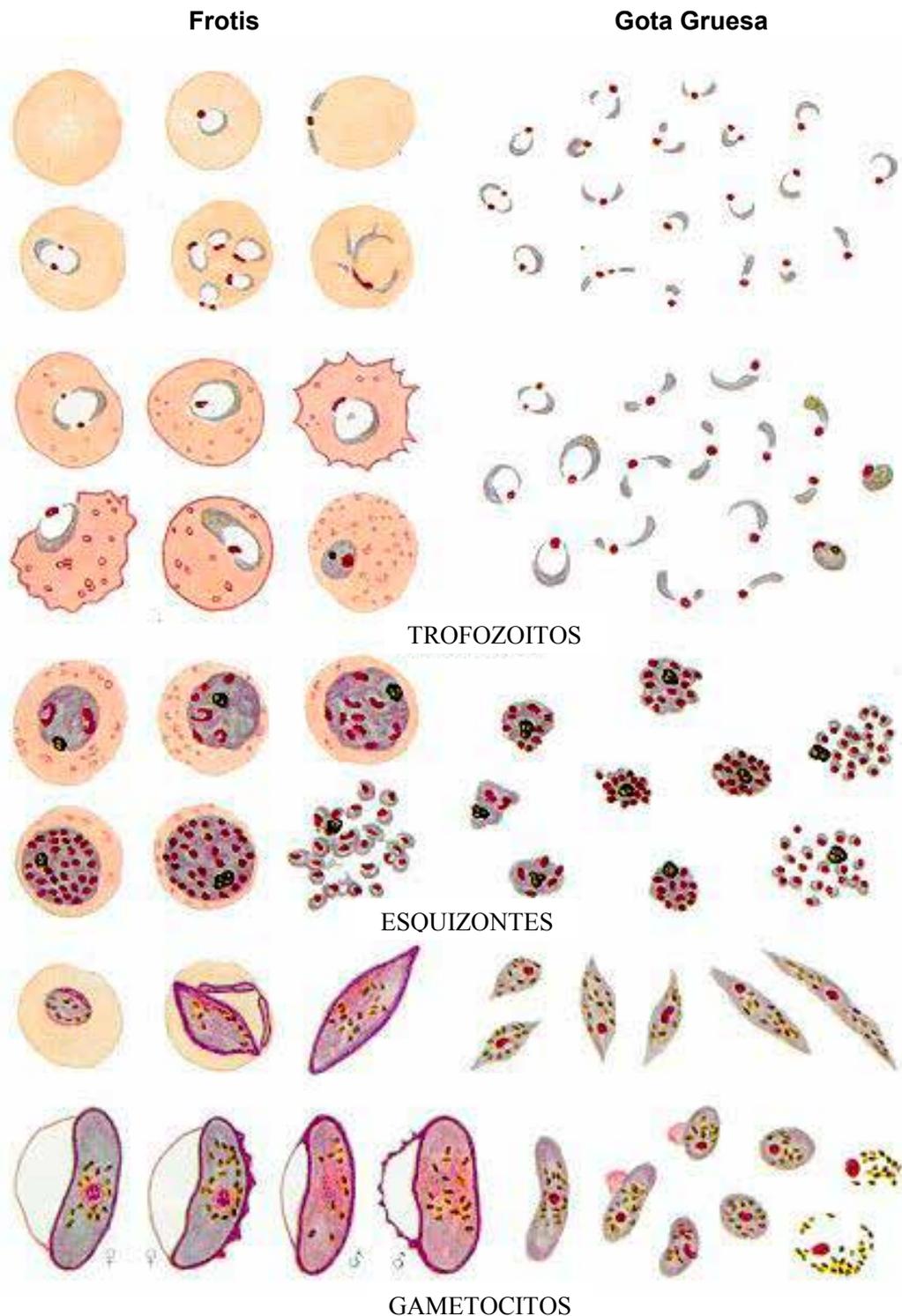
Fuente: Malaria Parasitological Diagnosis: WHO 1991

Tabla 5.2. Características morfológicas de *Plasmodium falciparum*

ESTADÍO	MORFOLOGÍA DEL PARASITO	MORFOLOGÍA DEL ERITROCITO
Trofozoito inmaduro (en anillo)	Citoplasma delicado en forma de anillo pequeño con 1 ó 2 puntos pequeños de cromatina.	Normal. Puede haber uno o más parásitos dentro del mismo eritrocito.
Trofozoito maduro	Citoplasma en forma de coma, anillo o signo de exclamación con 1 ó 2 puntos rojos de cromatina.	Normal. Raramente se observan gránulos de Maurer.
Esquizonte	Muy raramente observado en la circulación porque están adheridos o secuestrados en la microvasculatura. En la forma madura se observan 8 a 24 merozoitos pequeños, tiene un pigmento oscuro agrupado (pigmento palúdico).	Normal. Raramente se observan gránulos de Maurer, según las condiciones de la coloración
Gametocito	Forma de banano o luna creciente, presenta cromatina difusa en el microgametocito y compacta macrogametocito. Presenta una mancha de pigmento oscuro (pigmento palúdico).	Distorsionado por el parásito.

- La invasión múltiple de glóbulos rojos es frecuente con *P. falciparum*
- *P. falciparum* tiene afinidad por todos los glóbulos rojos, independientemente de su edad o estado de desarrollo.

Figura 5.11 Morfología de *Plasmodium falciparum*



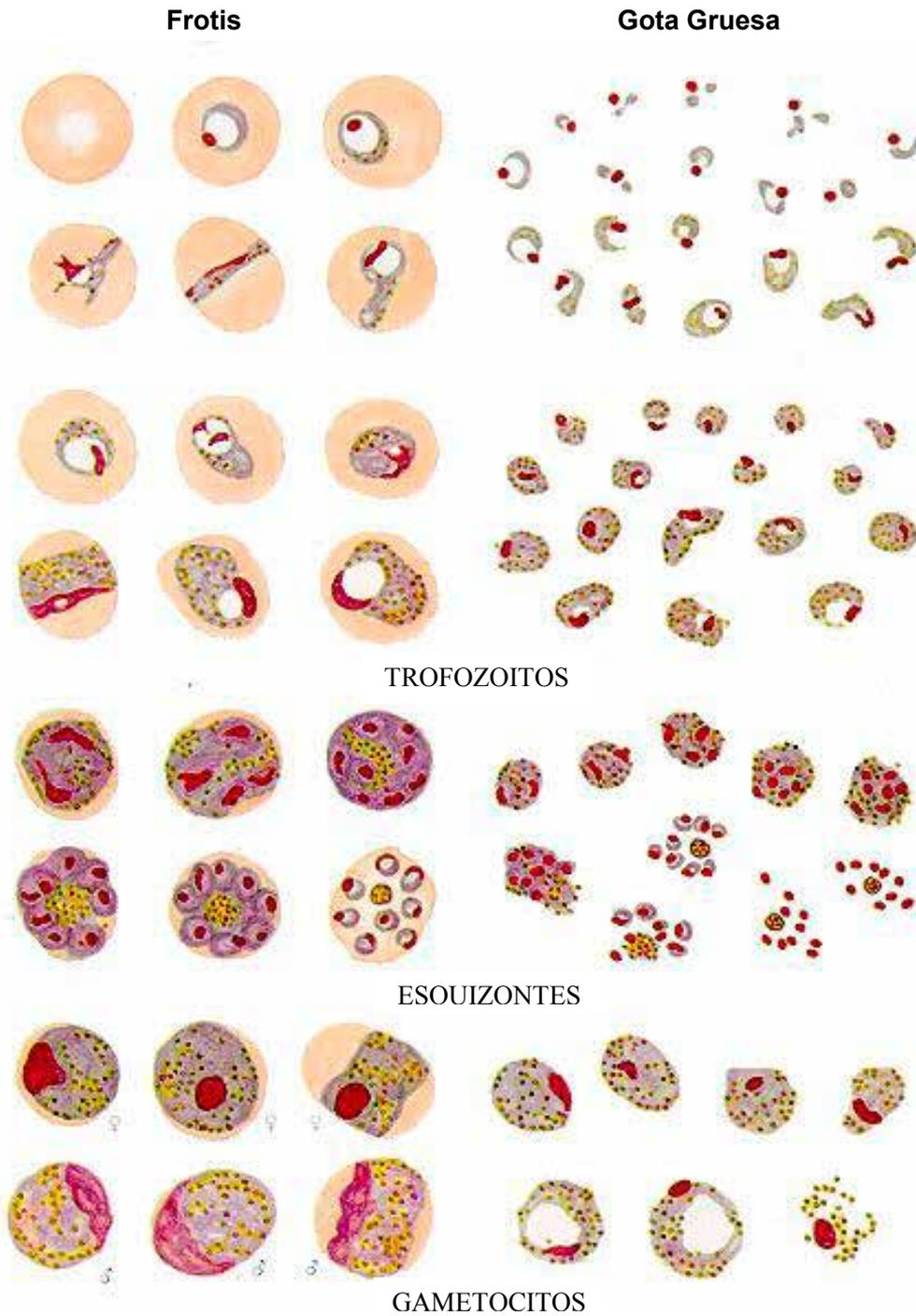
Fuente: Malaria Parasitological Diagnosis: WHO 1991

Tabla 5.3 Características morfológicas de *Plasmodium malariae*

ESTADIO	MORFOLOGÍA DEL PARASITO	MORFOLOGÍA DEL ERIROCITO
Trofozoito inmaduro (en anillo)	Citoplasma en forma de anillo grueso y denso de color azul con algunos gránulos negros de pigmento. Cromatina en forma de un punto rojo grande.	Normal a ligeramente más grande.
Trofozoito maduro	Citoplasma redondo o compacto de color azul oscuro con pigmento en forma de partículas negras o en forma de banda. Cromatina en forma de banda o de un punto redondo	Normal a ligeramente más grande.
Esquizonte	Se observan de 8 a 10 merozoitos en forma de una mancha roja rodeados de citoplasma pálido, pueden ser irregulares o en forma de roseta o margarita.	Normal a ligeramente más grande.
Gametocito	Redondo a oval, compacto, casi llena el eritrocito. Cromatina difusa en el microgametocito o compacta y excéntrica en el macrogametocito. Presenta pigmento café disperso (pigmento palúdico). Similar a <i>P. vivax</i> pero más pequeño y con menos pigmento.	Normal a ligeramente más grande.

- La invasión múltiple de glóbulos rojos es rarísima con *P. malariae*
- *P. malariae* tiene afinidad por todos los glóbulos rojos maduros.

Figura 5.12 Morfología de *Plasmodium malariae*



Fuente: Malaria Parasitological Diagnosis: WHO 1991

Tabla 5.4 Características morfológicas de *Plasmodium ovale*

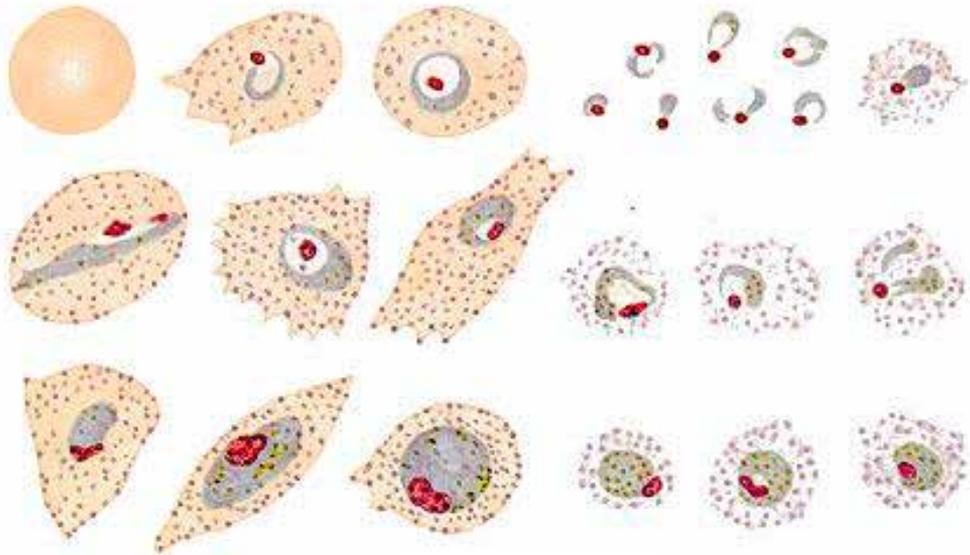
ESTADIO	MORFOLOGÍA DEL PARASITO	MORFOLOGÍA DEL ERIROCITO
Trofozoito inmaduro (en anillo)	Citoplasma en forma de anillo de color azul de consistencia densa. Cromatina en forma de un punto rojo mediano.	Normal a ligeramente agrandado. Redondo u ovalado, ocasionalmente con gránulos de Schüffner
Trofozoito maduro	Citoplasma redondo, compacto de color azul con pigmento café en forma de partículas. Cromatina en forma de punto redondo grande.	Normal a ligeramente agrandado. Redondo u ovalado, ocasionalmente con gránulos de Schüffner
Esquizonte	Se observan 8 a 14 merozoitos de color rojo en forma de roseta o margarita alrededor de una masa de pigmento café oscuro.	Normal a ligeramente agrandado. Redondo u ovalado, ocasionalmente con gránulos de Schüffner
Gametocito	Grande, redondo a oval, compacto. Cromatina en forma de punto redondo rojo presenta partículas pequeñas en el citoplasma. Se diferencia de <i>P. vivax</i> por su pigmento café y por la presencia de gránulos de Schüffner.	Normal a ligeramente agrandado. Redondo u ovalado, ocasionalmente con gránulos de Schüffner

- *P. ovale* tiene afinidad por los glóbulos rojos jóvenes (reticulocitos).

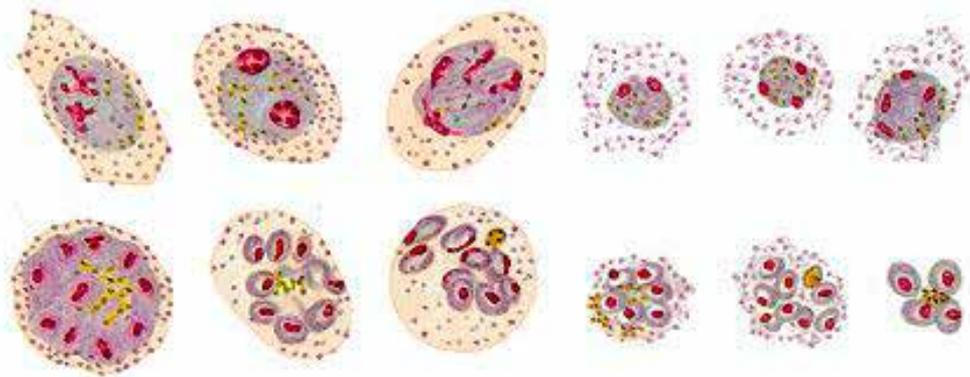
Figura 5.13 Morfología de *Plasmodium ovale*

Frotis

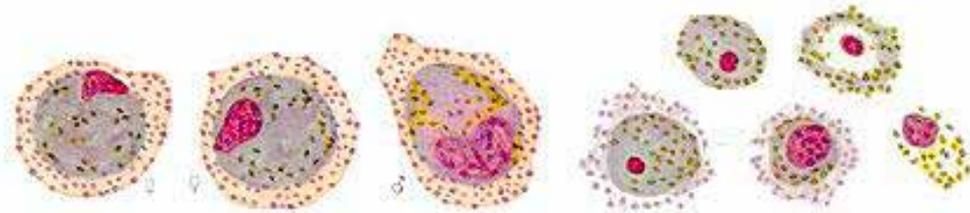
Gota Gruesa



TROFOZOITOS



ESQUIZONTES



GAMETOCITOS

Fuente: Malaria Parasitological Diagnosis: WHO 1991



CAPÍTULO 6 DENSIDAD PARASITARIA

La magnitud de la parasitemia o densidad parasitaria permite estimar la intensidad de la infección, la que a su vez se puede relacionar con la severidad de las manifestaciones clínicas. En situaciones de transmisión acentuada y estable de malaria, la adquisición de inmunidad produce protección clínica de los individuos, quienes podrían no presentar fiebre aún con densidades parasitarias moderadas. En la malaria aguda, la determinación de la densidad parasitaria es útil para:

- Evaluar la severidad y evolución de la infección malárica.
- Evaluar la eficacia del tratamiento sobre los parásitos durante el tratamiento, si el tratamiento es eficaz la densidad parasitaria en la sangre debe disminuir progresivamente.
- Evaluar la evolución clínica del paciente.
- Para el caso de *Plasmodium falciparum*, la determinación de la densidad parasitaria alta se asocia a una enfermedad más severa y potencialmente fatal, por lo que es necesario el seguimiento de la evolución parasitológica en respuesta al tratamiento.

En Guatemala se está trabajando con dos sistemas para calcular la densidad parasitaria. Para ambos casos se deben informar los estadios sexuales (gametocitos) y estadios asexuales (trofozoitos y esquizontes) de manera individual (ver sección 6.2).

6.1 Sistema semi cuantitativo o de cruces (+):

Este sistema se utiliza para diagnóstico rutinario. Se debe tener cuidado en evaluar la muestra para escoger el área con mejor distribución del parásito. El procedimiento se basa en sumar el total de parásitos observados en cien campos (a partir del primer parásito encontrado) y aplicar el criterio de la tabla 6.1.

Tabla 6.1 Densidad Parasitaria en sistema de cruces

No. de parásitos	Reporte
Menos de 40 (1 a 39) parásitos en 100 campos	El número de parásitos vistos
De 40 a 60 parásitos en 100 campos	+/2
De 61 a 199 parásitos en 100 campos	+
De 200 a 2,000 parásitos en 100 campos	++
De 2,001 a 20,000 parásitos en 100 campos	+++
Más de 20,001 parásitos en 100 campos	++++



6.2 Sistema cuantitativo o por microlitro:

En este sistema se debe disponer del conteo de leucocitos del paciente, para determinar la cuantificación parasitaria en Gota Gruesa. Si no se dispone de esta información se asume concentraciones constantes de 6,000 – 8,000 leucocitos/ μ l. En la práctica, se utilizará 6,000 leucocitos/ μ l.

- a) Se inicia el conteo de glóbulos blancos al identificar el primer parásito.
- b) Se cuentan leucocitos y parásitos simultáneamente. Este método necesita idealmente dos contadores.
- c) El conteo se detiene cuando se llega a 200 leucocitos y se han identificado 10 o más parásitos. Aplicar la fórmula del inciso f).
- d) Si después de contar 200 leucocitos, se han identificado de 1 a 9 parásitos, continuar con el recuento de leucocitos hasta llegar a 500 leucocitos. Aplicar la fórmula del inciso f).
- e) Si se identificaron menos de 10 parásitos en un conteo de 500 leucocitos, la densidad se informa con el número de parásitos encontrados, por ejemplo “3 parásitos en 500 leucocitos”.
- f) Si se cuentan dos veces más parásitos que leucocitos por campo, se recomienda hacer el conteo de parásitos en 50 leucocitos. Aplicar fórmula del inciso f).
- g) Fórmula:

$$\frac{\text{Número de parásitos contados} * 6,000 \text{ leucocitos}}{\text{Número de leucocitos contados}} = \text{parásitos} / \mu\text{l}$$

- h) 0 parásitos, contar hasta 500 campos.
- i) 1-9 parásitos, contar hasta 500 leucocitos.
- j) 10 a más parásitos, contar hasta 200 leucocitos.
- k) Si se observa el doble de parásitos en comparación con leucocitos reportar el # de leucocitos contados hasta 500 parásitos.

Este sistema de parásitos por microlitro (parásitos / μ l) permite clasificar la densidad en parámetros cualitativos según la siguiente tabla:

Tabla 6.2 Densidad parasitaria estimada por leucocitos por microlitro de sangre, gota gruesa

Densidad	<i>P. falciparum</i> / μ l	<i>P. vivax</i> / μ l
Baja	<800	<800
Moderada	800 – 4,000	800 – 2,400
Alta	> 4,000	> 2,400



Recomendaciones:

- Contar fases por separados (sexual y asexual).
- En caso de infecciones mixtas, contar primero una especie y luego la otra.
- Si al momento de contar un estadio se cuentan 10 parásitos, para el siguiente estadio contar únicamente 200 leucocitos (aunque no se llegue a los 10 parásitos en ese segundo estadio).

6.3 Reporte de estadios parasitarios

Es importante diferenciar los estadios sexuales y asexuales. Esto es debido a que los estadios asexuales (trofozoitos y esquizontes) son los responsables de las manifestaciones clínicas y complicaciones; y los estadios sexuales (gametocitos) son los responsables de la transmisión de la infección. La diferenciación de los estadios se hace por medio de la utilización de las siguientes abreviaturas:

Tabla 6.3 Abreviaturas para identificación de estadios

Abreviatura	Estadio	Especie
F	Estadios asexuales (trofozoitos y esquizontes)	<i>P. falciparum</i>
Fg	Estadios sexuales (gametocitos)	<i>P. falciparum</i>
V	Estadios asexuales (trofozoitos y esquizontes)	<i>P. vivax</i>
Vg	Estadios sexuales (gametocitos)	<i>P. vivax</i>

6.4 Informe de resultados

El resultado de la observación microscópica se debe informar en el formulario SIGSA L-1 y en el E-1 (ver anexos 1 y 2). **NUNCA** debe de colocar el resultado sobre la lámina para no sesgar el control de calidad.

6.4.1 Reporte de presencia de *Plasmodium* sp.

- El informe se basa en colocar la especie, estadio y densidad parasitaria.
Ejemplos: Sistema de cruces: +V y 15Vg ó +++F y + Fg
Sistema por microlitro: 2,800 V/ul y 150 Vg/ul
- Es importante reportar si hay una infección mixta (asociada) indicando la presencia de ambos parásitos:
Ejemplo: +/2 V y + F.



6.4.2 Reporte de ausencia de *Plasmodium* sp.

En los casos donde no se observaron parásitos (lámina “negativa”) se informa: **No se observó *Plasmodium* sp.** Es importante mencionar que para declarar una lámina sin *Plasmodium* sp., se deben de utilizar según los criterios según el tipo de diagnóstico:

Diagnóstico pasivo, después de observar como mínimo 100 campos microscópicos sin haber encontrado parásitos.

Diagnóstico activo, después de observar como mínimo 300 campos microscópicos sin haber encontrado parásitos.



CAPÍTULO 7

OTROS MÉTODOS DIAGNOSTICOS PARA MALARIA

Adicionalmente al diagnóstico microscópico utilizando gota gruesa y extendido fino, se han desarrollado otras pruebas que apoyan el diagnóstico de la malaria ya sea para aumentar la sensibilidad o la rapidez de la detección de los parásitos o de sus componentes. A pesar del desarrollo de nuevas metodologías, la microscopía sigue siendo la prueba estándar de oro para el diagnóstico de malaria.

7.1 Pruebas rápidas para el diagnóstico de malaria (PDR):

Las pruebas de diagnóstico rápido de malaria, detectan antígenos específicos (proteínas) producidos por los parásitos de malaria. Estos antígenos están presentes en la sangre de las personas infectadas o recientemente infectadas. La PDR muestra su presencia mediante un cambio de color en una tira de nitrocelulosa absorbente.

Estas pruebas se basan en dos tipos de antígenos:

- Proteína II rica en Histidina (PfHRP-II): Molécula secretada por los trofozoitos y gametocitos jóvenes de *P. falciparum*. Este antígeno puede circular en la sangre hasta por 72 horas después de negativizarse la gota gruesa.
- Lactato deshidrogenasa (pLDH): isoenzima glicolítica producida en altos niveles durante el estadio eritrocítico del parásito, por tanto es producida únicamente por parásitos vivos de las diferentes especies de *Plasmodium*. Sólo se puede diferenciar *P. falciparum* de los no *falciparum* pero no distingue entre *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*.

Cuando se usa correctamente, una PDR de malaria puede proporcionar una indicación útil de la presencia de infección malárica clínicamente significativa. Una PDR no reemplaza el examen microscópico, pero puede aplicarse en particular cuando exista dificultad de acceso a un diagnóstico parasitológico microscópico oportuno en menos de 72 horas. Sin embargo, las decisiones terapéuticas no deben basarse sólo en el resultado de la PDR.

Generalmente las PDR vienen en varios formatos, aunque el principio de cromatografía plana es el mismo. La prueba se basa en una tira reactiva, que se coloca en pocillos que contienen sangre y amortiguador (buffer). La tira de nitrocelulosa puede encontrarse dentro de un cartucho de plástico o en una tarjeta. La sangre lisada recorre el largo de la tira y reacciona con las bandas de marcaje si hay presencia de antígenos.

Sensibilidad de las PDR

La sensibilidad de las PDR de la malaria está determinada por:

- La especie del parásito
- El número de parásitos presentes
- El estado de la PDR
- De una correcta ejecución de la técnica usada para realizar la prueba
- De una correcta interpretación por parte del lector
- La viabilidad de los parásitos
- La variación de la estructura y la expresión del antígeno



Las PDR tienen su mayor utilidad cuando se utilizan para fortalecer la vigilancia de la malaria en las situaciones que se describen a continuación:

Brote de febriles: Las PDR tienen su utilidad para la rápida identificación de la etiología malarica de la fiebre y contención del brote con medidas dirigidas a los individuos y el ambiente. En esta situación las PDR se utilizan en una búsqueda activa de casos febriles con la toma de la gota gruesa con extendido fino. En los casos con PDR positivo, se debe obtener muestras de todos los convivientes con y sin fiebre.

Intensificación de las intervenciones de prevención y control: Las PDR pueden ser un instrumento útil cuando se desea intensificar las intervenciones de prevención y control en las localidades priorizadas en donde el diagnóstico de calidad no es oportuno debido al difícil acceso a los servicios de salud.

Otras recomendaciones para el uso de las PDR de malaria:

- Diagnóstico por parte de personal de salud entrenado, distante de servicios de microscopía.
- Diagnóstico remoto en personal laboral organizado en zonas donde la malaria es endémica (por ejemplo, militares o empresas de minería).
- Investigación de brotes y encuestas de prevalencia de la malaria.
- Diagnóstico “fuera del horario” en laboratorios de la red de servicios de salud.

Sin embargo, las PDR se pueden aplicar mediante búsqueda activa y pasiva así:

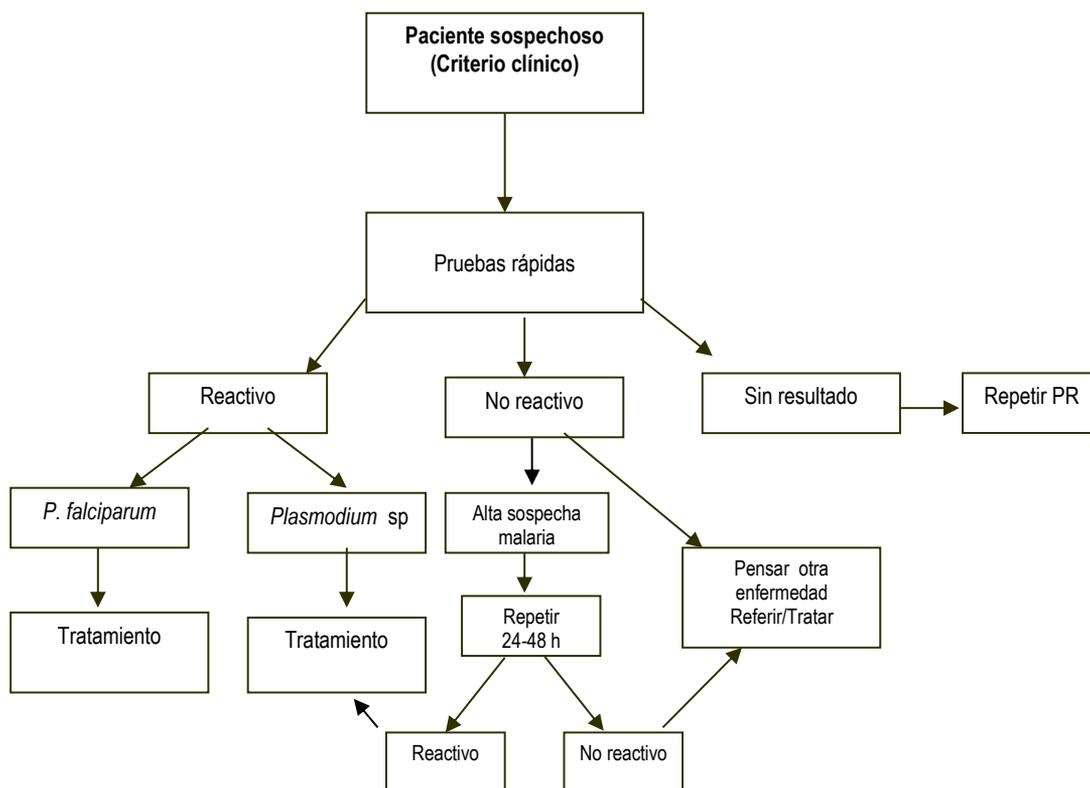
Vigilancia activa:

- En atención a brotes o epidemias. Donde se recomienda utilizar la definición de caso probable para estas situaciones: «Persona con fiebre actual o reciente (72 horas) que proceda de área endémica en los últimos 15 días y que puede tener o no relación epidemiológica (nexo) con casos diagnosticados». Es posible ampliar esta definición a persona sintomática que proceda de zona endémica, debido a que la inmunidad desarrollada frente a previas infecciones puede hacer que el paciente presente una sintomatología leve y en algunas ocasiones esté afebril.
- Como estrategia para aumentar la cobertura del diagnóstico y consecuentemente lograr disminuir la transmisión de malaria en un lugar.

Vigilancia pasiva

- Ubicación de un puesto de atención con posición estratégica, por ejemplo en población indígena, trabajadores de minería, entre otros.
- En hospitales ante la duda de infección mixta, si el diseño de la PDR lo permite.

Figura 10.1 Algoritmo para el uso de prueba rápida en el diagnóstico de malaria



Un resultado **negativo** de la prueba *no siempre* descarta con certeza la malaria, ya que:

- Los parásitos pueden ser insuficientes para que el resultado sea positivo;
- La PDR puede estar *dañada*, lo cual reduce su sensibilidad;
- Es posible que la causa de la enfermedad sean otras especies del parásito de la malaria y que la PDR no esté concebida para detectarlas.

Un resultado **positivo** no siempre implica la existencia de malaria porque:

- A veces se puede detectar el antígeno después de que los parásitos infectantes hayan muerto (es decir, después del tratamiento) o debido a la persistencia de los gametocitos del parásito, que no causan enfermedad en el huésped;
- Existen en la sangre otras sustancias que en ocasiones pueden producir un resultado falso positivo;

Por lo anterior, es importante que al momento de realizar la PDR se haga una gota gruesa ya que ésta es la prueba de oro para el diagnóstico de malaria.

Ventajas:

- Emplea poco tiempo de proceso (entre 10 a 20 minutos).
- Tiene buen porcentaje de especificidad (97.3-99.0 %) y sensibilidad (90.5-92.0%).
- Muy útil en comunidades rurales donde no se cuenta con diagnóstico microscópico.
- Son de fácil uso e interpretación y no requieren microscopios.
- Pueden detectar una infección cuando los parásitos se encuentran retenidos en los vasos sanguíneos.
- Pruebas estables a 2-30°C y a un alto porcentaje de humedad (no congelar).
- En vista de que la enzima es producida solamente por parásitos vivos, se postula que esta prueba rápida es útil para evaluar la respuesta a la terapia antimalárica.

Desventajas:

- No permiten la cuantificación parasitaria.
- Detecta parasitemias por encima de 100 parásitos / uL sangre ó +/-2.
- El umbral de detección de estas pruebas disminuyen en parasitemias bajas.
- Detecta antígenos producidos por gametocitos inmaduros, que pueden persistir posteriormente al tratamiento, lo cual puede llevar a una falsa interpretación del resultado.
- No es posible diferenciar especies entre *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*.
- No diferencia infecciones mixtas.
- Tiene mayor especificidad que sensibilidad

Manejo de los reactivos:

- **Estabilidad:** antes de realizar la PDR verificar la fecha de caducidad.
- **Almacenamiento:** mantener de 2 a 30°C. ¡No congelar! Si las PDR se almacenan a temperaturas que exceden los límites recomendados, es probable que la duración máxima de conservación disminuya y que la sensibilidad se pierda antes de la fecha de caducidad. Al transportar o almacenar, evite su exposición a temperaturas elevadas (más de 40°C) durante periodos superiores a 1 día. Evite la exposición a temperaturas igual o superiores a 60 °C (los reactivos podrían resultar dañados).

El Laboratorio Nacional de Salud ha trabajado y capacitado en tres marcas de PDR, OptiMAL-IT®, First Response® y Care Start®. Pruebas de diagnóstico rápido que han sido evaluadas por la OMS y que cumplen con criterios de sensibilidad y especificidad que las hacen adecuadas para el uso en el país.



Problemas más frecuentes en el uso de rutina de las PDR:

1. Aplicar a la PDR un volumen inadecuado de muestra, generalmente ocasionado por la dificultad en el manejo del colector de la muestra de sangre.
2. Mal uso de la solución buffer. Cuando se hace intercambio de la solución buffer entre lotes o productos, lo que puede generar falsos positivos o negativos. También, se considera un error aplicar diferente número de gotas de buffer al especificado en las indicaciones del fabricante.
3. Aplicación en el pozo errado la sangre o buffer, generando resultados negativos o inválidos.
4. Fallas en el tiempo de lectura. Es importante leer la prueba en el tiempo máximo de lectura estimado por el fabricante, debido a que las reacciones débiles suelen ser tardías, sin embargo se ha de tener precaución de no exceder dicho tiempo.
5. Utilizar luz inadecuada para la lectura de los resultados de las PDR. Las pruebas deben ser leídas con luz día o luz blanca brillante, evitando leerlas en la luz directa del sol o en luz tenue.
6. Fallas de interpretación en las líneas de reacción, ocasionado por no consultar la interpretación del fabricante o ayudas didácticas.

7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Consiste en la detección de ADN de *Plasmodium* amplificado a niveles detectables a partir de cantidades pequeñas presentes en muestras de sangre de pacientes sospechosos de malaria o con malaria confirmada microscópicamente. La técnica se puede realizar a partir de sangre total con anticoagulante, muestra de sangre en papel filtro o láminas coloreadas. El ADN amplificado o producto de PCR puede observarse en la electroforesis de un gel de agarosa donde los productos se colorean y pueden compararse con el tamaño de los fragmentos de un marcador de peso molecular estándar.

En el estudio molecular de la malaria, se puede utilizar en las situaciones que se describen a continuación:

7.2.1 Detección de infecciones mixtas: la técnica molecular es más sensible que la gota gruesa para detectar infecciones mixtas por *P. vivax* y *P. falciparum*, también es ideal para la detección de casos submicroscópicos.

Actualmente, el Laboratorio Nacional de Salud cuenta con la técnica PCR anidado y PCR Multiplex en Tiempo Real para la investigación de casos especiales y confirmación de especies no circulantes en el país.



7.2.2 Identificación de genes asociados a la resistencia de *P. falciparum* a la cloroquina: el marcador PfCRT se ha asociado a parásitos *P. falciparum* resistentes a la cloroquina. Se cuenta con un protocolo para la toma de muestras de sangre completa para la vigilancia molecular de la resistencia a medicamentos antimaláricos de Plasmodium.

7.2.3 Caracterización de la diversidad genética (polimorfismos) de *Plasmodium*: utilizando PCR para amplificar genes polimórficos (variables) de *Plasmodium sp.*, es posible tipificar los parásitos y distinguirlos utilizando los productos amplificados como marcadores de la diversidad genética.

7.3 Cultivos

Los parásitos de *Plasmodium* pueden ser mantenidos en laboratorio en su ciclo asexual mediante cultivos continuos in vitro. La técnica está orientada a la obtención de antígenos para estudios serológicos, sensibilidad de los *Plasmodium* a las drogas antimaláricas y estudios de biología molecular. Este tipo de cultivo se mantiene en laboratorios regionales de referencia.

7.4 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula.

CAPITULO 8 RED DE LABORATORIOS Y SISTEMA DE INFORMACIÓN

8.1 Concepto:

La Red Nacional de Laboratorios (RNL) para malaria es un sistema donde laboratorios de salud pública, en diferentes niveles de función y complejidad, están unidos por: objetivos comunes, información, supervisión, capacitación continua, evaluación y un sistema de control de calidad para apoyar el diagnóstico oportuno y la vigilancia epidemiológica.

8.2 Estructura

Los niveles de la Red Nacional de Laboratorios para malaria son:

- Laboratorio Nacional de Salud, LNS
- Laboratorio Regional de Referencia, LRR.
- Laboratorios Locales, LL.
- Sitios de toma de muestra, SM.

Figura 11.1 Esquema de Estructura de la Red





8.2.1 Primer nivel: Laboratorio Nacional de Salud

Este es el Laboratorio Nacional de Referencia, constituido por el personal de la Sección de Malaria, Área de Parasitología del Laboratorio Nacional de Salud.

8.2.2 Segundo nivel: Laboratorios Locales de Referencia

Conformados por laboratorios o centros de microscopía que cuentan con un Químico Biólogo, microscopista y/o técnico de laboratorio con experiencia y buen desempeño en el diagnóstico de malaria.

8.2.3 Tercer nivel: Laboratorios Locales

En este nivel se incorporan todos los que realizan el diagnóstico microscópico de malaria, involucra Químicos Biólogos, microscopistas del Programa de Enfermedades Transmitidas por Vectores y técnicos de laboratorio de hospitales y centros de salud.

8.2.4 Cuarto nivel: sitios de toma de muestra

Incluye Puestos de Salud, colaboradores voluntarios, centros de convergencia y otros que tomen muestra para malaria. Este nivel no es en sí un laboratorio pero influye en el diagnóstico ya que es el lugar de toma de muestra (la base para un buen diagnóstico).

8.3 Funciones por niveles de la RNL para malaria

8.3.1 Laboratorio Nacional de Salud (LNS)

- Liderar la RNL.
- Funcionar como laboratorio nacional de referencia para el diagnóstico de malaria.
- Establecer la normativa de métodos y técnicas.
- Capacitar continuamente al personal de la RNL.
- Coordinar las actividades de la RNL.
- Realizar el control de calidad de los Laboratorios Locales de Referencia.
- Realizar supervisiones directas e indirectas a la RNL.
- Participar en programas de control de calidad a nivel internacional.
- Informar resultados a los Laboratorios Locales de Referencia.
- Actualización de nuevas técnicas de diagnóstico, tecnología, entre otros.
- Elaborar, revisar, publicar y socializar manuales de procedimientos.
- Trabajar bajo un sistema de calidad (ISO 15189).
- Brindar asesoría técnica.
- Realizar o coordinar investigaciones de interés en salud pública.
- Actuar como centro de estudio de resistencia a los antimaláricos con fines de vigilancia epidemiológica.
- Apoyar y coordinar el trabajo con programas y proyectos.



8.3.2 Laboratorio Local de Referencia

- Realizar el diagnóstico microscópico de malaria de los distritos asignados así como de muestras de pacientes y/o referencias de médicos.
- Asistir y aprobar las capacitaciones a las que se le citen.
- Capacitar a personal de Centros de Salud (C/S), Hospitales, Puestos de Salud (P/S), Colaboradores Voluntarios (CV) y otros para una adecuada toma de muestra.
- Capacitar a personal comunitario (colaboradores voluntarios) en los que se haya observado deficiencia en la correcta toma de muestra y como retroalimentación periódica. En los casos donde no tenga contacto directo con el colaborador voluntario, capacitar al personal de campo de ETV para que éste brinde la réplica al personal comunitario.
- Replicar las capacitaciones continuas.
- Supervisar la realización del diagnóstico microscópico en la red local e implementar medidas correctivas.
- Realizar el control de calidad de la red local, según calendarización anual. Solicitar el control de calidad a cada laboratorio en la fecha programada.
- Enviar, al LNR, informes de capacitaciones, supervisión directa, control de calidad realizado y resultados de la replicación de capacitaciones dirigidos a su red.
- Enviar sus láminas para control de calidad según solicitud del LNR.
- Informar oportunamente los resultados del control de calidad al laboratorio controlado.
- Aplicar las normas y todo lo indicado en los manuales de procedimientos.
- Trabajar bajo un sistema de calidad (Buenas prácticas de laboratorio, ISO 15189).
- +Supervisar con el nivel local en lo que respecta a la referencia de muestras.

8.3.3 Laboratorios locales

- Responsables de realizar una correcta toma de muestra a través de la búsqueda pasiva.
- Enviar sus láminas a control de calidad según solicitud del Laboratorio Local de Referencia.
- Realizar el diagnóstico microscópico de malaria de los distritos asignados así como de las muestras de pacientes y/o referencias de médicos.
- Notificar de las mejoras necesarias en la toma de muestra, a la red de CV que le refiere gotas gruesas.
- Capacitar a sus P/S, CV y otros para una adecuada toma de muestra.
- Asistir y aprobar las capacitaciones a las que se le citen.
- Aplicar las normas y todo lo indicado en los manuales de procedimientos.
- Trabajar bajo un sistema de calidad (Buenas prácticas de laboratorio, ISO 15189).



8.3.4 Sitios de toma de muestra

- Sitios de toma de muestra hemática (gota gruesa y frotis) para el diagnóstico de malaria.
- La calidad de la toma de muestra es evaluada por el laboratorio que realiza el diagnóstico.
- Asistir y aprobar las capacitaciones a las que se le citen.
- Enviar sus láminas para el diagnóstico lo más pronto posible (de preferencia en las 24 horas siguientes).
- Aplicar las normas y todo lo indicado en los manuales de procedimientos.

8.4. SISTEMA DE INFORMACIÓN

El microscopista es el encargado de notificar los siguientes formularios:

8.4.1 Reporte de resultados diagnósticos: todos los resultados diagnósticos serán anotados en el Formulario E-1 (Anexo 1) o en un formulario especial para su reporte. Los reportes serán enviados o referidos al paciente, colaborador voluntario o personal de salud encargado, por vía fax, telefónica, intranet, Internet, o con una tercera persona involucrada en el proceso habitual de informe de resultados.

8.4.2 Formulario para el informe diario del laboratorio: Cada diagnóstico positivo realizado debe ser anotado en el Formulario SIGSA L-1 (Anexo 2). El reporte de este formulario es semanal y se debe consignar en el cuadro resumen el total de resultados negativos y el detalle de los casos positivos. Todas las muestras deben anotarse en un formulario de registro diario de muestras.

8.4.3 Formularios de notificación de casos: Estos formularios son los normados por el Sub Programa de Malaria, Sistema de Información Gerencial en Salud (SIGSA) y Departamento de Epidemiología (DE). El laboratorio deberá informar al distrito de salud correspondiente.

8.4.4 Formulario de consolidado de actividades: En este formulario se detallará las capacitaciones (Anexo 6) y supervisiones realizadas (Capítulo 9 y Anexo 7) así como consolidado de control de calidad (capítulo 9 y Anexo 8).

Estos informes deben ser enviados al Laboratorio Nacional de Salud según la periodicidad establecida, vía fax, correo convencional y/o correo electrónico.



CAPITULO 9 SUPERVISIÓN Y CONTROL DE CALIDAD

9.1 Supervisión

La supervisión es el proceso planificado que permite desarrollar conocimientos y capacidad del personal, crear aptitudes y contribuir a mantener la eficacia y eficiencia de la RNL para el diagnóstico de malaria. La supervisión se aplicará en dos modalidades directa e indirecta.

9.1.1 Supervisión directa:

Evaluación formalizada por el nivel superior (LNS o LRR). Esta evaluación permite medir la adecuación del sistema de trabajo con respecto a la política de calidad del LNS. Es una forma de observación directa del desempeño por medio de vistas programadas y periódicas al personal de los laboratorios de la red para observar las condiciones de trabajo, procedimientos técnicos y administrativos. También se realiza una entrevista directa al personal supervisado, registrando esta información en un formato estandarizado (Anexo 9).

Se observarán los siguientes aspectos:

- Local: condiciones del área de trabajo (iluminación y ventilación), orden y aseo, existencia de un sitio para colgar batas y lavamanos con agua, jabón toalla o papel toalla, mobiliario para trabajo (mesas cubiertas con material no absorbente y de fácil limpieza).
- Personal: número de personas que trabajan en el laboratorio (incluye secretarías y conserjes), encargados de diagnóstico de malaria, disponibilidad y capacidad para realizar tareas del diagnóstico de malaria.
- Equipo: cuidado y utilización correcta del microscopio, mantenimiento y estado general del microscopio.
- Materiales y reactivos: disponibilidad, calidad y conservación.
- Procedimientos técnicos: realiza el análisis de muestras y reporta resultados en menos de 72 horas, toma de la muestra, proceso de coloración, lectura de láminas, revisión del control de calidad y formularios.
- Registros: revisión de formularios y papelería.
- Control de calidad: revisión de la recepción de los informes de control de calidad del nivel superior, envía resultados de control de calidad en la fecha estipulada (en caso de los LLR), recibe solicitud de control de calidad del nivel superior, envía los controles de calidad en un tiempo oportuno.

Al finalizar la supervisión se debe realizar una reunión socializando los hallazgos y las recomendaciones. Así mismo hacer entrega del informe escrito a las autoridades correspondientes.

9.1.2 Supervisión indirecta:

Se ejerce a través de revisión y análisis de los resultados del laboratorio en los respectivos formularios.

9.2 Control de calidad:

Es el conjunto de procedimientos que aplica el laboratorio para vigilar constantemente los procedimientos y resultados con el fin de decidir si éstos son lo suficientemente exactos y precisos para ser informados.

El control de calidad del diagnóstico microscópico de la malaria ejecutado por la red de laboratorios se efectúa de la siguiente manera: 1) control de calidad interno, 2) revisión por parte del nivel superior de las láminas diagnosticadas y 3) evaluación externa del desempeño.

9.2.1 Control de calidad interno

Son todas las acciones realizadas al interior de los centros de diagnóstico y laboratorios encaminadas a garantizar procedimientos estandarizados, procurando reproducibilidad, precisión y sensibilidad de los diagnósticos del laboratorio.

Dentro de la calidad interna se debe realizar: control de calidad en el extendido sanguíneo, control de calidad del colorante, revisión sistemática de los resultados reportados y doble ciego.

- **Control de calidad del extendido:** una buena gota gruesa es aquella en la que se puede leer a través de ella y tiene una distribución homogénea. Así se asegura que no esté demasiado delgada ni demasiado gruesa. El frotis debe tener una distribución homogénea (sin gradas ni cortes) y debe ser en forma de bala sin barbas al final.
- **Control de calidad del colorante:** se debe teñir preparaciones que no sean para diagnóstico y se debe observar macro y microscópicamente.
 - El aspecto macroscópico debe ser un extendido de color lila o morado pálido.
 - En el aspecto microscópico: se debe observar un fondo sin residuos. En la gota gruesa se observan los glóbulos blancos con el núcleo de color morado-azul, su citoplasma es celeste claro; los parásitos presentan un citoplasma de color azul y cromatina de color rojo; NO se observan glóbulos rojos. En el frotis los glóbulos rojos son de color gris a rosado y, si existieren, los gránulos de Schüffner se observan rojos; los glóbulos blancos tiene el núcleo de color morado-azul, su citoplasma es celeste claro; los parásitos presentan un citoplasma de color azul y cromatina de color rojo. Según la calidad de la coloración se determina si es necesario sustituir el colorante usado por un nuevo lote.



- **Revisión sistemática de los resultados:** se debe revisar la concordancia del resultado escrito en el E-1 y el escrito en el formulario SIGSA L-1.
- **El doble ciego:** es indicado sólo cuando hay más de una persona que tome muestras en el laboratorio. Este consiste en tomar dos láminas diferentes del mismo paciente, se rotulan con distinta identificación. Se traslada al microscopista (quien desconoce el origen de las láminas) y realiza el diagnóstico de ambas láminas. Por razones obvias, el diagnóstico debe coincidir en las dos muestras.

9.2.2 Control de calidad externo (directo e indirecto)

- **Objetivos.**
 - Confirmar si el trabajo que se está realizando está bien hecho.
 - Corregir errores en el procesamiento de las muestras.
 - Indicar la necesidad de readiestramiento.

9.2.2.1 Control de calidad externo directo

La estrategia para monitorear la calidad de la toma y lectura de las muestras, es a través de la relectura de las láminas, por parte del laboratorio supervisor. Para esto, se debe enviar las láminas con resultados conocidos, desde el LL al LLR. El LLR envía sus láminas al LNR.

Esto se realizará de la siguiente manera:

- **Laboratorios supervisados (LL o LLR, según sea el caso):**
 - Después de realizar el diagnóstico de las muestras recibidas, estas se deben envolver de tal forma que queden separadas una de la otra, cuidando que se mantenga la identificación. Para envolver, se toma una hoja de papel absorbente y a 3 cm del borde, se colocan dos láminas, una a la par de la otra, y se dobla el borde, cubriendo ambas láminas. Luego se colocan otras dos láminas sobre las dos anteriores y se repite el procedimiento hasta formar un paquete. Por último se sella el paquete con cinta adhesiva. Señalar en la parte exterior del paquete, la identificación de las láminas que contiene en su interior.
 - Todos los paquetes de láminas diagnosticadas, deberán guardarse en una caja destinada para esto, rotulado cada paquete con el mes y año al que corresponde y el nombre de su laboratorio. Recordar de separar en cada paquete las láminas positivas de las negativas.
 - Cuando el laboratorio supervisor haga la convocatoria de control de calidad (Formato de solicitud de control de calidad, anexo 10) para control de calidad (según calendarización anual del laboratorio supervisor), se debe preparar una lista de las láminas positivas con su identificación correspondiente, reportar el resultado obtenido en la casilla del formato “diagnóstico referente” y las observaciones que quiera especificar en el formato de solicitud de control de calidad (anexo 11).



- Preparar un paquete, separando las láminas positivas de las negativas y envolverlo de tal forma que no se quiebren durante el transporte. Identificar el paquete en la parte exterior, colocando el nombre del lugar de donde se envían y el nombre del microscopista responsable. Enviar el paquete junto con el formato de solicitud de control de calidad al laboratorio supervisor.
- Las láminas se conservan hasta 1 año; si durante ese tiempo no han sido solicitadas por el laboratorio supervisor, se procede a descartar las láminas. Si el laboratorio carece de láminas nuevas puede reutilizar las negativas. Se deben descartar las láminas rayadas.

- **Laboratorio supervisor (LLR)**

El laboratorio supervisor de cada Área de Salud debe de enviar una convocatoria a los laboratorios supervisados (anexo 5) para solicitarles las láminas para control de calidad de acuerdo a un cronograma establecido. La solicitud se hará mínimo dos veces al año, calendarizando las fechas en el formato “Programación Anual de Control de Calidad de Gota Gruesa” (anexo 12).

Al recibir las láminas, el laboratorio supervisor debe anotar las láminas que va a revisar en la “Hoja de control de calidad de malaria” (anexo 13) y adjuntarla al archivo del laboratorio supervisado.

Los aspectos a evaluar serán: la concordancia diagnóstica cualitativa (falsos positivos o negativos) y cuantitativa (densidad parasitaria, de acuerdo al sistema semi cuantitativo de cruces).

Control de calidad rutinario: el total de láminas a evaluar es el 10% de negativas y 100% de positivas.

Se debe evitar conocer el diagnóstico previo ya que esto predispone en el momento de realizar el control de calidad. Los resultados del Laboratorio Supervisor se deben de anotar en la casilla de “Diagnóstico del Revisor” y después de esto, anotar los resultados del laboratorio supervisado en la casilla de “Diagnóstico del Referente”.

Se aconseja que las láminas en donde no se concuerda, las observe un tercer microscopista (se puede enviar al LNS).

Realizar el cálculo del porcentaje de láminas en que hubo concordancia diagnóstico, de especie y densidad (es aceptable una diferencia de una cruz). Para esto se cuentan las láminas donde se obtuvo concordancia en el diagnóstico (ambos dicen igual diagnóstico), se dividen dentro del total de láminas reevaluadas y por último se multiplica por 100. Este proceso se repite para especie y densidad.



Fórmula de concordancia: $\frac{\text{No. de láminas en que concuerdan}}{\text{No. de láminas controladas}} * 100$

Por ejemplo: Ambos concuerdan en un total de 85 de 120 láminas, por lo que:

$$\frac{85 \text{ láminas en que concuerdan}}{120 \text{ láminas controladas}} * 100 = 70.8\%$$

Si se tiene un valor menor al 90% de concordancia en diagnóstico cualitativo y en diagnóstico cuantitativo, se solicitará un segundo control de calidad. Si persiste la discordancia entre los resultados se procederá a devolver las láminas discordantes para que el supervisado realice una nueva lectura de las mismas y verificación del informe original a fin de descartar errores administrativos en el registro. Si al cabo de esta etapa persiste la diferencia del informe, las láminas son calificadas como “discordancias reales” que se registran en el informe final del control de calidad. Este laboratorio ameritará supervisión directa además de ser controlado mensualmente durante los 6 meses subsiguientes y si es necesario, se recapacitará al microscopista.

El supervisor enviará el informe al laboratorio supervisado lo antes posible, usando para ello el formato “Informe de control de calidad” (anexo 14).

Nuevo personal: Si se contrata nuevo personal técnico, el jefe de servicio podrá solicitar capacitación en el Laboratorio Local de Referencia. Luego de esto, se solicitará una pasantía de corta duración en el Laboratorio Nacional de Salud.

Después de la capacitación el técnico queda comprometido a enviar su control de calidad.

A todo técnico nuevo se le debe supervisar por tres meses seguidos el 100% del total de las láminas. Si la concordancia es igual o mayor a 90% en diagnóstico cualitativo y en diagnóstico cuantitativo: se cambiará el sistema de control de calidad rutinario.

Cada tres meses el laboratorio supervisor debe enviar un informe al LNS usando para ello el formato “Informe trimestral de supervisión indirecta” (anexo 8).

- **Laboratorio Nacional de Salud:**

- El laboratorio supervisor será supervisado, a su vez, por el Laboratorio Nacional de Referencia.
- En las fechas estipuladas por Cronograma de Control de Calidad Externo, el LNS solicitará el control de calidad a los LLR.
- Los LLR enviarán el total de las láminas solicitadas y empacadas en papel. Para envolver las láminas, se toma una hoja de papel absorbente y a 3 cm del borde, se colocan dos láminas, una a la par de la otra, y se dobla el borde, cubriendo ambas láminas. Luego se colocan otras dos láminas sobre las dos anteriores y se repite el

procedimiento hasta formar un paquete. Por último se sella el paquete con cinta adhesiva. Señalar en la parte exterior del paquete, la identificación de las láminas que contiene en su interior.

- Según el trabajo que realice cada LLR enviará las láminas a control de calidad de la siguiente manera:
 - Si el LLR realiza solamente control de calidad de su red de laboratorios deberá enviar el 100% de las láminas positivas controladas durante el mes solicitado y el 10% de las láminas negativas controladas
 - Si el LLR realiza diagnóstico de gotas gruesas de primer examen y control de calidad de su red de laboratorios, deberá enviar el 100% de láminas positivas y negativas de primer examen. Y el 100% de las láminas positivas controladas durante el mes solicitado y el 10% de las láminas negativas controladas. Este parámetro puede variar a discreción del Laboratorio Nacional de Salud, según la producción del laboratorio evaluado.
- La Jefatura de Área se encargará de enviar al Laboratorio Nacional de Referencia, el control de calidad.
- A nivel de Laboratorio Nacional de Salud, los aspectos a evaluar serán la calidad del extendido, la calidad de la coloración y la calidad del diagnóstico, especie y densidad parasitaria.
- Control de calidad rutinario: el total de láminas a evaluar es el 10% de negativas y 100% de positivas. Cuando se reciban 50 láminas negativas o menos, se observará el 100%, esto aplica también al control de calidad local.
- Si la concordancia es menor al 90% en diagnóstico cualitativo y en diagnóstico cuantitativo, se solicitará a un segundo microscopista con experiencia, una segunda lectura de los resultados discordantes. Si persiste la discordancia, se solicitará un nuevo control de calidad. Si aún persiste la discordancia, se citará al microscopista supervisado a un recapacitación.
- Si se da una concordancia igual o mayor al 90% en diagnóstico cualitativo y en diagnóstico cuantitativo: se continúa con la segunda fecha para el Control de Calidad Externo.
- El Laboratorio Nacional de Salud informará en un plazo establecido, los resultados individuales del Control de Calidad en el formato correspondiente.



- **Control de calidad de pruebas rápidas:**

El control de calidad de las pruebas rápidas se basa en un control por parte del Laboratorio Local. Este control consiste en que se realiza la prueba rápida y gota gruesa con sangre del mismo paciente, como se debe realizar rutinariamente y documentando ambos resultados en un formato que permita identificar: el resultado de la positividad y especie, tanto de PDR y gota gruesa; y cuantificación parasitaria a partir de la gota gruesa. El resultado se compara con el de la prueba rápida, para poder evaluar la concordancia diagnóstica. La lectura de la PDR debe realizarse dentro del tiempo estipulado por el fabricante, ya que en ocasiones puede distorsionarse el resultado en la ventana de visualización.

9.2.2.2 Control de calidad externo directo

Esta evaluación se realiza en todos los niveles de la red de laboratorios con una frecuencia mínima de una vez por año. El Laboratorio Nacional de Salud tiene la responsabilidad de preparar paneles de láminas de calidad óptima y resultados conocidos para evaluar la capacidad diagnóstica de la RNL. El evaluado examina las láminas como parte de su rutina diaria y luego envía el resultado al LNS.

El LNS será objeto a su vez de un control de calidad externo realizado por un laboratorio internacional reconocido para tal fin, en este caso el LNS es evaluado por el Laboratorio Regional de Honduras.

9.2.2.2.1 Preparación y envío de los paneles de láminas

Los paneles de láminas se preparan y envían bajo los siguientes lineamientos:

- Se incluirán láminas con preparaciones de gota gruesa y extendido fino
- El número de láminas por panel dependerá del nivel de laboratorio
 - Laboratorio Local de Referencia de 20 láminas
 - Laboratorios Locales de 10 láminas

Deben elaborarse grupos de paneles uniformes entre sí respecto a las características de las láminas (especie, parasitemia, estadíos), de forma que la evaluación sea comparable cuando se usen paneles del mismo tipo para evaluar distintos laboratorios. Las láminas deben incluir especies presentes en la región, diferentes densidades parasitarias y muestras negativas.

En el anexo 15 se detalla el procedimiento de envío y reporte de resultados de los paneles tanto para los microscopistas de referencia como para los laboratorios de la red local de diagnóstico de malaria de las Áreas de Salud.



9.2.2.3 Análisis de resultados del control de calidad y medidas correctivas

El análisis tomará en cuenta los resultados de la revisión de las láminas diagnosticadas, la evaluación externa del desempeño e información sobre la situación global de los laboratorios obtenida a través de la supervisión directa. El Laboratorio Nacional de Salud administrará una base de datos para cada laboratorio que realice el diagnóstico de malaria para centralizar esta información.

Medidas correctivas según la deficiencia observada:

Aspecto a evaluar	Deficiencia observada	Medida correctiva
Extendidos	Gota gruesa con exceso o falta de sangre Presencia de gota gruesa sin frote Presencia de frote sin gota gruesa	Notificar a los responsables de la toma de muestra, de mejorar la realización de gota gruesa y frotis, según lo establecido por este manual. Re capacitar al personal deficiente en la correcta toma de muestra
Coloración	Gota gruesa sin deshemoglobinizar Presencia de precipitado Presencia de artefactos (esporas, hifas, micelio, entre otros)	Verificar el correcto almacenamiento del colorante (en un lugar fresco, lejos de la luz directa). Filtrar el colorante para eliminar el precipitado Verificar y recomendar el correcto almacenamiento de las muestras antes de la coloración. Una vez estén secas las muestras, envolverlas en papel hasta su coloración. Verificar la correcta preparación del colorante (dilución y tiempo empleado).
Reporte de resultados	Falso positivo Falso negativo Discordancia de especie Discordancia cuantitativa	Considerar una retroalimentación en el diagnóstico microscópico de malaria. Visita de supervisión local al laboratorio que reporte falsos positivos o negativos



CAPITULO 10

LIMPIEZA Y ALMACENAMIENTO DE LÁMINAS

- Al finalizar la observación microscópica de cada lámina, se debe de conservar eliminándoles el exceso de aceite de inmersión con papel absorbente, haciendo presión suavemente y sin frotar. Este paso es de suma importancia para evitar el desprendimiento de la muestra y que de esta forma no se altere el resultado en el control de calidad.
- Después de esta limpieza, las láminas se guardan en cajas portaláminas protegidas de la luz, polvo y humedad.
- En caso de no poseer las cajas portaláminas, se deben envolver en una hoja de papel absorbente. Colocar las láminas a 3 cm del borde (se colocan dos láminas, una a la par de la otra) y se dobla el borde, cubriendo ambas láminas. Luego se colocan otras dos láminas sobre las dos anteriores y se repite el procedimiento hasta formar un paquete. Por último se sella el paquete con cinta adhesiva. Este paquete se puede guardar en bolsas con bolsitas de desecante (silica gel) para evitar que se humedezca.
- Existen líquidos especiales para preservar láminas. Aplicar una capa delgada de líquido con una varilla de vidrio. Luego colocar un cubre objetos sobre la gota, presionar un poco y dejar secar.

CAPITULO 11

LINEAMIENTOS PARA UN DIAGNOSTICO RAPIDO Y TRATAMIENTO OPORTUNO

El diagnóstico rápido y preciso permite administrar un tratamiento oportuno y adecuado que resulta en un control rápido y efectivo, lo cual conduce a su vez a una reducción en la transmisión. Al contar con un diagnóstico rápido y preciso permitirá que las drogas antimaláricas sean entregadas a los pacientes con la confirmación del caso por el laboratorio.

El diagnóstico oportuno es el diagnóstico realizado en menos de 72 horas. Por esta razón es indispensable buscar la organización comunitaria para el traslado oportuno de la muestra hasta el laboratorio respectivo. Los lineamientos para el diagnóstico oportuno se basan en el Protocolo de Vigilancia Epidemiológica del Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

Tratamiento

El objetivo primordial del tratamiento consiste en lograr la eliminación rápida y completa del *Plasmodium* de la sangre del paciente para prevenir que el paludismo no complicado evolucione hacia la enfermedad grave, la defunción o la infección crónica, que produce la anemia relacionada con el paludismo.

Desde una perspectiva de salud pública, el tratamiento se administra para reducir la transmisión de la infección a otras personas mediante la reducción del reservorio infeccioso y para prevenir la aparición y la propagación de la resistencia a los medicamentos antipalúdicos.

Seguimiento al tratamiento.

Según el manual de normas de atención del primer y segundo nivel del MSPAS, deberá realizarse toma de muestra control post-tratamiento al día 15 y 28 en el caso de *P. vivax*; y en el día 4 y 14 para *P. falciparum*.



REFERENCIAS

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Centro Nacional de Epidemiología. Protocolo De Vigilancia Epidemiológica Malaria, CIE-10 B50 – B54. Guatemala.

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Centro Nacional de Epidemiología. Memoria Anual de Vigilancia Epidemiológica 2007. Coordinaciones de Estadísticas Vitales y Centro de Información y Procesamiento de datos. Guatemala 2008.

Méndez, Jorge, ET. AL. Guía Para la Implementación y Demostración de Alternativas Sostenibles de Control integrado de Malaria en México y Centro América. Secretaría de Salud de México. 2004

Ministerio De Salud, Instituto Nacional De Salud. Manual de Procedimientos de Laboratorio Para el Diagnóstico Malaria. República de Perú.

Organización Panamericana de la Salud. El Control de las Enfermedades Transmisibles. 18ª. Ed.2005.

Secretaría de Salud de Honduras. Manual de Procedimientos Operativos Estándar para el Diagnóstico Microscópico de Malaria. Honduras. 2006

Organización Panamericana de la Salud. Diagnóstico de Malaria. Programa de Enfermedades Transmisibles, Publicación Científica No. 512. OPS, 1988

Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Malaria. Serie de Normas Técnicas No. 39. Lima, 2003.

Ministerio de Saúde. Manual de Treinamento em Diagnóstico Laboratorial de Malária. Brasília 2001.

Organización Panamericana de la Salud. Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio. Washington, D.C. 2005.

World Health Organization. THE MICROSCOPE, A Practical Guide. Regional Office for South-East Asia WHO. India. 1999

Work Health Organization. Informal Consultation on Quality control on Malaria Microscopy. Geneva, 2006.

Centers for Disease Control and Prevention. Department for Health and Human Services. Disponible en <http://www.cdc.gov/malaria/disease.htm>

World Health Organization. "Manual of Basic techniques for a health laboratory" 1980

Fritsche T, Smith J. Parasitología médica. En Henry, JB. *et.al.* El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico. España: Marbán; 2005. 1196-1240.

CDC. Microscopic Examination in Blood Specimens. Examining thick and thin smears. Disponible en: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/DiagnosticProcedures.htm>



ANEXOS



ANEXO 1 Formulario E-1

	Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social	CODO	Forma E-1 Rev. 21-09-2016																						
PARA DIAGNÓSTICO MUESTRA DE CONTROL CONTROL MENSUAL EMBARAZO	Tipo de Prueba <input type="checkbox"/> GG <input type="checkbox"/> PDR Resultado <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Tipo de Vigilancia Pasiva <input type="checkbox"/> Activa <input type="checkbox"/>																							
Clave del notificante y No. de Muestra: _____																									
Nombres y apellidos del paciente: _____																									
No. de Celular del paciente y/o responsable: _____		Fecha inicio de síntomas: <input type="text"/> día <input type="text"/> mes <input type="text"/> año																							
Fecha de nacimiento: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Sexo: <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> M		Fecha de toma de muestra: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>																							
Dirección del paciente: _____		No. de casa: _____																							
Localidad: _____		Distrito: _____																							
Nombre de la persona responsable (si paciente menor de edad): _____																									
Medicamentos proporcionados en el momento del diagnóstico PDR positivo: Tabletas días Cloroquina <input type="text"/> <input type="text"/> Primaquina 5 mg: <input type="text"/> <input type="text"/> 15 mg: <input type="text"/> <input type="text"/>		Fecha inicio de tratamiento: día mes año <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>																							
Al recibir el resultado del examen de sangre, anótelo a continuación:																									
Negativo: <input type="checkbox"/> Positivo por: <input type="checkbox"/> <i>P. vivax</i> <input type="checkbox"/> Infección mixta: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <i>P. falciparum</i> <input type="checkbox"/> Otro: (especifique) _____		Embarazada: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Semanas de embarazo: _____																							
Notificante Colaborador Voluntario <input type="checkbox"/> Centro de Salud <input type="checkbox"/> Sector Privado <input type="checkbox"/> Técnico de ETV <input type="checkbox"/> Puesto de Salud <input type="checkbox"/> Hospital Militar <input type="checkbox"/> Centro de Microscopía <input type="checkbox"/> Hospital MSPAS <input type="checkbox"/> IGSS <input type="checkbox"/> Otro: _____																									
Nombre del notificante: _____																									
Tratamiento radical entregado por gota gruesa positiva		Registro de cumplimiento de tratamiento radical																							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Medicamentos</th> <th rowspan="2">Días</th> <th colspan="2">No. Tabletas</th> </tr> <tr> <th>5 mg</th> <th>15 mg</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Cloroquina</td> <td><input type="text"/></td> <td><input type="text"/></td> <td><input type="text"/></td> </tr> <tr> <td>Primaquina</td> <td><input type="text"/></td> <td><input type="text"/></td> <td><input type="text"/></td> </tr> </tbody> </table>	Medicamentos	Días	No. Tabletas		5 mg	15 mg	Cloroquina	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Primaquina	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Completo</th> <th>Suspendido</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Medicamentos</td> <td>¿Cuántos días tomó?</td> </tr> <tr> <td>Cloroquina</td> <td><input type="text"/></td> </tr> <tr> <td>Primaquina</td> <td><input type="text"/></td> </tr> </tbody> </table>			Completo	Suspendido	Medicamentos	¿Cuántos días tomó?	Cloroquina	<input type="text"/>	Primaquina	<input type="text"/>
Medicamentos			Días	No. Tabletas																					
	5 mg	15 mg																							
Cloroquina	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>																						
Primaquina	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>																						
Completo	Suspendido																								
Medicamentos	¿Cuántos días tomó?																								
Cloroquina	<input type="text"/>																								
Primaquina	<input type="text"/>																								
Motivo de la suspensión		Nombre de quien verifica el tratamiento																							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Mala Explicación</th> <th>Mejoría</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Olvido</td> <td>Reacciones adversas</td> </tr> <tr> <td>Faltó medicamento</td> <td>Otra: (especifique)</td> </tr> </tbody> </table>		Mala Explicación	Mejoría	Olvido	Reacciones adversas	Faltó medicamento	Otra: (especifique)	<input type="text"/>																	
Mala Explicación	Mejoría																								
Olvido	Reacciones adversas																								
Faltó medicamento	Otra: (especifique)																								

	REGISTRO DE TOMA DE MUESTRA Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social	LENGÜETA	Forma E-1 Rev. 21-09-2016
PARA DIAGNÓSTICO MUESTRA DE CONTROL CONTROL MENSUAL EMBARAZO	Tipo de Prueba <input type="checkbox"/> GG <input type="checkbox"/> PDR Resultado <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Tipo de Vigilancia Pasiva <input type="checkbox"/> Activa <input type="checkbox"/>	
Clave del notificante y No. de Muestra: _____			
Nombres y apellidos del paciente: _____			
DPI: _____		No. de Celular del paciente y/o responsable: _____	
Fecha de nacimiento: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Sexo: <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> M		Embarazada: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Semanas de embarazo: _____	
Dirección del paciente: _____		No. de casa: _____	
Localidad: _____		Distrito: _____	
Municipio: _____		Departamento: _____	
Nombre de la persona responsable (si paciente menor de edad): _____			
Fecha inicio de síntomas: <input type="text"/> día <input type="text"/> mes <input type="text"/> año		Fecha de toma de muestra: <input type="text"/> día <input type="text"/> mes <input type="text"/> año	
Si PDR positiva: (Fecha de inicio de tratamiento): <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>			
Viajó en el último mes: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		¿A dónde? _____	
Tomó medicamento: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		¿Cuál? _____	
Medicamentos proporcionados en el momento del diagnóstico PDR positivo: Tabletas días Cloroquina <input type="text"/> <input type="text"/> Primaquina 5 mg: <input type="text"/> <input type="text"/> 15 mg: <input type="text"/> <input type="text"/>		Resultado gota gruesa: <div style="border: 1px solid black; height: 100px; width: 100%;"></div>	
Notificante Colaborador Voluntario <input type="checkbox"/> Centro de Salud <input type="checkbox"/> Sector Privado <input type="checkbox"/> Técnico de ETV <input type="checkbox"/> Puesto de Salud <input type="checkbox"/> Hospital Militar <input type="checkbox"/> Centro de Microscopía <input type="checkbox"/> Hospital MSPAS <input type="checkbox"/> IGSS <input type="checkbox"/> Otro: _____			
Nombre del notificante: _____			



REGISTRO DIARIO DE MUESTRAS POSITIVAS DE MALARIA

Área de Salud: _____	Dominio de Salud: _____	Municipio: _____	Servicio de Salud: _____	Límite de Laboratorio: _____	Año:	Resultado del sistema de Laboratorio
Responsable de la información:	Clave y número del responsable:			Mes:		Resultados: 12 Pendientes: 11 Cancelados (P): 11
Fecha:				Día:		
II/ Carga:	Información del Paciente			Residencia:		Fecha de inicio de síntomas (d/m/a)
Reserva de cama:	Nombre y apellidos del paciente			Municipio		Fecha de inicio de muestra enviada (d/m/a)
	Clave rolante y No (I-1)			Localidad		Fecha de diagnóstico (d/m/a)
	Reserva Física			No de caso		
II/ Carga:	II/ Carga:			II/ Carga:		
III/ Carga:	III/ Carga:			III/ Carga:		
IV/ Carga:	IV/ Carga:			IV/ Carga:		
V/ Carga:	V/ Carga:			V/ Carga:		
VI/ Carga:	VI/ Carga:			VI/ Carga:		
VII/ Carga:	VII/ Carga:			VII/ Carga:		
VIII/ Carga:	VIII/ Carga:			VIII/ Carga:		
IX/ Carga:	IX/ Carga:			IX/ Carga:		
X/ Carga:	X/ Carga:			X/ Carga:		
XI/ Carga:	XI/ Carga:			XI/ Carga:		
XII/ Carga:	XII/ Carga:			XII/ Carga:		

CUADRO RESUMEN

FECHA	Nº DE MUESTRAS POSITIVAS	Nº DE MUESTRAS ENVIADAS	Nº DE MUESTRAS RECIBIDAS	Nº DE MUESTRAS ENVIADAS

Muestras para diagnóstico:

- 1) Microscopio
- 2) P. falciparum
- 3) Anotaxi
- 4) Microscopio
- 5) P. falciparum
- 6) P. malariae
- 7) P. vivax
- 8) P. malarum
- 9) P. knowlesi
- 10) P. knowlesi
- 11) P. knowlesi
- 12) P. knowlesi
- 13) P. knowlesi
- 14) P. knowlesi
- 15) P. knowlesi
- 16) P. knowlesi
- 17) P. knowlesi
- 18) P. knowlesi
- 19) P. knowlesi
- 20) P. knowlesi
- 21) P. knowlesi
- 22) P. knowlesi
- 23) P. knowlesi
- 24) P. knowlesi
- 25) P. knowlesi
- 26) P. knowlesi
- 27) P. knowlesi
- 28) P. knowlesi
- 29) P. knowlesi
- 30) P. knowlesi

Muestras control tratamiento:

- 1) Microscopio
- 2) P. falciparum
- 3) Anotaxi
- 4) Microscopio
- 5) P. falciparum
- 6) P. malariae
- 7) P. vivax
- 8) P. malarum
- 9) P. knowlesi
- 10) P. knowlesi
- 11) P. knowlesi
- 12) P. knowlesi
- 13) P. knowlesi
- 14) P. knowlesi
- 15) P. knowlesi
- 16) P. knowlesi
- 17) P. knowlesi
- 18) P. knowlesi
- 19) P. knowlesi
- 20) P. knowlesi
- 21) P. knowlesi
- 22) P. knowlesi
- 23) P. knowlesi
- 24) P. knowlesi
- 25) P. knowlesi
- 26) P. knowlesi
- 27) P. knowlesi
- 28) P. knowlesi
- 29) P. knowlesi
- 30) P. knowlesi

Muestras control embarazo:

- 1) Microscopio
- 2) P. falciparum
- 3) Anotaxi
- 4) Microscopio
- 5) P. falciparum
- 6) P. malariae
- 7) P. vivax
- 8) P. malarum
- 9) P. knowlesi
- 10) P. knowlesi
- 11) P. knowlesi
- 12) P. knowlesi
- 13) P. knowlesi
- 14) P. knowlesi
- 15) P. knowlesi
- 16) P. knowlesi
- 17) P. knowlesi
- 18) P. knowlesi
- 19) P. knowlesi
- 20) P. knowlesi
- 21) P. knowlesi
- 22) P. knowlesi
- 23) P. knowlesi
- 24) P. knowlesi
- 25) P. knowlesi
- 26) P. knowlesi
- 27) P. knowlesi
- 28) P. knowlesi
- 29) P. knowlesi
- 30) P. knowlesi

ANEXO 3

PREPARACIÓN DE COLORANTES Y SOLUCIONES

- **Preparación de la solución Buffer (amortiguadora de fosfatos):**

- **Solución A (solución ácida):**

a) Fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4): 9.2 g.

NOTA: Esta sal se puede sustituir por fosfato potásico (KH_2PO_4)

b) Agua destilada: 1000mL

Disolver la sal (fosfato monobásico de sodio) en una pequeña cantidad de agua destilada (aproximadamente 200mL). Una vez disuelta, agregar agua hasta completar 1000mL. Mezclar bien y guardar en frasco rotulado.

- **Solución B (solución básica o alcalina):**

a) Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4): 9.5 g.

b) Agua destilada: 1000mL

Disolver la sal (fosfato dibásico de sodio) en una pequeña cantidad de agua destilada (aproximadamente 200mL). Una vez disuelta, agregar agua hasta completar 1000mL. Mezclar bien y guardar en frasco rotulado.

- **Solución Buffer (amortiguadora):**

La solución amortiguadora se prepara a partir de estas dos soluciones mezcladas en proporciones que producen un pH en el rango de 7.0 a 7.2. En el Tabla No. 3.1 se señalan las proporciones.

Tabla 3.1 Proporciones de soluciones para preparar la solución amortiguadora

pH	Solución A (ml) NaH_2PO_4	Solución B (ml) Na_2HPO_4	Agua Destilada (ml)	Volumen final (ml)
7.0	39	61	900	1000
7.2	28	72	900	1000

- **Preparación de la solución stock (madre) del colorante de Giemsa:**

La receta es para 500ml de colorante.

Colorante de Giemsa 3.8 gr.

Metanol absoluto 250 mL.

Glicerol 250 mL.



- a. En un balón de fondo plano, disolver el colorante con el metanol.
- b. Cuando el colorante está completamente disuelto, añadir los 250 mL. de Glicerol.
- c. Mezclar bien la solución hasta obtener una mezcla bien homogénea.
- d. Filtrar la solución usando gaza en varios dobleces o con una servilleta gruesa de papel.
- e. La solución filtrada se deposita en un galón de vidrio oscuro. El colorante se debe dejar madurar de 15 a 20 días antes de empezarlo a usar.
- f. Agitar periódicamente para evitar la sedimentación del colorante. Agitar la solución antes de usarlo.
- g. Rotular el colorante y guardarlo en un lugar fresco y oscuro.



GUIA DE EVALUACIÓN DEL COLORANTE

PSMF009

Datos del Colorante

Nombre	
Marca	
Presentación	

Preparación

Lugar de Preparación	
Encargado	
Tiempo	
Cantidad	
Lugar y forma de almacenamiento	

Abastecimiento y distribución

Encargado	
Metodo	
Utilización	

OBSERVACIONES:

--



COLORANTE: CONTROL DE CALIDAD							
			Tiempo de Tinción (minutos)				
			5	10	15	20	30
Gota Gruesa 1	Deshemoglobinización						
	Tinción de Glóbulos Blancos	Núcleo					
		Citoplasma					
	Tinción de parásitos	Núcleo					
Citoplasma							
Gota Gruesa 2	Deshemoglobinización						
	Tinción de Glóbulos Blancos	Núcleo					
		Citoplasma					
	Tinción de parásitos	Núcleo					
Citoplasma							
Gota Gruesa 3	Deshemoglobinización						
	Tinción de Glóbulos Blancos	Núcleo					
		Citoplasma					
	Tinción de parásitos	Núcleo					
Citoplasma							
Gota Gruesa 4	Deshemoglobinización						
	Tinción de Glóbulos Blancos	Núcleo					
		Citoplasma					
	Tinción de parásitos	Núcleo					
Citoplasma							
Gota Gruesa 5	Deshemoglobinización						
	Tinción de Glóbulos Blancos	Núcleo					
		Citoplasma					
	Tinción de parásitos	Núcleo					
Citoplasma							

OBSERVACIONES:

--

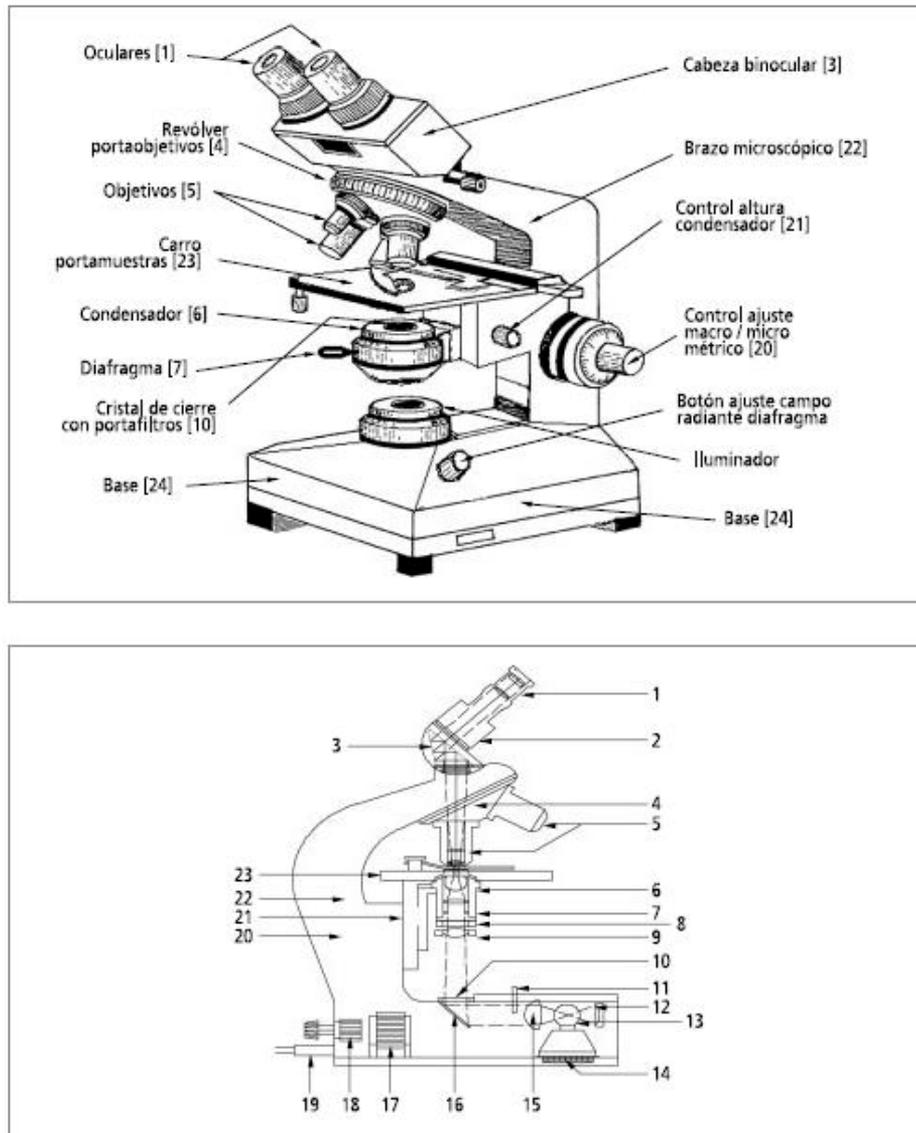
ANEXO 5

EL MICROSCOPIO
Tabla 5.1 Partes del microscopio

N°	SISTEMA	N°	COMPONENTES
1	Cabeza binocular	1	Oculares
		2	Tubo binocular
		3	Cabeza binocular
2	Revolver portaobjetivos	4	Revolver portaobjetivos
		5	Objetivos
3	Plataforma, Platina o carro portamuestras y condensador	6	Condensador
		7	Diafragma de apertura
		8	Portafiltros
		9	Lente de campo amplio
		21	Control de altura del condensador
4	Iluminador	23	Plataforma, platina o carro portamuestras
		10	Cristal de cierre con portafiltros
		11	Palanca de graduación del campo luminoso del diafragma
		12	Espejo cóncavo
		13	Lámpara incandescente
		14	Portalámpara con anillo de ajuste
		15	Lente colector
5	Cuerpo del microscopio	16	Espejo
		17	Transformador interno
		18	Reóstato de control
		19	Cable de alimentación
		20	Control de ajuste macrométrico
		22	Brazo del microscopio
	24	Base	

Fuente: World Health Organization. THE MICROSCOPE, A Practical Guide. Regional Office for South-East Asia WHO. India. 1999

Figura 5.2 Partes del microscopio



Fuente: World Health Organization. THE MICROSCOPE, A Practical Guide. Regional Office for South-East Asia WHO. India. 1999

Sistemas de funcionamiento del microscopio

- **Sistema óptico**
 - Ocular: lente situada cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo.
 - Objetivo: lente situada cerca de la preparación. Amplía la imagen de ésta.
 - Condensador: lente que concentra los rayos luminosos sobre la preparación.
 - Diafragma: Regula la cantidad de luz que entra en el condensador.

- **Sistema mecánico**
 - Soporte: mantiene la parte óptica. Tiene dos partes: el pie o base y el brazo.
 - Platina: lugar donde se deposita la preparación.
 - Cabeza: contiene los sistemas de lentes oculares. Puede ser monocular, binocular.
 - Revólver: contiene los sistemas de lentes objetivos. Permite, al girar, cambiar los objetivos.
 - Control de ajuste macro/micrométrico: Macrométrico que aproxima el enfoque y micrométrico que consigue el enfoque correcto.

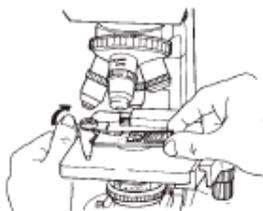
Manejo y uso del microscopio

- a. Retirar la funda protectora y enchufar el cable del microscopio a la fuente de energía.

- b. Accionar el dispositivo de encendido de la bombilla. Ajustar la intensidad de la luz por medio del diafragma o el regulador de la intensidad de la luz de la bombilla, disminuyendo la luz mientras se usan los objetivos de menor aumento.

- c. Colocar la lámina portaobjetos entre los soportes de la platina mecánica del microscopio, verificar que la laminilla no sea puesta hacia abajo. Asegurar la lámina firmemente con las pinzas de la platina.

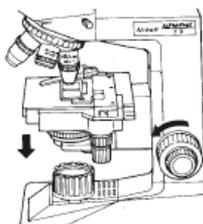
Figura 5.3



Fuente: World Health Organization. THE MICROSCOPE, A Practical Guide. Regional Office for South-East Asia WHO. India. 1999

- d. Girar el revólver hasta que el objetivo 10X quede en posición de trabajo (alineado con los oculares). Se sentirá un golpecito (como un clic) cuando el objetivo llegue a su posición de uso. Asegurarse que el objeto a observar esté centrado justo debajo del objetivo de menor aumento.
- e. Mover el tornillo macrométrico hasta que la platina ascienda lo máximo posible. Mirando a través del ocular, mover suavemente el tornillo macrométrico hasta que aparezca el objeto en el campo visual.

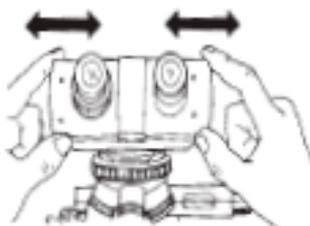
Figura 5.4



Fuente: World Health Organization. THE MICROSCOPE, A Practical Guide. Regional Office for South-East Asia WHO. India. 1999

- f. Colocar el condensador en su posición más alta. Ajustar el condensador (por medio del tornillo del condensador hasta obtener un campo visual uniformemente iluminado.
- g. Ajustar la distancia interpupilar hasta que la imagen derecha e izquierda se conviertan en una sola.

Figura 5.5



Fuente: World Health Organization. THE MICROSCOPE, A Practical Guide. Regional Office for South-East Asia WHO. India. 1999

- h. Para dar nitidez a la imagen (ajuste fino), con el ojo derecho observando el ocular derecho y enfocar moviendo el tornillo micrométrico; y con el ojo izquierdo observando en el ocular izquierdo rotar el ajuste en anillo de este ocular.

Figura 5.6



Fuente: World Health Organization. THE MICROSCOPE, A Practical Guide. Regional Office for South-East Asia WHO. India. 1999

- i. Mover la platina en diferentes direcciones para seleccionar el mejor campo posible.
- j. Para hacer un enfoque con mayor aumento, mover el revólver y colocar en posición de trabajo el objetivo de mayor aumento. Ajustar con el tornillo micrométrico.
- k. Para enfocar con el objetivo 100X, se coloca una gota de aceite de inmersión sobre la muestra y se gira el revolver hasta ubicar el objetivo 100X en posición de trabajo. Ajustar con el tornillo micrométrico.

Figura 5.7



Fuente: World Health Organization. THE MICROSCOPE, A Practical Guide. Regional Office for South-East Asia WHO. India. 1999



- l. Ajustar la intensidad de la luz por medio del diafragma o el regulador de la intensidad de la luz de la bombilla, aumentando la luz mientras se usan los objetivos de mayor aumento.
- m. Al finalizar la observación microscópica, rotar el revolver dejando el microscopio con el objetivo de menor aumento en la posición de enfoque y retirar la lámina portaobjetos del microscopio.
- n. Si utilizó aceite de inmersión, limpiar con papel limpiantes el objetivo de inmersión.
- o. Llevar el dispositivo que regula la intensidad luminosa hasta cero y apagar la fuente de luz. Desenchufar el microscopio y colocarle la funda protectora.

Cuidados del microscopio

Después del uso:

- Limpiar el aceite de inmersión del objetivo 100x. Usar papel limpiantes.
- Limpiar la platina o carro portamuestras con papel limpiantes.
- Limpiar el condensador.
- Llevar el dispositivo que regula la intensidad luminosa hasta cero y luego apagar completamente la fuente de luz. Desenchufar el microscopio
- Colocarle la funda protectora.

Cuidado cada mes:

- Remover las partículas de polvo que pueda tener el cuerpo del microscopio. Usar una pieza de tela humedecida con agua destilada.
- Retirar las partículas de polvo de los elementos ópticos externos de los oculares, objetivos y del condensador. Utilizar un pincel de pelo natural y posteriormente una pera de caucho o plástico para soplar aire.
- A continuación, limpiar la superficie de los lentes con solución limpiadora de lentes (etil éter, xileno). No aplicar directamente esta solución a los lentes, sino en papel limpiantes y luego frotar suavemente la superficie de los mismos con el papel mencionado.



Cuidado del microscopio cada seis meses:

- Efectuar una inspección visual general del microscopio. Verificar que cada componente se encuentre en buen estado, esté limpio y bien ajustado mecánicamente.
- Verificar que en el lugar de instalación se conserven las condiciones de buena ventilación, control de humedad y temperatura.
- Comprobar la calidad del sistema eléctrico que alimenta el microscopio. Verificar la integridad de los conectores, los fusibles y la lámpara incandescente. Evitar tocar con los dedos la superficie de la bombilla ya que las huellas digitales disminuyen la intensidad lumínica.

Mantenimiento básico del microscopio:

- Verificar el ajuste de la plataforma mecánica. La misma debe desplazarse suavemente, en todas las direcciones (X-Y) y debe mantener la posición que selecciona o define el microscopista.
- Comprobar el ajuste del mecanismo de enfoque. Al momento de enfocar, el enfoque seleccionado debe mantenerse. No debe variar la altura asignada (no debe bajarse la platina por sí sola).
- Verificar el funcionamiento del diafragma.
- Limpiar el cuerpo del microscopio con una solución jabonosa. Después que la grasa y la suciedad hayan sido removidas, debe limpiarse el cuerpo del microscopio con una solución 50/50 de agua destilada y etanol al 95%. No aplicar al sistema óptico.
- Las partes mecánicas, integradas por los mecanismos de ajuste macro/micrométrico, el mecanismo de ajuste del condensador y los mecanismos de la platina deben ser lubricados con aceite fino de máquina, para permitir su desplazamiento suave.
- Confirmar el ajuste de las pinzas de la platina.
- Verificar el alineamiento óptico.



ANEXO 6

PSMF010

Consolidado de Actividad de Capacitación

Área de Salud: _____

Nombre de capacitación: _____

Lugar y fecha: _____

Capacitador: _____

Contenido (resumen): _____

Informe:

Nombre de Participante	Prueba teórica		Prueba práctica	
	Nota prueba inicial	Nota prueba final	Nota prueba inicial	Nota prueba final

Conclusiones:

Nota: Incluir una lista con nombre, número de teléfono y firmas de los participantes.



ANEXO 7

PSMF011

CONSOLIDADO DE SUPERVISIÓN

Área de Salud: _____

Supervisor: _____

Fecha Supervisión	Microscopista Supervisado	Laboratorio	Observaciones más relevantes	Recomendaciones

CONSOLIDADO DE CONTROL DE CALIDAD DE MICROSCOPIA PARA MALARIA

AREA DE SALUD: _____ AÑO: _____

Formato disponible en versión digital, en este documento se consolida la información de control de calidad de cada microscopista participante.

Mes	No Corr	Recepción de muestra	Nombre de persona evaluada	Procedencia	Área de Salud	Recibidas +	Controladas +	Laminas Recibidas	Láminas Controladas	% Controlado
1						-	-			
2										
3										
4										
5										



Estas columnas se llenarán automáticamente





.+ / -	Concordancia		Observaciones	Reportado el	No. de meses controlados	Mes Controlado
	Especie	Densidad				

.+ / -	Concordancia		Observaciones	Reportado el	No. de meses controlados	Mes Controlado
	Especie	Densidad				



Estos datos se obtienen del informe de control de calidad



ANEXO 9

PSMF013

FORMULARIO DE VISITA DE SUPERVISIÓN A LABORATORIOS DE MICROSCOPIA DE MALARIA

I. Información General

(1) Laboratorio:	(2) Fecha de visita (dd/mm/aaaa) ____ / ____ / _____
(3) Tipo de servicio:	<input type="checkbox"/> Puesto de Salud <input type="checkbox"/> Centro de Atención Permanente <input type="checkbox"/> Centro de Salud <input type="checkbox"/> Centro Periférico de Microscopía <input type="checkbox"/> Laboratorio de ETV <input type="checkbox"/> Hospital Nacional <input type="checkbox"/> Hospital/Laboratorio Privado <input type="checkbox"/> Otro: _____
Dirección: _____ Coord. GPS: _____	
(4) Municipio: _____ (5) Departamento: _____	
(6) Teléfono/Fax: _____ (7) Correo electrónico: _____	
Nombre del director de la institución: _____	
Nombre del microscopista: _____ Teléfono: _____	
Fecha de último entrenamiento/capacitación: ____ / ____ / _____	

II. Producción (diagnóstico o control de calidad, según aplique)

Producción de láminas de los últimos tres meses	1)mes: _____	Cantidad: _____
	2)mes: _____	Cantidad: _____
	3)mes: _____	Cantidad: _____
Promedio de láminas por mes	_____	
Promedio de láminas por día	_____	
Observaciones: _____		



III. Instalaciones y servicios

	Bueno	Deficiente	Observaciones
Espacio de la mesa de trabajo			
Silla o banco de trabajo			
Lavatrastos/ área de tinción			
Suministro de agua potable continuo			
Iluminación natural			
Alimentación de energía eléctrica			
Ventilación			
Espacio de almacenamiento para materiales e insumos			
Sistema de manejo de desechos			

IV. Microscopio

Marca _____ Modelo _____ Serie _____

	Si	No	Observaciones
El microscopio se encuentra en buen estado			
La lámpara cuenta con suficiente energía y provee una iluminación adecuada			
Los extendidos sanguíneos se pueden enfocar claramente en magnificación a 100x			
El movimiento de la platina es preciso y estable			
Se le da mantenimiento regular al microscopio			
El microscopio se cubre con guardapolvos cuando no está en uso			
Existe un servicio para reponer piezas, bombilla o ajustes necesarios			

V. Insumos

	Si	No	Observaciones
Las láminas son de buena calidad y están limpias antes de su uso			
Existe suficiente abastecimiento de láminas según la carga de trabajo			
La solución madre del colorante se resguardan de la luz y alejadas de fuentes de calor			
Las soluciones de colorante comerciales se encuentran dentro de la fecha de expiración			
El tapón de la solución de colorante se encuentra correctamente colocado			
Se utiliza solución tampón (buffer) pH 7.2 para la preparación del colorante y lavado			
Hay abastecimiento de agua desmineralizada y sales para preparar el buffer			
Se cuenta con metanol para el fijado de los frotos sanguíneos			
Se cuenta con alcohol y algodón para la toma de muestra			
Hay abastecimiento de lancetas de seguridad para la toma de muestra			
Frasco para preparación de solución de trabajo de colorante			
Barillas para tinción			
Tabla para secado de láminas			
Cronómetro/Reloj			
Papel limpia lentes			
Aceite de inmersión			
Cajas porta láminas			



VI. Documentación y registros

	Si	No	Observaciones
Libro de registro de muestras diagnosticadas (Formato SIGSA L-1)			
Formularios de muestra (Formato E-1)			
Formulario de referencia de muestra (Epificha)			
Registro de control de calidad de colorante			
Registro de control de calidad interno			
Copia de Solicitud de Control de Calidad enviados			
Copia de informes de Control de Calidad recibidos			
Manual de Normas y Procedimientos para el Diagnóstico de Malaria			
Ayudas visuales (si están disponibles)			
Documentación de uso y mantenimiento de equipo (si están disponibles)			
Archivos y documentación en orden y actualizados			

VII. Indicadores de calidad y desempeño

	Si	No	Observaciones
El laboratorio cumple con el programa nacional de control de calidad			
El desempeño del laboratorio en el control de calidad es satisfactorio			
Cuenta con manuales y guías sobre el control de calidad externo e interno			
Existe un plan para evitar la discontinuación del trabajo			
Se trabaja una estadística mensual de la producción/carga de trabajo			

OBSERVACIONES: _____



CONSTANCIA DE SUPERVISIÓN

PSMF014

IDENTIFICACIÓN DEL LABORATORIO: _____
 NOMBRE DEL TÉCNICO: _____ TELÉFONO: _____
 DIRECTOR DEL SERVICION: _____
 FECHA DE SUPERVISIÓN: _____

Cantidad de diagnósticos mensuales		
Envío de control de calidad		
Fecha de última capacitación		
Comentarios		
Recomendaciones		
Compromisos adquiridos	Por parte del Supervisor	
	Por parte del Servicio	

F) _____
 Supervisor de la Red de Laboratorios de Malaria

F) _____
 Responsable Servicio y sello



ANEXO 10

EJEMPLO DE CONVOCATORIA DE CONTROL DE CALIDAD DE MALARIA

PSMF015

Fecha: _____

Cumpliendo con el procedimiento establecido en el “Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Malaria”, solicitamos a usted nos envíe todas las láminas positivas y negativas correspondiente al mes de..... del año, con sus números y resultados correspondientes.

Si su laboratorio no está trabajando, no ha cumplido con el procedimiento de conservación de láminas o no ha realizado el diagnóstico, por favor informarlo por escrito, indicando las razones del caso.

Atentamente:

LABORATORIO SUPERVISOR
Firma y sello



ANEXO 11

PSMF016

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
 LABORATORIO NACIONAL DE SALUD
 Km. 22 Carretera al Pacífico, Bárcena Villa Nueva

**SOLICITUD DE CONTROL DE CALIDAD
 MALARIA**

TODA INFORMACIÓN DEBE DE SER CANALIZADA A TRAVÉS DE LA JEFATURA DEL ÁREA CORRESPONDIENTE.

Área de Salud: _____ Fecha: _____

Nombre del responsable: _____

Servicio de salud: _____

Láminas correspondientes al mes de: _____

Total de láminas negativas: _____

Total de láminas positivas: _____

INFORME DEL TOTAL DE LÁMINAS POSITIVAS

No. de identificación de la lámina	Gota Gruesa realizada por el personal del Laboratorio de Hospital *	Gota gruesa realizada por el personal del Laboratorio de Centro de Salud o Centro de Microscopía *	Gota gruesa realizada por personal del Puesto de Salud, por Colaborador Voluntario o por personal de ETV *	DIAGNÓSTICO DEL REFERENTE **	DIAGNÓSTICO DEL REVISOR ***

* Colocar una equis (X) en cualquiera de los tres espacios para indicar el lugar en donde fue realizada la gota gruesa.
 ** Se coloca el resultado del técnico que realiza el diagnóstico de la gota gruesa.
 *** Área destinada para anotar los resultados de la persona que realiza el control de calidad. **Nota: Se debe enviar el total de láminas negativas y positivas.**



ANEXO 12

PSMF017

Programación anual de envío de láminas de control de calidad de malaria

Área de Salud: _____

Año programado: _____

El Área de Salud y el laboratorio supervisor preparan esta programación y guarda un ejemplar. Esta programación no la debe conocer los laboratorios a supervisar. Cada primera semana del mes, el laboratorio supervisor solicita las láminas del mes anterior al laboratorio que se va a controlar, mediante una convocatoria de control de calidad.

Nota: El microscopista de referencia certificado, deberá velar por el cumplimiento de esta programación.

Laboratorio a supervisar	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre

Hoja de control de calidad de malaria

Nota: Para cada lámina incluida en el control de calidad, deberá calificar con una "X" la calidad del extendido y coloración, además deberá escribir el diagnóstico observado en la casilla de "Diagnóstico revisor". Una vez concluida la observación de todas las láminas, anotar en la casilla "Diagnóstico referente" los diagnósticos reportados por el microscopista evaluado.

El técnico que hace la relectura no debe conocer el diagnóstico del referente. Por lo tanto la última columna se llenará después de terminar la relectura.

	MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL LABORATORIO NACIONAL DE SALUD Km. 22 Carrizosa al Pacifico, Sarcocha, Villa Nueva Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica Sección de Parasitología
	HOJA DE CONTROL DE CALIDAD DE MALARIA LABORATORIO CENTRAL Y DE REFERENCIA DE MALARIA CONTROL DE CALIDAD NO. _____

Laboratorio de: _____
 Nombre del Técnico: _____

 Fecha de Recepción: _____
 Fecha de Revisión: _____

Lámina No.	Calidad del Extendido			Calidad de la Coloración			Diagnóstico Referente	Diagnóstico Revisor	Otras
	Buena	Gruesita	Delgadita	Irregular	Buena	Preparado			

NOMBRE DEL REVISOR: _____
FIRMA: _____



Anexo 14

Informe de Control de Calidad de Malaria

Formato disponible en versión digital

PSMF018

Fecha de evaluación:	
Laboratorio Supervisor:	
No. Correlativo de Ingreso al LNS:	/Año de evaluación

Periodo evaluado:
Laboratorio Supervisado:
Nombre del Microscopista:

1. Resultados:

	Positivas	Negativas	Total
Láminas enviadas a control:			
Láminas controladas:			

	Láminas	Porcentaje	
FALSOS POSITIVOS:	No.	%	(del total de láminas positivas controladas)
FALSOS NEGATIVOS:	No.	%	(del total de láminas negativas controladas)
Láminas No Concordantes por especie	No.	%	(del total de láminas positivas controladas)
Láminas No Concordantes por densidad	No.	%	(del total de láminas positivas controladas)

2. Técnicas:

	Láminas	Porcentaje	
EXTENDIDO: No de Láminas con Observaciones		%	(del total de láminas controladas)
COLORACIÓN: No Láminas con Observaciones		%	(del total de láminas controladas)

3. Recomendaciones



4. ANEXOS. LÁMINAS CON DISCORDANCIA CUALITATIVA o CUANTITATIVA o Deficiencia en la Técnica (si las hubiere)

A. DIAGNÓSTICO

		Supervisor	
		Positivo	Negativo
Microscopista	Positivo		
	Negativo		
Porcentaje de Concordancia		_____ x 100 =	
Falsos Positivos		_____ x 100 =	
Falsos Negativos		_____ x 100 =	

B. ESPECIE

		Supervisor		
		<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Mixto
Microscopista	<i>P. vivax</i>			
	<i>P. falciparum</i>			
	Mixto			
Porcentaje de Concordancia		_____ x 100 =		
Láminas mal Clasificadas		_____ x 100 =		

C. DENSIDAD

	Concuera	No Concuera	Total
Porcentaje de Concordancia	_____ x 100 =		
Láminas con mala Densidad	_____ x 100 =		



Anexo.

LÁMINAS CON DISCORDANCIA CUALITATIVA o CUANTITATIVA o Deficiencia en la Técnica

No. de lámina	Diagnóstico Referente	Diagnóstico Revisor	Deficiencia Técnica

ANEXO 15

INSTRUCTIVO DE EVALUACIÓN DE CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DIRECTO EN EL DIAGNÓSTICO POR GOTA GRUESA Y FROTIS DE MALARIA POR COLORACIÓN GIEMSA

Definición: Es un sistema formal para estimar el cumplimiento de la calidad diagnóstica de malaria. Su importancia es documentar a través de un panel de evaluación, cuán eficaz es la certeza diagnóstica de un microscopista y en cuales áreas necesita apoyo para mejorar. Los paneles de láminas incluirán preparaciones de gota gruesa y frotis, los cuales serán elaborados de manera uniforme entre sí (especie, parasitemia, estadíos) de forma que la evaluación sea comparable cuando se usen paneles del mismo tipo para evaluar distintos laboratorio. Se incluirán las especies presentes en el país, diferentes densidades parasitarias y muestras negativas.

Objetivo: La evaluación del control de calidad directo tiene por objetivo poder hacer una estimación cuantitativa y cualitativa del desempeño diagnóstico que tienen los microscopistas que integran la red de laboratorios de malaria.

1. Control de Calidad Externo Directo

Esta evaluación se realiza en todos los niveles de la red de laboratorios con una frecuencia mínima de una vez por año. El Laboratorio Nacional de Salud (LNS) brinda apoyo en la preparación de paneles de láminas de calidad óptima y resultados conocidos para evaluar la capacidad diagnóstica de los microscopistas de la Red Nacional de Laboratorios de Malaria (RNLM). El evaluado examina las láminas como parte de su rutina diaria y luego envía el resultado al LNS.

El LNS será objeto a su vez de un control de calidad externo realizado por un laboratorio internacional reconocido para tal fin, en este caso el Laboratorio Regional de Honduras.

2. Procedimiento

2.1 Laboratorio Local de Referencia (LLR)

Este tipo de Control de Calidad Externo Directo será dirigido del Laboratorio Nacional de Salud hacia los Laboratorios Locales de Referencia.

- 2.1.1** El Laboratorio Nacional de Salud envía un panel de láminas para control de calidad externo directo a los Laboratorios Locales de Referencia, según calendarización anual. Adjunto al panel se enviará una carta de compromiso, la cual deberá firmar el microscopista y enviar de nuevo al Laboratorio Nacional de Salud ya sea vía electrónica o física.
- 2.1.2** Se coordina el envío del panel de láminas a la DAS correspondiente. A partir que el microscopista recibe el panel de láminas, tendrá 10 días hábiles para el reporte de resultados y 10 días hábiles más para la devolución del panel al Laboratorio Nacional de Salud, a menos que se indique de manera diferente.



- 2.1.3** El microscopista observará cada lámina como parte de su rutina diaria, notará que cada lámina tiene colocado un cubre objeto sellado sobre la muestra de interés a observar.
- 2.1.4** Terminado de observar la totalidad del panel, se procede al registro de los resultados a un formato electrónico en el cual se ingresarán digitalmente los resultados obtenidos en cada lámina observada, reportando el diagnóstico (positivo o negativo), especie y densidad parasitaria (sexual y asexual).
- 2.1.5** Para el análisis de la concordancia en la densidad parasitaria, se considerará concordante si la densidad reportada es \pm una cruz (sistema semi-cuantitativo) en comparación con los resultados conocidos por el Laboratorio Nacional de Salud.

Se consideran satisfactorios los siguientes resultados:

- Concordancia en el Resultado (+ / -)
Aceptable 95 - 100%; No aceptable < 95%
- Concordancia en la Especie
Aceptable 95 - 100%; No aceptable < 95%
- Concordancia en el Estadío
Aceptable 80 - 100%; No aceptable < 80%
- Concordancia en la Densidad Parasitaria
Aceptable 80 - 100%; No aceptable < 80%

- 2.1.6** El reporte de resultados será socializado en un máximo de 10 días hábiles al microscopista evaluado, Director del distrito, Químico Biólogo DAS y Coordinador de ETV.

2.2 Red de laboratorios locales (CS, CAP, Hospitales, CPM)

- 2.2.1** El Laboratorio Local de Referencia recibe panel de evaluación por parte del LNS y realiza una programación, indicando las fechas en que se realizará la lectura del panel por cada laboratorio que forma parte de la red de microscopistas local. Dicha programación deberá ser avalada por el Laboratorio Nacional de Salud.



- 2.2.2** Se coordina el envío del panel de láminas del microscopista de referencia hacia el laboratorio evaluado y junto con el panel se estará enviando un formato para el registro de los resultados. A partir que el microscopista recibe el panel de láminas, tendrá 10 días hábiles para el reporte de resultados y 10 días hábiles más para la devolución del panel al Laboratorio de Referencia de la DAS.
- 2.2.3** El microscopista observará cada lámina como parte de su rutina diaria, notará que cada lámina tiene colocado un cubre objeto sellado sobre la muestra de interés a observar.
- 2.2.4** Terminado de observar la totalidad del panel, se procede al registro de los resultados en el formato provisto por el LLR junto con el panel, en el cual se ingresarán manualmente los resultados obtenidos en cada lámina observada, reportando el diagnóstico (positivo o negativo), especie y densidad parasitaria (sexual y asexual).
- 2.2.5** Para el análisis de la concordancia en la densidad parasitaria, se considerará concordante si la densidad reportada es \pm una cruz (sistema semi cuantitativo) en comparación con los resultados conocidos por el Laboratorio Nacional de Salud.
- 2.2.6** El panel y el formato de resultados del control de calidad directo deberán ser entregados al Laboratorio Local de Referencia (LLR) en un período no mayor a 10 días hábiles desde su recepción y análisis.

2.3 Ingreso de Resultados

El ingreso de los resultados será en el Formato de Registro de Resultados de Control de Calidad Directo” de la siguiente manera:

- 2.3.1** Encabezado de identificación:
Se deben llenar obligatoriamente todos los campos, indicando el área de salud, el nombre del microscopista, la fecha de recepción, fecha de reporte y código



de panel. En caso de tratarse de un Laboratorio Local (LL), se debe indicar la localidad donde está ubicado.

2.3.2 Ingreso de resultados:

Columna 1: Código – Se debe ingresar el código de cada lámina, el cual se encuentra en orden correlativo en el panel. Cualquier resultado que carezca de la identificación del código de la lámina no se tomará en cuenta para el control de calidad.

Columna 2: Resultado - **El resultado** debe indicar si lo observado en la lámina se reporta como:

- Negativa = No se observó Plasmodium.
- Positiva = Se observa Plasmodium.

Columna 3: Especie, estadio y densidades. En el caso en que las láminas sean registradas como positivas, se deben registrar las densidades en el sistema semi cuantitativo (en cruces) para cada estadio sexual y asexual, según especie, indicado por el encabezado de cada columna.

Todas las opciones posibles son:

- *P. vivax* Asexuado (trofozoitos y esquizontes)
 - *P. vivax* Sexuado (gametocitos)
 - *P. falciparum* Asexuado (trofozoitos y esquizontes)
 - *P. falciparum* Sexuado (gametocitos)
-
- Si las casillas aparecen en blanco para estadio y densidad, no se considerará para el resultado.
 - Para el análisis de la Concordancia en la Densidad Parasitaria, se calificará concordante si el número de parásitos reportados es \pm una cruz del recuento (sistema semi-cuantitativo) en comparación con los resultados conocidos por el Laboratorio Nacional de Salud.



Formato de registro de resultados de control de calidad directo

Área de Salud: _____ Nombre del microscopista: _____

Código del panel: _____ Fecha de recepción del panel: _____

Fecha de observación del panel: _____

RESULTADO DE PANEL DE EVALUACIÓN					
Código	Resultado (Positivo o Negativo)	<i>P. vivax</i> Asexuado*	<i>P. vivax</i> Sexuado*	<i>P. falciparum</i> Asexuado*	<i>P. falciparum</i> Sexuado*
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

*Reportado en sistema semi cuantitativo de cruces (+/2,+, ++, +++, +++++)

3. Lineamientos adicionales

- Los supervisores de la red nacional de malaria pueden solicitar al microscopista del LLR que envíe de regreso el panel al Laboratorio Nacional de Salud. Esto deberá de coordinarse de manera oportuna para evitar retrasos en el uso de los paneles.
- Cualquier daño a la integridad de las muestras deberá ser notificado a los supervisores, indicando la causa y tipo de daño sufrido. Las muestras dañadas irreparablemente deberán ser repuestas, de acuerdo a lo indicado por los supervisores de la red de malaria.
- El tiempo óptimo para el reporte de resultados es de 10 días después de recibido el panel por el microscopista. Cualquier retraso deberá ser comunicado lo antes posible a los supervisores de la red de malaria. Los resultados tardíos no serán tomados en cuenta para el control de calidad directo y el proceso de evaluación del desempeño en el diagnóstico microscópico de malaria.

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
Dirección General de Regulación, Vigilancia y Control de la Salud
Laboratorio Nacional de Salud
Km 22 Carretera al Pacífico, Bárcenas, Villa Nueva, Guatemala, C.A.

Tel: (502) 6644-0599

Correo electrónico: informacion@lns.gob.gt / supervisores.malaria@lns.gob.gt



Invirtiendo en nuestro futuro

El Fondo Mundial

De lucha contra el SIDA, la tuberculosis y la malaria