



**MANUAL OPERATIVO ESTANDAR PARA LA GESTION
DEL DIAGNOSTICO MICROSCOPICO DE
*PLASMODIUM.***

ECUADOR, 2008

SNEM-RAVREDA

El presente documento fue preparado y revisado con la participación de:

**Dr. Cesar Díaz Cortéz
Dr. Raúl Veloz Pérez
Dr. Julio Valencia Zamora.
Dra. Mercy Silva Bravo
Dr. Eduardo Gómez Landires
QF. Jorge Suárez Lozano
Dr. Franklin Bajaña Loor
Lcda. Tania Ordóñez León
Telg. Mauricio Muñoz Quiñónez
Sra. Rosa Alba Quintero Montaña
Sra. Belinda Palacios Villamar
Sr. Marcelo Andrade**

**Asesora Técnica:
Dra. Jackeline Alger. MD.PhD**

COOPERACION TECNICA OPS/OMS

RECONOCIMIENTOS

Para la elaboración de este documento se contó con el valioso aporte de la Dra. Jackeline Alger, a través de una Consultoría facilitada por OPS/OMS en el marco del proyecto RAVREDA-AMI Ecuador, se reconoce el apoyo brindado por los equipos de trabajo provinciales del Proyecto y las facilidades prestadas por Autoridades del Ministerio de Salud Pública para la elaboración de este documento.

PROLOGO

Pendiente.....

Dra. Celia Riera,
Coordinadora Subsede OPS/OMS, Guayaquil

INDICE

PAGINA

Capitulo I.- Aspectos generales de la malaria y principios del diagnóstico microscópico:

- 1.1 Introducción.....
- 1.2 Malaria: la enfermedad.....
- 1.3 Situación epidemiológica de la malaria en Ecuador.....
- 1.4 Aspectos generales sobre el diagnóstico microscópico.....
- 1.5 Otros métodos de diagnóstico.....
- 1.6 Malaria y su tamizaje en bancos de sangre.....

Capitulo II.- Calidad y Calidez

- 2.1 Componentes indispensables de la calidad
- 2.2 El entorno de las personas (usuarios) y usted
- 2.3 Cómo romper el hielo o llegar a las personas con más facilidad?
- 2.4 Estrategias a considerar para trabajar con calidez:
- 2.5 El Lugar de trabajo

CAPITULO III.- Normas de bioseguridad

- 3.1 Conducta Individual
- 3.2 Manejo del paciente, desechos y sitios de trabajo

CAPITULO IV.- Preparación de las muestras y coloración:

- 4.1 Obtención y manejo de muestras.....
- 4.2 Listado de insumos y equipos.....
- 4.3 Procesamiento y coloración de la gota gruesa y frotis.....
- 4.4 Preparación de colorantes y soluciones.....
- 4.5 Tinciones para el diagnóstico de malaria.....
- 4.6 Coloración de la gota gruesa.....
- 4.7 Errores comunes en la preparación de las muestras.....
- 4.8 Transporte y envío de muestras desde el puesto de C. Voluntario.....

CAPITULO V.- Características Diagnósticas de los parásitos *Plasmodium*:

- 5.1. Elementos formes de la sangre.....
- 5.2. Características morfológicas del *Plasmodium* spp.....
- 5.3. Artefactos.....
- 5.4. Otros Parásitos.....

CAPITULO VI.- Observación microscópica de las muestras de sangre:

- 6.1. Lectura de la gota gruesa.....
- 6.2. Lectura del frotis.....
- 6.3. Estimación de la densidad parasitaria
- 6.4. Informe de resultados e interpretación
- 6.5. Evaluación de la respuesta terapéutica

CAPITULO VII.- Red de Puestos de Diagnóstico, laboratorios y sistema de información:

- 7.1. Estructuración de la red de laboratorios.....
- 7.2. Funciones específicas de los puestos de Diagnóstico y laboratorios de diferentes niveles.....
- 7.3. Sub-sistema de información.....

CAPITULO VIII.- Supervisión y control de calidad:

- 8.1. Gestión de la Garantía de la calidad en el Diagnóstico Microscópico de la Malaria.....
- 8.2. Control de calidad.....
- 8.2.1. Control de calidad interno.....
- 8.2.2. Evaluación Indirecta.....
- 8.2.3. Auditoria.....
- 8.3. Supervisión.....
- 8.4. Control de Calidad.....
- 8.5. Evaluación externa de desempeño.....
- 8.6. Análisis de resultados del control de calidad y medidas correctivas

CAPITULO IX.- Lineamientos para diagnóstico rápido y tratamiento oportuno de la malaria.

- 9.1. Capacitación de la red zonal de microscopistas y técnicos.....
- 9.2. Supervisión de la red de puestos de diagnóstico, laboratorios y control de calidad.....
- 9.3. Participación comunitaria.....

CAPITULO X.- Limpieza y almacenamiento de las láminas portaobjetos

CAPITULO XI.- El Microscopio:

- 11.1. Introducción.....
- 11.2. Partes del microscopio.....
- 11.2.1. El sistema mecánico.....
- 11.2.2. El sistema de ajuste.....
- 11.2.3. El sistema óptico.....
- 11.2.4. Componentes de iluminación y su función.....
- 11.3. Trayectoria del rayo de luz a través del microscopio.....
- 11.4. Propiedades del microscopio.....
- 11.5. Campo del microscopio.....
- 11.6. Uso del microscopio.....
- 11.7. Cuidados del microscopio.....

GLOSARIO.....

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....

- ANEXO 1.- Ciclo biológico del *Plasmodium*
- ANEXO 2.- Acreditación
- ANEXO 3.- Programa de capacitación y objetivos de aprendizaje
- ANEXO 4.- Selección de personal que se desempeñara como microscopista
- ANEXO 5.- Sistema de Garantía de Calidad (Formulario de Supervisión)
- ANEXO 6.- Informe semanal de producción de microscopista

- (Formulario E – 1)
- ANEXO 7.- Registro semanal de muestras positivas (Formulario E-2)
- ANEXO 8.- Formulario control de calidad (CC-2)
- ANEXO 9.- Formulario de registro de casos con diagnóstico positivo (RP- 1)
- ANEXO 10.- Formulario OC – 19
- ANEXO 11.- Formulario para el envío de laminas a control de calidad
(evaluación externa de desempeño (CC-1))
- ANEXO 12.- Esquemas de tratamiento antimalárico

CAPITULO I.- ASPECTOS GENERALES DE LA MALARIA Y PRINCIPIOS DEL DIAGNOSTICO MICROSCOPICO.

1.1.- Introducción:

La malaria constituye aún una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, se la encuentra en alrededor de 128 países situados entre los 40° latitud norte y 60° latitud sur, está presente como una patología endémica en zonas tropicales y subtropicales del planeta, y se estima que anualmente se producen entre 300 y 500 millones de casos de malaria clínica y hasta tres millones de muertes, principalmente en niños, embarazadas y ancianos, la mayoría de estos en países del África sub-sahariana. En la última década la situación epidemiológica de la malaria se ha deteriorado en algunos países y está re-emergiendo vinculada a las crisis ambientales, políticas y sociales, y favorecida también por factores agravantes tales como la diseminación de la resistencia del parásito a los medicamentos antimaláricos y del vector a los insecticidas.

La malaria es producida por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida a través de la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles*. También puede ser transmitida por transfusión sanguínea, vía placentaria o durante el parto. En la sub-región andina prevalece la malaria producida por *P. vivax*, seguida por *P. falciparum*, no detectándose *P. malariae*, ni *P. ovale*; Colombia, Perú y Venezuela aportan con alrededor del 67% de todos los casos, presentándose en el último lustro una drástica disminución de la transmisión en Bolivia y Ecuador. Luego de varias evaluaciones realizadas en la región se determinó la presencia de resistencia del *P. falciparum* a los esquemas de monoterapia basados en cloroquina, por lo que todos los países modificaron sus esquemas a terapia de combinación basados en artemisinina. La cloroquina continua siendo eficaz para el tratamiento de casos producidos por *P. vivax*. En Ecuador de 106.641 casos diagnosticados en el año 2001 se redujo a 8.464 en el 2007, 1.158 de los cuales correspondían a *P. falciparum*.

Para la identificación de la especie y estadios de los parásitos *Plasmodium*, la microscopía es un método sensible y específico. La toma de la muestra y su procesamiento pueden ser relativamente sencillos, así como la lectura de láminas coloreadas por un microscopista capacitado. Sin embargo, el factor humano hace que la calidad de la técnica sea variable y se puede observar personal con la misma capacitación desempeñando sus funciones con diferentes niveles de responsabilidad. La calidad y formulación constante del colorante son factores críticos para un diagnóstico microscópico de una calidad aceptable. Con todo, aun un microscopista responsable y capacitado tiene un límite de láminas por día que puede examinar con

precisión, para lo cual requiere de un microscopio con objetivo de inmersión, en buen estado y con buen mantenimiento.

El presente documento está dirigido al personal que realiza diagnóstico microscópico de la malaria en la Red del SNEM y de Servicios de Salud públicos y privados. Se elaboró con el propósito de fortalecer el diagnóstico a través del manejo de criterios unificados. Su contenido incluye textos, diagramas, figuras y fotografías, en secciones que explican de manera práctica aspectos clínicos y epidemiológicos de la enfermedad, el proceso de preparación y coloración de las muestras de sangre, la observación microscópica de la gota gruesa y extendido fino, el registro de la información producida por las unidades de diagnóstico y el control de calidad. El manual se utilizara como instrumento básico de capacitación.

1.2.- Malaria la enfermedad:

La reproducción asexual de los parásitos *Plasmodium* en la fase sanguínea es la responsable de las manifestaciones clínicas de la malaria (ver ciclo de vida en Anexo 1). La enfermedad se puede manifestar con sintomatología aguda, sintomatología crónica o infecciones subclínicas, y los casos pueden ser no complicados o complicados y graves.

La malaria no complicada se caracteriza por el paroxismo malárico: escalofrío, fiebre y sudoración. Hay postración durante el pico febril y mejoría en ausencia de la fiebre. El paroxismo se presenta cada tercer día en infecciones con parásitos sincronizados que cumplen la esquizogonia simultáneamente. En infecciones con parásitos en diferentes estadios, el paroxismo puede ser diario. Los pacientes pueden presentar visceromegalia dolorosa y anemia.

Cualquier paciente incapaz de deglutir tabletas, con evidencia de disfunción de órganos y sistemas, ó con una densidad parasitaria superior a 250,000 parásitos/ μ l de sangre o 5% de eritrocitos parasitados, está en riesgo de complicarse y fallecer. La intensidad del riesgo dependerá del grado de las anormalidades, la edad, la inmunidad y acceso a tratamiento oportuno y apropiado. Entre las complicaciones más frecuentes están las hematológicas (anemia, leucopenia, trombocitopenia, pancitopenia, hemorragia, hemólisis), digestivas (diarrea, vómitos incoercibles), metabólicas (deshidratación, hipoglicemia, acidosis), renales (oliguria, anuria, insuficiencia renal aguda), respiratorias (edema pulmonar, insuficiencia respiratoria), y neurológicas (convulsiones, alteraciones de conciencia, coma). Las complicaciones se pueden presentar con cualquiera de las especies de *Plasmodium* pero *P. falciparum* se ha asociado a los casos graves y complicados con mayor frecuencia por sus características biológicas: 1) produce hiperparasitemia; 2) se citoadhiera o secuestra en la microvasculatura; y 3) está asociado a multi-drogo-resistencia, fenómeno extendido en Asia, África y América del Sur.

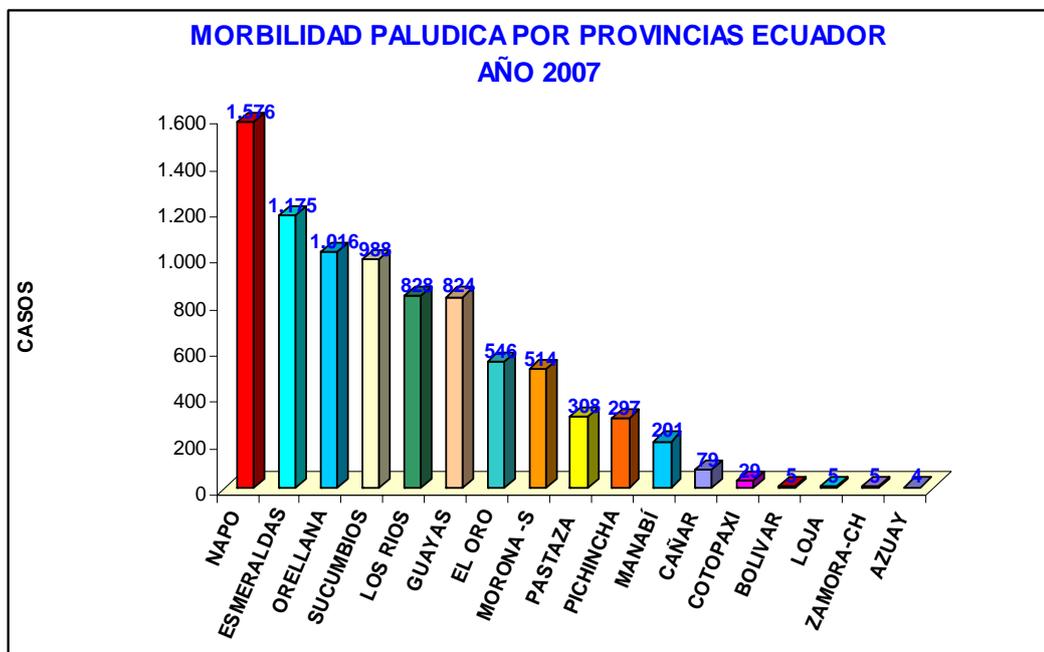
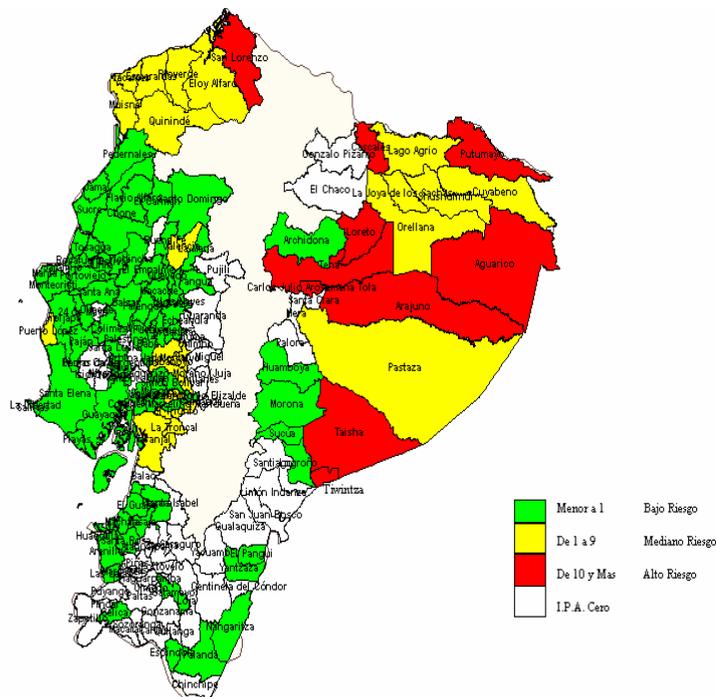
La malaria crónica se caracteriza por febrícula, anemia, debilidad y visceromegalia no dolorosa. Se denomina malaria subclínica a las infecciones en pacientes sin historia de fiebre, aunque pueden informar otros síntomas como cefalea y debilidad. Usualmente es un hallazgo incidental microscópico, donde se identifican estadios asexuales sanguíneos con o sin gametocitos, o bien los casos son detectados a través de encuestas parasitológicas en búsqueda activa de casos.

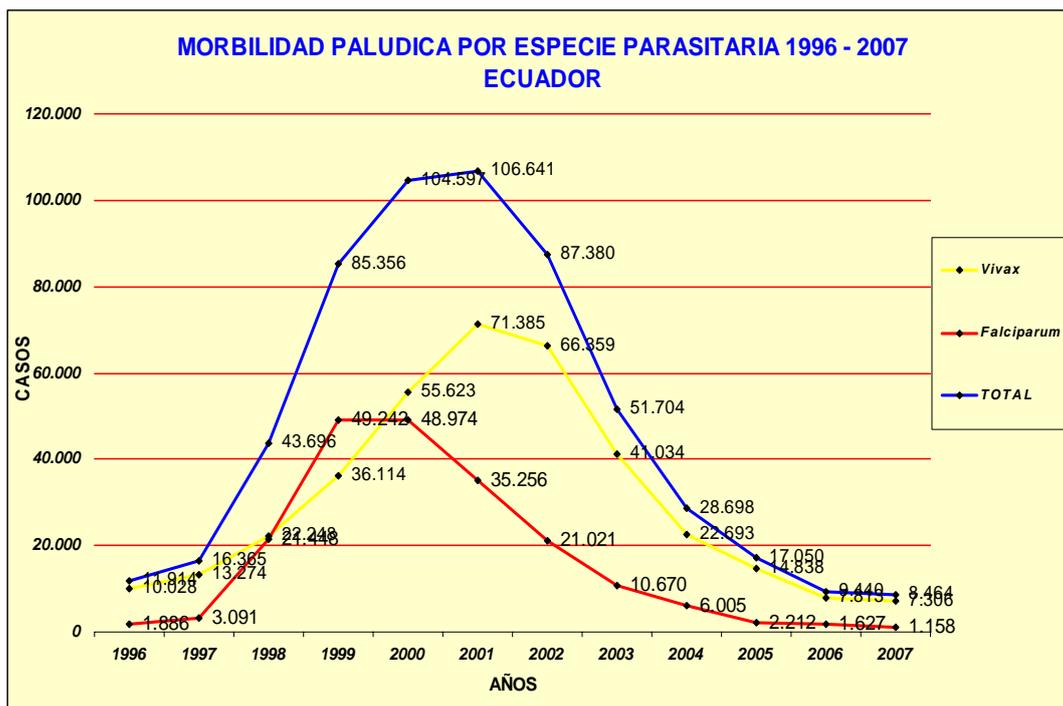
1.3.- Situación epidemiológica de la malaria en Ecuador:

Constituye un grave problema de salud pública, en los últimos cinco años, 2003 a 2007, la incidencia parasitaria anual de la malaria (IPA) se ha reducido de 6,7 a 1,2 x 1.000 habitantes, los casos de malaria por *P. falciparum* se han mantenido con algunas variaciones. Durante el año 1999, estos sobrepasaron al número de casos por *P. vivax*, situación no vista anteriormente, y predominaron en las provincias de Manabí, Esmeraldas, El Oro y Los Ríos.

DISTRIBUCION DE INCIDENCIA PARASITARA ANUAL (IPA) POR CANTON

AÑO 2007





En Ecuador la malaria no es registrada como una causa importante de mortalidad, pero se encuentra entre las primeras diez causas de morbilidad. A nivel nacional, la mayor oferta de diagnóstico está constituida por una red de aproximadamente 300 puestos de diagnóstico microscópico mantenida por el SNEM, y cuyo mayor porcentaje se ubican dentro de unidades de salud de la red del Ministerio de Salud Pública. Se ha documentado la existencia de casos subclínicos los que podrían estar contribuyendo a la persistencia de la transmisión. En cuanto al vector, las principales especies responsables de la transmisión son *Anopheles albimanus*, *An. punctimacula*, *An. Pseudopuntipennis*, *An. nuñeztovari* los que se ubican en la región litoral, valles subtropicales de la sierra y región amazónica, especies susceptibles a los insecticidas piretroides y organofosforados en uso en el país.

Se han registrado como factores coadyuvantes de la transmisión de la malaria en Ecuador: la ampliación de la frontera agrícola que modifica el entorno medio-ambiental, viviendas inadecuadas y desprotegidas, movimientos migratorios internos y fronterizos, factores operativos (difícil acceso a los servicios de salud, disminución y deficiente asistencia técnica a la red de colaboradores voluntarios), limitados recursos económicos asignados al sector salud, ocurrencia de fenómenos climáticos adversos cada vez más frecuentes e intensos “El Niño Oscilación Sur” (ENOS).

Las actividades de prevención y control de la malaria están enmarcadas en los lineamientos de la iniciativa “Lucha global contra la malaria” propuesta por OMS en el año 1992, y de la estrategia Roll Back malaria de 1999, así como de la adhesión a las metas del milenio propuestas por la ONU en el 2005, que incluyen

las áreas estratégicas de 1) vigilancia epidemiológica, 2) vigilancia entomológica, 3) investigación operativa y 4) promoción de la salud.

1.4.- Aspectos generales sobre el diagnóstico microscópico de la malaria:

El diagnóstico microscópico de la malaria puede realizarse a partir de dos tipos de muestras de sangre: 1) la gota gruesa que consiste de varias capas de células, y 2) el extendido fino que consiste de una sola capa de células. El examen microscópico de la gota gruesa es considerado el estándar de oro para el diagnóstico de la malaria porque es más sensible para la detección de parásitos. Ambos tipos de muestras, gota gruesa y frotis, se pueden preparar en una misma lámina portaobjetos o en láminas individuales. Se recomienda prepararlas en una misma lámina portaobjetos y colorearlas simultáneamente utilizando la coloración de Giemsa. Idealmente toda la Red de puestos de diagnóstico debería utilizar la preparación de gota gruesa y extendido fino en una sola lámina. Sin embargo, debido a dificultades técnicas y la necesidad de mayor tiempo de capacitación, la red de Colaboradores Voluntarios donde estuviere activa continuara tomando solo gota gruesa.

La identificación de los parásitos se basa en: 1) su apariencia, ya sea libres (gota gruesa) o intracelulares en el glóbulo rojo (extendido fino) y, más importante, 2) la coloración de sus componentes (citoplasma, cromatina, pigmento). El extendido fino facilita la determinación de la especie de *Plasmodium*, ya que proporciona un componente adicional a lo que aporta la gota gruesa: las características del glóbulo rojo parasitado y el parásito en su interior que mantiene intactos los componentes de cada fase y características específicas.

Además de la identificación de los parásitos, la microscopía puede proporcionar información sobre su viabilidad y esto, sumado a la estimación de la parasitemia, es útil para evaluar la respuesta al tratamiento. Debido a la relativa sencillez de la microscopía, es posible capacitar personal comunitario para la toma de muestras, su almacenamiento y transporte posterior, para su procesamiento y lectura por personal competente. La gota gruesa es de 20 a 30 veces más densa que el extendido fino y por lo tanto más sensible. El umbral teórico de detección de la gota gruesa es cuatro parásitos/ μl de sangre (100 campos/objetivo de inmersión es equivalente aproximadamente a 0.25 μl de sangre).

1.5.- Otros métodos de diagnóstico.

Adicionalmente al diagnóstico microscópico utilizando gota gruesa y extendido fino, se han desarrollado otras pruebas que apoyan el diagnóstico de la malaria ya sea aumentando la sensibilidad o aumentando la rapidez de la detección de los parásitos o de sus componentes. Otro método es el inmunodiagnóstico que incluye una variedad de pruebas serológicas entre cuyos principales usos podemos señalar el tamizaje de donadores de sangre, evaluación de tendencias epidemiológicas en áreas endémicas, y evaluación del impacto de los métodos de control del vector en la incidencia de la malaria. Las pruebas de diagnóstico rápido (PDR) basadas en la detección de antígenos específicos de *Plasmodium*, han demostrado su utilidad y aplicabilidad en el trabajo de campo. Otras pruebas como las basadas en la detección de ácido desoxirribonucleico (ADN) como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o sondas de hibridación de ADN marcadas con radionucleótidos o enzimas, solamente pueden ser utilizadas en laboratorios de referencia y laboratorios de investigación debido a sus requerimientos técnicos. A

continuación se describen las pruebas PCR y PDR utilizadas para el estudio de la malaria en varios países.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta técnica 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 anticoagulada, 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 con bromuro de etidio y pueden compararse con el tamaño de los fragmentos de un marcador de peso molecular estándar (Fig. No. 1). El costo de una prueba utilizando esta técnica se estima entre US \$2.00 - 3.00, esta prueba se puede utilizar en las situaciones que se describen a continuación:

1. **Detección de infecciones subclínicas:** En vista de la mayor sensibilidad de PCR en comparación con la gota gruesa, esta prueba es ideal para la detección de casos subclínicos con parasitemia baja no detectable por microscopía. En esta situación se utilizan marcadores moleculares que amplifiquen genes conservados, por ejemplo la sub-unidad ribosomal 18 (18Sr RNA) tanto para *P. vivax* como *P. falciparum*.
2. **Caracterización de la diversidad genética (polimorfismos) de *Plasmodium*:** Utilizando PCR para amplificar genes polimórficos (variables) de *Plasmodium* spp., es posible tipificar los parásitos y distinguirlos utilizando los productos amplificados como marcadores de la diversidad genética. Para *P. vivax* se cuentan, entre otros, con marcadores de los genes de la Proteína 1 de la Superficie del Merozoito (MSP1), de la Proteína del Circumsporozoito (CSP) y la Proteína del Gametocito (GAM1). Para *P. falciparum* se cuenta, entre otros, con marcadores del Bloque 2 de MSP1 que presenta tres variantes conocidas como MAD20, K1 y RO33 .
3. Identificación de genes asociados a la resistencia de *P. falciparum* a la cloroquina:

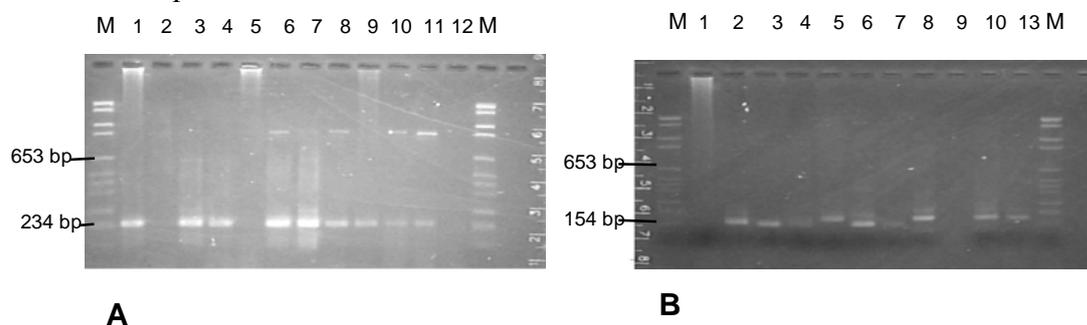


Figura No. 1. Electroforesis de gel de agarosa de productos de PCR de *Plasmodium falciparum* de pacientes residentes en el Municipio de Saba, Departamento de Colon-Honduras. Variantes K1 (A) y MAD20 (B) del Bloque 2 de la Proteína 1 de la Superficie del Merozoito (MSP1). M= marcador de peso molecular (BM molecular weight marker VI), 1= NCH 2, 2= NCH 8, 3= NCH14,

4= NCH 57, 5= NCH 69, 6= NCH 89, 7= NCH 114, 8= NCH 116, 9= NCH 130, 10= NCH 132, 11= muestra control positiva *P. falciparum* Haití, 12= control de reacción de PCR sin ADN, 13= muestra control positiva *P. falciparum* Indochina. Servicio de Parasitología, Departamento de Laboratorios Clínicos, Hospital Escuela.

Pruebas de diagnóstico rápido (PDR).

Las PDR detectan antígenos específicos (proteínas) producidos por el parásito, los cuales están presentes en la sangre de la persona infectada (infección actual o reciente). La muestra puede ser obtenida por pinchazo del dedo con lanceta o puede ser sangre venosa anticoagulada. Las PDR consisten en una detección inmunocromatográfica (reacción inmunológica detectada por cambio de color) de flujo lateral del antígeno, a través de la captura de anticuerpos marcados para producir una banda visible en una cinta de nitrocelulosa. El anticuerpo marcado primero se une al antígeno y luego el complejo antígeno-anticuerpo es capturado en la cinta por anticuerpos monoclonales adsorbidos en la misma, lo cual forma la banda visible. La cinta contiene un control que permite determinar la integridad del anticuerpo marcado. Algunas PDR pueden detectar solamente *P. falciparum*; otras pueden detectar una o más de las otras especies que infectan al humano (*P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*). El costo de una prueba se estima entre US \$0,80 – 3.00.

Las PDR pueden alcanzar sensibilidad superior al 95% en pacientes con densidades moderadas y altas; apoyan el diagnóstico de la malaria proporcionando evidencia de la presencia de parásitos en la sangre en situaciones donde el diagnóstico microscópico de buena calidad no está disponible o cuando un diagnóstico rápido permite iniciar un tratamiento diferenciado del paciente, ante la presencia de zonas donde circulen más de una especie de *Plasmodium*.

Podrían ser utilizados en áreas remotas o de difícil acceso donde los métodos tradicionales de detección no son los más adecuados o en situaciones como las descritas a continuación:

1. **Brote de febriles:** Cuando existe un brote de individuos con fiebre en una zona con riesgo de malaria, se debe investigar malaria como la causa de la fiebre. Las PDR se convierten en un instrumento ideal para la identificación rápida de la etiología malárica de la fiebre y contención del brote con medidas dirigidas a los individuos y al ambiente. Se recomienda utilizar una PDR que detecte tanto *P. falciparum* como *P. vivax*. En esta situación las PDR se utilizan en una búsqueda activa de casos febriles casa a casa con toma de muestra (PDR y gota gruesa / extendido fino) a todos los individuos febriles. En los casos PDR positiva, se debe obtener muestra de todos los individuos que habitan en esta casa con y sin fiebre.
2. **Evaluación de las intervenciones de prevención y control:** Las PDR pueden ser un instrumento útil cuando se desea evaluar el impacto de las intervenciones de prevención y control en localidades priorizadas en base a la intensidad de la transmisión (porcentaje acumulado de casos, IPA promedio ponderado de los últimos tres años, casos de malaria por *P. falciparum*) e intervenidas. En esta situación las PDR apoyan la detección de malaria en individuos febriles y en una muestra de individuos no febriles. Se recomienda utilizar una PDR que

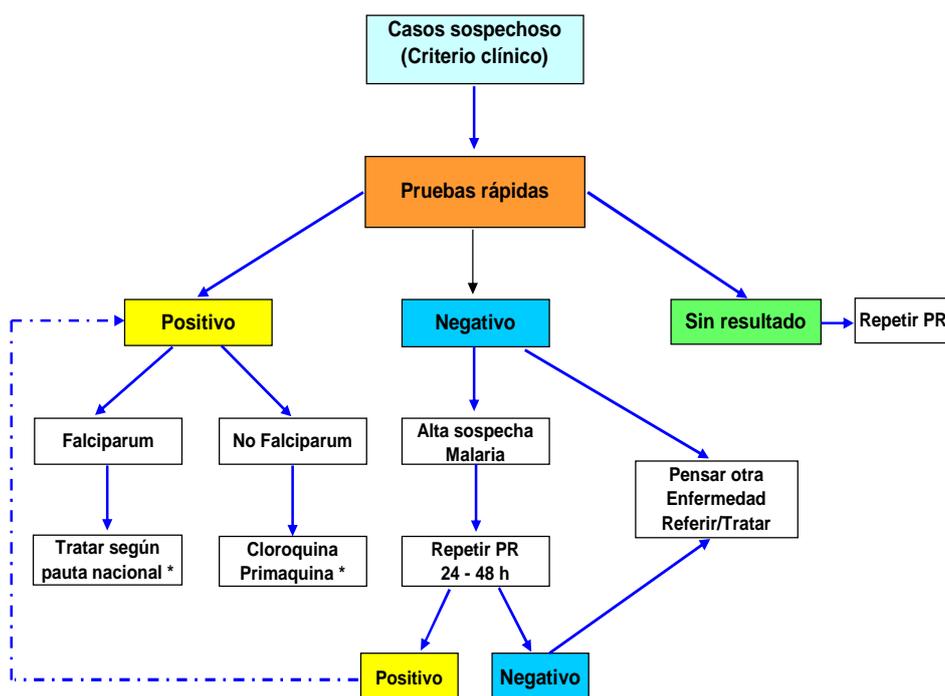
detecte tanto *P. falciparum* como *P. vivax*. Se realiza una búsqueda activa casa a casa con toma de muestra (PDR y gota gruesa / extendido fino) a todos los individuos febriles y cada cinco - diez casas a todos los individuos residentes, con y sin fiebre. En los casos PDR positiva, se debe obtener muestra de todos los individuos que habitan en esta casa con y sin fiebre.

3. **Vigilancia de la malaria por *P. falciparum*:** En localidades priorizadas por la incidencia de casos de malaria falciparum, o con un brote de este, se puede utilizar una PDR específica para fortalecer la vigilancia de la malaria por *P. falciparum* (Fig. No. 2). Las PDR pueden apoyar la instalación de un cerco epidemiológico oportuno que limite su expansión y reduzca la posibilidad de casos graves y muerte.



Figura No. 2. Prueba de Diagnóstico Rápido Optimal IT para *Malaria Pf* específica para detectar *P. falciparum*. Prueba positiva para *P. falciparum* (A); prueba positiva otra especie que no es *falciparum* (B); una prueba negativa (C). (Pruebas usadas en evaluación de campo Ecuador año 2006).

FLUJOGRAMA DE USO DE PRUEBAS RÁPIDAS EN ÁREAS EPIDEMIOLOGICAS CON CO-ENDEMICIDAD DE PLASMODIUM



1.6.- Malaria y tamizaje en Bancos de Sangre:

Aunque se ha informado de una variedad de agentes infecciosos que pueden ser transmitidos por transfusión sanguínea, a nivel global la malaria es una de las infecciones más frecuentemente transmitidas por esta vía. La malaria transfusional puede conllevar el desarrollo de complicaciones serias ya que el paciente que recibe la transfusión se encuentra debilitado. Además, la infección por *P. falciparum* puede ser rápidamente fatal. En países endémicos, el riesgo de malaria transfusional se constituye en un problema porque una proporción importante de los donadores pueden estar infectados, incluyendo aquellos con presentaciones subclínicas. Por otro lado, el simple rechazo de donadores puede significar un derroche de unidades de sangre altamente necesitadas y también puede erosionar la base de donadores. Por lo tanto, es necesario implementar una serie de acciones que permitan identificar la población de donadores con mayor riesgo de estar infectados. Se debería considerar en los posibles donadores la realización de: un interrogatorio más específico, considerando la época estacional (alta y baja transmisión) y distribución geográfica (zonas con mayor o menor riesgo). Las pruebas y técnicas que se han utilizado incluyen gota gruesa (observación de 300 campos microscópicos), detección de anticuerpos (inmunofluorescencia indirecta, ELISA), detección de antígenos (ELISA, pruebas rápidas) y detección de ADN (PCR). Además, de ensayar la administración de antimaláricos a los receptores de la transfusión, así como el tratamiento *in vitro* de las unidades recolectadas con antimaláricos. No importa cual sea la estrategia adoptada, siempre pueden ocurrir los casos de malaria transfusional, por lo que se debe considerar malaria en cualquier paciente que presente fiebre después de una transfusión.

CAPITULO II. CALIDAD Y CALIDEZ DE ATENCIÓN AL USUARIO:

Objetivo Motivar al personal de salud a realizar sus labores diarias (trabajar) con calidad y a mejorar la relación trabajador – paciente - comunidad

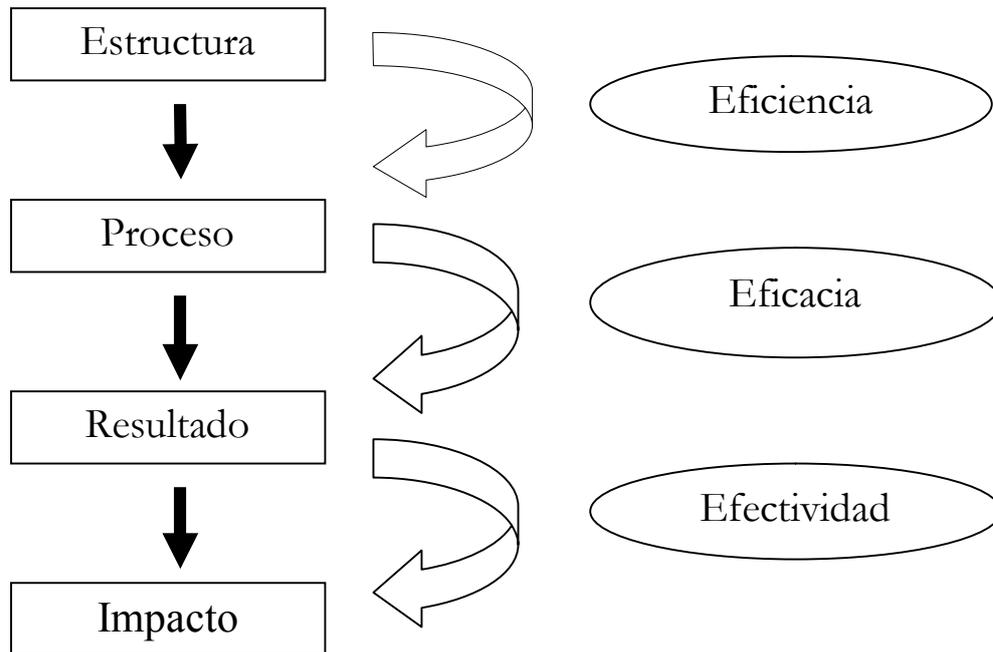
Calidad.- Es la ausencia de deficiencias de un bien o de un servicio prestado, que hace posible satisfacer las necesidades de los usuarios (internos y externos). El grado de calidad es, por consiguiente, la medida en que se espera que la atención suministrada logre el equilibrio más favorable de riesgos y beneficios.

Calidad en Salud:

“Es el mejor servicio al mejor costo y con el menor riesgo posible”

“Hacer lo correcto de la manera correcta”

2.1 Componentes indispensables de la calidad=



Calidez.- Es la demostración de afectividad, amabilidad, cortesía; brindar seguridad, confianza y respeto por parte del personal de salud a los usuarios de los servicios de salud.

Empatía.-

Es la capacidad de identificarse, sentir y comprender las emociones y/o sentimientos ajenos (el usuario) como propios.

Criterios de calidez:

- 1) La mirada.- Desde el momento que el paciente y/o familiar se acerquen o lleguen a tu lugar de trabajo, debe de preferencia mirar a los ojos con atención, transmitiendo confianza, respeto y disponibilidad.
- 2) Expresión.- Haga que a través de sus gestos de amabilidad, el paciente se sienta bien y que, lo que le quiere comunicar, le va a beneficiar, sonría, muéstrase dispuesto y abierto hacía los demás.
- 3) Contacto físico.- Para generar cercanía y confianza con el paciente siéntese uno al lado del otro o ubíquese de pie muy cercano en especial al momento de tomar la muestra y verá como la persona, puede presentarle con más facilidad su caso; y permitirá que se realice la toma de la muestra.
- 4) Relación instrumental.- Siempre es bueno familiarizar al paciente con los materiales que se van a utilizar en el momento de tomar la muestra.

2.2 El entorno de las personas (usuarios) y usted:

Muchas personas al llegar a los centros médicos pueden traer consigo miedos frente al personal, los uniformes y sus propias enfermedades, esto implica que si además, encuentran un ambiente adverso y hostil, pueden desistir de su consulta y esto afecta el

diagnóstico parasitológico, y el tratamiento adecuado de la malaria. Para evitar esta situación la persona deberá encontrar un ambiente amable y acogedor, donde pueda esperar con tranquilidad y donde el personal le brinde la confianza suficiente para hablar sobre lo que le sucede y lo que siente.

Sí está ocupado, dígame al paciente con la mano, que lo espere, que ya lo atiende, combinando con amabilidad, respeto y cuidado.

La identificación y el compromiso con el trabajo se demuestra en como se lleva el uniforme, el cuidado y el respeto por las insignias que representan la institución donde se trabaja, también es un aspecto fundamental, por ello, es importante que el uniforme sea impecable y bien llevado; y al mismo tiempo es necesario ser muy meticuloso con el cuidado personal, haciendo respetar los ideales y las insignias que se representan, teniendo presente que los centros de salud siempre son territorios de paz. Esto permite que la comunidad, tenga como referente de ayuda y de apoyo al personal de salud, lo que a su vez, hace más fácil su identificación en el momento de realizar las jornadas de prevención, atención, diagnóstico y tratamiento de la malaria en dicha comunidad.

Actúe con naturalidad, es importante que su tono de voz sea adecuado ni muy fuerte ni muy suave, pero que denote que está seguro del procedimiento que realiza con el paciente, permita que el se sienta cómodo a través del saludo de bienvenida al examen, muéstrase interesado con sus palabras, esto le dará la oportunidad de romper el hielo.

Luego de un corto, pero acogedor saludo de bienvenida, pregúntele a la persona: Si lo atendieron bien o tuvo que esperar mucho, discúlpese si fue así, además puede indagar sobre ¿Cuánto tiempo tardó en llegar aquí?, ¿Cómo se siente?, entre otras, sin dejar de lado los interrogantes propios para el diagnóstico de la malaria.

2.3 Cómo romper el hielo o llegar a las personas con más facilidad?

Para llegar a las personas con mayor facilidad es necesario, tener presente el tipo de población con la cuál se vaya a trabajar, la edad, el nivel educativo de la misma, su estrato socioeconómico y sus necesidades, expectativas e intereses.

Se puede iniciar la conversación haciendo un halago sobre la apariencia física de la persona, o expresar el propio gusto sobre comidas, actividades e invitar a la persona que haga lo mismo. Lo descrito le permite comprender si la persona está ansiosa, nerviosa o angustiada y si es así, busque tranquilizarla con una sonrisa, gesto o mímica que le dé confianza, esto es fundamental para propiciar la comunicación verbal. No se debe prolongar mucho el momento de bienvenida, pues lo fundamental es recoger la información para saber como se está presentando la enfermedad en la región.

La comunicación hablada es necesaria para el diagnóstico y control de la malaria, ya que proporciona un conocimiento de los antecedentes de las personas, que permiten determinar si continúan en riesgo de contagio de esta enfermedad. Para comunicarse verbalmente se puede realizar una entrevista informal, que consiste en un diálogo a través del cual se pueden conocer datos básicos sobre el riesgo de la transmisión de la malaria en el lugar donde se encuentra el paciente.

Entre las preguntas que se pueden formular están: ¿De dónde viene?, ¿Cuál es el motivo de la consulta?, ¿Qué siente?, ¿Desde cuándo se siente mal?, ¿Hay otras personas de su familia con lo mismo que tiene usted? Etc.

2.4 Estrategias a considerar para trabajar con calidez:

- Tener en cuenta las características del usuario y su entorno. No sentirse el experto
- Establecer una buena relación entre trabajador de salud y usuario

- Escuchar con atención al usuario.
- Disminuir el enfoque biomédico, enfatizando el aspecto social.
- Ponernos en el lugar del usuario.
- Promover el aprendizaje y esperar respuestas de ello con la mayor participación por parte del usuario en la toma de decisiones.

2.5 El Lugar de trabajo:

El puesto de malaria debe estar equipado para el diagnóstico parasitológico de la malaria, tiene que ser un espacio apropiado, con una buena iluminación y ventilación, que cumpla los requerimientos de bioseguridad, el lugar debe contar con un mesón y con un lavamanos, del mismo modo, tendrá que estar señalizado con carteles informativos; Todos los equipos deberán ser instalados adecuadamente e identificados de manera clara y precisa, lo mismo que las muestras que se toman a los pacientes. El área de trabajo tiene que mantenerse siempre limpia y ordenada, es necesario conocer las salidas de emergencia y la localización, la utilización de los extintores y equipos de emergencia. Es conveniente, además, apagar los instrumentos eléctricos antes de manipular las conexiones.

CAPITULO III: NORMAS DE BIOSEGURIDAD:

En la toma de muestra de los pacientes que solicitan diagnóstico de malaria, el personal de salud esta expuesto a factores de riesgo biológicos por la manipulación de sangre o elementos contaminados (lancetas, agujas, láminas). Un inadecuado empleo de las normas de bioseguridad conllevan a la posibilidad de adquirir enfermedades como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), Hepatitis u otras.

Las normas de bioseguridad se establecen dentro de un sistema de calidad de los laboratorios con el fin de brindar y proteger al usuario del servicio, al personal externo, al personal de salud y en general a la comunidad y medio ambiente, para tal fin se determinan conductas individuales del personal encargado de la toma de muestras, manejo de éstas, como también del manejo de desechos contaminados y del área de trabajo.

Precauciones Universales:

- Toda muestra de sangre debe ser tratada como potencialmente infecciosa independientemente de la fuente y hallazgos de laboratorio.
- Todo equipo para coloración y para manipulación de muestras sanguíneas es tratado como potencialmente infeccioso.

Normas:

3.1. Conducta Individual:

1. Toda persona debe lavarse las manos antes y después de manipular un paciente o material potencialmente infeccioso.

2. Evite el contacto de piel o mucosas con sangre o sus derivados, mediante el uso de guantes desechables. Los momentos en los cuales se estará en posible riesgo son: toma de la muestra a los pacientes, manejo de muestras o en superficies contaminadas con material biológico.
3. Si presenta lesiones de piel o mucosa, evitar el contacto directo con los pacientes o material potencialmente contaminante.
4. En el laboratorio es necesario usar mandiles, uniforme u otra vestimenta para protección apropiada.
5. No utilizar la boca para hacer uso de pipetas.
6. Esta prohibido ingerir alimentos en el laboratorio o guardarlos en el refrigerador de éste.
7. Si en algún procedimiento del laboratorio tiene riesgo de salpicadura use mascarilla.
8. Todo el personal dedicado a labores de manejo de residuos debe contar con un esquema de vacunación completo contra el Tétanos y Hepatitis B.
9. Esta prohibido maquillarse en el laboratorio.
10. De llegar a tener un accidente de laboratorio como la posible inoculación de material contaminado por la punción con un objeto corto punzante o lanceta usada y con sangre visible, debe informarlo inmediatamente al jefe inmediato, del departamento de salud ocupacional antes de 24 horas de ocurrido el evento, para proceder según normas. Por otra parte debe contar con seguimiento medico estricto, medidas profilácticas y evaluación serológica.
11. Además de la anterior medida en caso de exposición tenga presente el lavado del área expuesta.

a.- Exposición percutánea: lave inmediatamente el área expuesta con agua y jabón germicida, si la herida está sangrando, apriétela y estimule el sangrado, siempre que el área corporal lo tolere y aplique solución desinfectante después de concluido el lavado.

b.- Exposición de mucosas: lave profusamente el área con agua limpia o solución salina estéril.

c.- Exposición en piel no intacta: lave el área profusamente con solución salina estéril y aplique solución antiséptica.

d.- Exposición en piel intacta: lave abundantemente el área con agua y jabón.

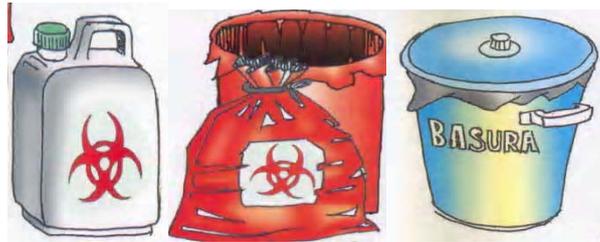
3.2 Manejo del paciente, desechos y sitio de trabajo:

Paciente:

1. Emplear técnicas de asepsia y antisepsia en la toma de la muestra.
2. Siempre usar lancetas y/o jeringuillas desechables y nuevas para la toma de la muestra de cada paciente.

Desechos:

1. Desechar el material contaminado (algodón, lancetas) en recipientes adecuados o fundas plásticas destinadas para este propósito, según norma internacional establecida: desechos comunes-fundas negra, desecho infeccioso funda roja; corto punzantes en recipiente específico.



- De presentarse la ruptura de material de vidrio contaminado con sangre o fluidos corporales, adicione hipoclorito de sodio al 0,5%, deje media hora, y recoja los fragmentos con escoba y recogedor para su disposición final.

Sitio de Trabajo:

- Se debe mantener el laboratorio limpio, aseado y ordenado.
- No se debe comer, beber, ni fumar en las Unidades de Diagnóstico
- Solo el personal autorizado debe tener acceso a las Unidades de Diagnostico
- Cada Unidad de Diagnóstico debe contar con un botiquín con insumos básicos para primeros auxilios.
- Se deben desinfectar las superficies de trabajo al concluir las operaciones y al final del día. Se recomienda una solución de cloro activo al 0.5%, la cual debe estar protegida de la luz y el calor. La solución de cloro se puede preparar utilizando un blanqueador líquido doméstico (hipoclorito de sodio), o compuestos de cloro disponibles en polvo (hipoclorito de calcio, cloramina, o cloruro de cal) o en tabletas (dicloroisocianurato de sodio). A continuación se describe la preparación de una solución de cloro diluida al 0.5%.

Blanqueador líquido. El cloro líquido doméstico tiene diferentes concentraciones y cualquiera de ellas se puede utilizar haciendo el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\% \text{ de cloro en el blanqueador líquido}}{\% \text{ de cloro deseado}} - 1 = \frac{\text{partes totales de agua para cada parte de blanqueador}}{1}$$

Ejemplo: para preparar una solución al 0.5% con 3.5% de blanqueador:

$$\frac{3.5\%}{0.5\%} - 1 = 7 - 1 = 6 \text{ partes totales de agua para cada parte de blanqueador}$$

Por lo tanto, se debe agregar 1 parte de blanqueador a 6 partes de agua para preparar una Sol. cloro al 0.5%. “Parte” se puede usar para cualquier unidad de medida (onza, litro, galón o cualquier recipiente). Algunos productos presentan el cloro activo como “grados cloro”. Un grado de cloro equivale a 0.3% de cloro activo.

Blanqueador en polvo. Si se usa cloro en polvo, calcule la relación cloro-agua, haciendo el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\% \text{ de cloro deseado}}{\% \text{ de cloro en el blanqueador en polvo}} \times 1,000 = \text{número de gramos de polvo por cada litro de agua}$$

Ejemplo: para preparar una solución al 0.5% de polvo de hipoclorito de calcio con 35% de cloro activo:

$$\frac{0.5\%}{35\%} \times 1,000 = 0.0143 \times 1,000 = 14.3$$

Por lo tanto, se debe disolver 14.3 gramos de polvo de cloro en cada litro del agua usada para preparar una solución de cloro al 0.5%, cuando se usa cloro en polvo, es probable que la solución de cloro resultante sea turbia (lechosa)

Blanqueador en tabletas. Siga las instrucciones del fabricante, puesto que el porcentaje de cloro activo en estos productos varía.

CAPITULO IV: PREPARACION DE LAS MUESTRAS Y COLORACION:

4.1 Obtención y manejo de las muestras:

La mejor muestra para la preparación de la gota gruesa es sangre periférica obtenida por punción con lanceta en el dedo índice de un adulto y/o sangre venosa recién tomada. Se recomienda tomar la muestra por pinchazo del dedo índice y en niños menores de 3 años por pinchazo del lóbulo de la oreja o talón del pie. También es posible utilizar sangre anticoagulada. En este caso la muestra se debe dejar secar por más tiempo (10 minutos adicionales) o intensificar el proceso de secado con calor moderado, aproximadamente 60° C. Para evitar el lavado de la muestra durante el proceso de coloración.

4.2 Listado de insumos, material de vidrio, reactivos, soluciones y equipo requerido para el proceso:

4.2.1 Insumos

- Algodón
- Bloque de madera o plástico con hendidura para secar las laminas
- Caja Porta láminas (100 c/u)
- Contador manual de células
- Cinta medidoras de pH (incluyendo rango 6.0 – 8.0)
- Formularios de registro de información
- Guantes
- Lancetas estériles descartables
- Lápiz carbón
- Recipiente o bandeja cóncava para colorear
- Marcadores indelebles
- Patrón de cartón para gota gruesa
- Portaobjetos
- Reloj marcador de tiempo
- Gotero de 5ml.

4.2.2 Material de vidrio

- Beaker
- Embudo (diámetro de 10 cm)
- Frascos goteros color ámbar (50 mL)
- Frascos boca ancha transparente y color ámbar (500 mL)
- Láminas portaobjetos de vidrio limpias y libres de grasa
- Mortero (diámetro interno de al menos 10 cm)
- Perlas de vidrio*
- Probetas graduadas (50 y 100 mL)
- Termómetro (que mida al menos 100°C)

4.2.3 Reactivos y soluciones

- Aceite de inmersión
- Agua destilada
- Alcohol 70%
- Alcohol metílico absoluto (libre de acetona)
- Giemsa en polvo *
- Glicerina *
- Soluciones desinfectantes
- Soluciones amortiguadoras

4.2.4 Equipo

- Balanza *
- Microscopio binocular con objetivos de inmersión

* (Para ser utilizados en la preparación de Giemsa)

4.3 Procesamiento y coloración de la gota gruesa y frotis:

Preparación de la gota gruesa (ver Figs. No. 3 y No. 4)

1. Tener todos los materiales listos. Es importante que las láminas portaobjetos se encuentren limpias y libres de grasa que pueda interferir con la adhesión de la sangre a la superficie o con el deslizamiento de la misma en el caso del extendido.
2. Frotar enérgicamente la yema del dedo del paciente (se prefiere el dedo índice de la mano izquierda, talón en caso de niños menores de 1 año ó lóbulo de la oreja) con algodón humedecido con alcohol al 70%. Secar con algodón seco. El dedo se sostiene enérgicamente (importante en caso de niños) y se pincha en forma rápida (Fig. No. 4.2). La primera gota de sangre se seca con el algodón seco.
3. Se utilizan dos láminas portaobjetos. En la unión del primero y segundo tercio la lámina se deposita la segunda gota (gota gruesa) de sangre que se obtiene por presión leve en el dedo (Fig. No. 4.3). Sobre la superficie de trabajo y usando la esquina de la segunda lámina, se extiende la sangre de manera que forme un cuadrado o un círculo de grosor uniforme, con dimensiones de 1 x 1 cm² (Fig. No. 4.5).
4. En la mitad de la lámina, después de colocar la tercera gota de sangre, el borde de la segunda lámina se coloca en un ángulo de 45 grados y se mueve hacia atrás hasta que toca la gota de sangre y entonces se desliza hacia adelante para que la sangre se extienda. La gota de sangre debe ser pequeña de tal manera que sea totalmente extendida antes de llegar al final de la lámina donde se está

extendiendo. Este extremo del frotis debe tener el grosor de una sola capa de elementos figurados de la sangre (glóbulos rojos) con una dimensión de 3cm de largo x 2cm de ancho, (Fig. No. 3, Esquema 1).

- Dejar secar a temperatura ambiente, si es necesario se podrá usar aire o calor moderado no directo sobre la muestra.
- Con un lápiz de carbón identificar la muestra en la cabeza del frotis, escribiendo el número correlativo de la muestra (Fig. 3, Esquema 1).
- Fijar el frotis con metanol, aplicando con un gotero tres gotas en la lámina inclinada o sumergir el frotis en un recipiente que contenga metanol por el lapso de 1 segundo.

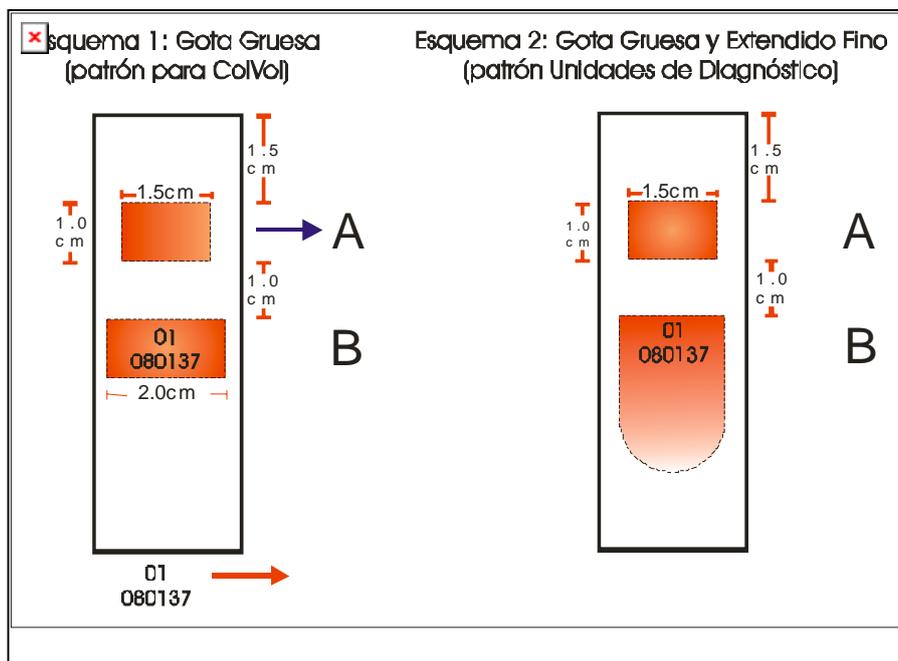




Figura No. 4 Proceso de preparación y toma de una muestra para gota gruesa

4. 4 Preparación de colorantes y soluciones

1) Solución de Giemsa (1000 mL)

Giemsa en polvo (certificado)	6 g
Glicerina pura	500 mL
Alcohol metílico absoluto (libre de acetona)	500 mL

*Mezclar la Giemsa en polvo poco a poco con la glicerina en un mortero. Recoger en un frasco resistente al calor (Erlenmeyer o Beaker) que contenga unas 50 perlas de vidrio y disolver a baño maría a una temperatura de 55 a 60° C por dos horas; agitar suavemente a intervalos de 30 minutos. Con una parte del alcohol metílico se lava los restos de reactivo que quedaron en el mortero y se recogen en un frasco ámbar que contenga perlas de vidrio y que pueda cerrarse herméticamente. Esperar que la mezcla del baño maría se enfríe para agregarle el resto del alcohol. Mezclar bien y agregarlo al frasco ámbar, continuar agitando. Almacenar durante al menos 2 semanas antes de usarlo. Mantenerse siempre bien cerrado y filtrar la solución antes de usarla (papel Whatman No. 1). Cuando se prepara una mayor cantidad, se recomienda fraccionar el colorante en varias botellas de 500 ml bien rotuladas y enumeradas. En el Cuadro No. 1 se señalan las proporciones para preparar diferente volumen del colorante. (*En laboratorio central)

Cuadro No. 1. Proporción de reactivos para la preparación de colorante Giemsa

Giemsa en polvo (gramos)	Metanol (mL)	Glicerina (mL)	Volumen total (mL)
0.6	50	50	100
6	500	500	1000
12	1000	1000	2000
24	2000	2000	4000

2) Soluciones amortiguadoras

Método para preparar el agua amortiguadora o tamponada:

Mezclar completamente en un mortero seco:

- Ortofosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4) 6 g
- Ortofosfato monopotásico (KH_2PO_4) 5 g

Se mezclan perfectamente dichas sales en las proporciones seleccionadas o en cualquier otra proporción que haya resultado satisfactoria, y se disuelve 1 g de la mezcla de las sales en 1 litro de agua destilada, agitar y ajustar a pH 7.2. Almacenar la mezcla en lotes de un gramo.

Método para preparar el azul de metileno fosfatado:

Mezclar completamente en un mortero seco:

- Cloruro de azul de metileno (medicinal) 1,0 g

- Ortofosfato disódico anhidro 3,0 g
- Ortofosfato monopotásico 1,0 g

Disolver un gramo de la mezcla en 300 ml de agua destilada.

Usar hasta que se observen precipitaciones, luego de lo cual debe ser filtrado o desechado.

4.5 TINCIONES PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA



Introducción: El diagnóstico de malaria se da en base al hallazgo de los parásitos en la sangre. La identificación de las especies puede hacerse observando el tamaño y la forma de los diferentes estadios del parásito y otras características de la célula hospedera. Para poder percibir diferencias en las células observadas es que se usan los diferentes métodos de tinción para diagnóstico.

Hay varias tinciones que se aplican para el diagnóstico del paludismo, desde las convencionales de Giemsa, Field y Leishman, hasta las fluorescentes con naranja de acridina o el sistema QBC.

La tinción más usada para el diagnóstico de malaria es la tinción Giemsa, la cual fue desarrollada muchos años atrás. En 1879 Ehrlich propone el uso de dos tintes neutrales para la diferenciación de células en los frotis de sangre periférica. En 1891 Romanowsky y Malakowsky desarrollan por separado un método en el cual usan Eosina y Azul de metileno “madurado” el cual ayudaba a mostrar el núcleo de los parásitos de la malaria. El termino “maduración” se refiere a una serie de reacciones de oxidación, por las cuales algunas mezclas de tintes pueden ser inestables tendiendo a formar precipitados rápidamente.

Así, a inicios de 1900 se empezó a usar el metanol como un solvente para el tinte precipitado, desarrollándose una técnica que utiliza las propiedades fijadoras de la solución metanólica previa a la tinción con la dilución acuosa de los tintes. En 1902 Giemsa mejoró estas técnicas usando métodos mas controlados de oxidación de los colorantes al medir las concentraciones adecuadas y al agregar glicerol al metanol para incrementar la solubilidad y estabilidad de los tintes.

En la actualidad los tintes están disponibles comercialmente como polvos o soluciones stock. Para almacén, la presentación en polvo es más estable. Respecto a las soluciones stock en un solvente de metanol/glicerol es más estable que otras que solo usan el metanol.

Diferentes marcas y presentaciones pueden producir variaciones en las tinciones, por lo que debe de medirse la calidad de tinción continuamente. Sin embargo hay puntos importantes para juzgar la calidad de la técnica de una buena tinción:

Deshemoglobinización – Tonalidad – Precipitado.

Deshemoglobinización: Este proceso tiende a disminuir la cantidad de sangre existente en la gota gruesa que va permitir visualizar mejor a los parásitos. El fondo de la muestra debe apreciarse libre de glóbulos rojos, a diferencia del frotis que no experimenta éste proceso debido a que previamente se fija con una solución metanólica.

Tonalidad: Se trata del punto más importante para juzgar la calidad de una tinción. Una muestra debe presentar una coloración óptima y nítida de los elementos de la sangre y de los parásitos.

Coloración del parásito:

Presenta un núcleo rojo y su citoplasma debe ser azul-cielo. El pigmento por poseer coloración propia no necesita de tinción y se presentan como granulaciones que varían del color amarillo al café oscuro. Las granulaciones del glóbulo rojo toman un color rosado. (Véase capítulo de las características diagnósticas de los parásitos Plasmodium)

Coloración de leucocitos:

En láminas negativas se debe de evaluar la coloración de los leucocitos los cuales deben presentar núcleo lila intenso, citoplasma según el tipo de célula. (Véase capítulo de las características diagnósticas de los parásitos Plasmodium)

Precipitado: En una buena coloración no debe existir precipitado. La presencia de precipitados puede confundirse con parásitos, para ello, la solución madre debe de filtrarse por lo menos una vez por semana.

Técnica de precoloración:

Definición: Tratamiento de la gota gruesa con azul de metileno fosfatado y se realiza antes de someter la lámina con la muestra al proceso de coloración con Giemsa.

Objetivo de la técnica: Obtener una mejor coloración y facilitar el diagnóstico.

Evita que las láminas que se demoran en el campo se contaminen con hongos. Conservando por mas tiempo la muestra hasta que se complete el proceso de coloración con Giemsa.

Materiales

- Azul de metileno
- Agua tamponada o solución amortiguadora
- Agua destilada
- Papel filtro No 4
- Envases oscuros para almacenar las soluciones
- Vasos para enjuagues
- Papel toalla (esponja)

Método para preparar el agua amortiguadora o tamponada:

Mezclar completamente en un mortero seco:

- Ortofosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4) 6 g
- Ortofosfato monopotásico (KH_2PO_4) 5 g

Se mezclan perfectamente dichas sales en las proporciones seleccionadas o en cualquier otra proporción que haya resultado satisfactoria, y se disuelve 1 g de la mezcla de las sales en 1 litro de agua destilada, agitar y ajustar a pH 7.2. Almacenar la mezcla en lotes de un gramo.

Método para preparar el azul de metileno fosfatado:

Mezclar completamente en un mortero seco:

- Cloruro de azul de metileno (medicinal) 1,0 g
- Ortofosfato disódico anhidro 3,0 g
- Ortofosfato monopotásico 1,0 g

Disolver un gramo de la mezcla en 300 ml de agua destilada.

Usar hasta que se observen precipitaciones, luego de lo cual debe ser filtrado o desechado.

Técnica de precoloración:

- En un vaso verter la solución de azul de metileno en cantidad suficiente para cubrir una lámina en posición vertical.
- Introducir la lámina en el vaso con la solución por tres segundos, sacarla inmediatamente y hacerla escurrir verticalmente sobre un papel absorbente (esponja).
- En un vaso que contenga agua tamponada, hacer el primer enjuague, introduciendo la lámina hasta que el agua cubra la gota por dos segundos. Sacarla inmediatamente después y hacerla escurrir nuevamente sobre el papel absorbente.
- En un segundo vaso que contenga agua tamponada, hacer el segundo enjuague, inmediatamente después hacerla escurrir, por tercera vez, en la esponja.

Tinción con el colorante Giemsa:

Definición: Tratamiento de la muestra (gota gruesa y frotis) con el colorante Giemsa y se realiza luego de la precoloración.

Objetivo de la técnica: Permite observar las características morfológicas de la célula hospedera, del parásito, y de los elementos figurados de la sangre.

Materiales

- Colorante Giemsa (Solución Stock)
- Agua tamponada o solución amortiguadora
- Agua destilada
- Probeta

- Varillas de vidrio o bandeja con depresión

Método para la preparación de la solución stock del colorante Giemsa para preparar 100 ml. de solución "madre"

- Colorante Giemsa en polvo, certificado 0,75 g
- Alcohol metílico puro (sin acetona) 65,00 ml.
- Glicerina pura 35,00 ml.

Mezclar el Giemsa en polvo con el alcohol metílico puro y la glicerina en un balón con perlas de vidrio y agitarlo en círculos fuertemente para conseguir una buena disolución del colorante.

Filtrar pequeñas cantidades y experimentar con muestras hemáticas. Si los elementos se colorean adecuadamente el colorante está listo para ser filtrado con papel filtro N° 4, luego almacenar en frascos de vidrio ámbar u oscuro. La solución madre de Giemsa, ya preparada, es comercializada por diferentes Laboratorios, en frascos de 100 y 500 ml.

Se utiliza en proporciones de 1 gota de la solución madre de Giemsa por cada ml de agua amortiguada (se puede reemplazar por agua de lluvia o agua hervida fría), y 2 ml por cada lámina a teñir.

Técnica de tinción:

Método de coloración en varilla:

- Fije sólo el frotis sumergiéndolo en metanol, por tres segundos y déjelo secar.
- Coloque las varillas de vidrio sobre un lavatorio o recipiente para la fácil eliminación de los líquidos que se usarán en la coloración.
- Coloque las láminas que debe colorear sobre las varillas, con la muestra de sangre hacia arriba, dejando un espacio entre ellas, de tal forma que pueda manipularlas con seguridad.
- Vierta suavemente el colorante diluido (previamente preparado) sobre las láminas con la muestra, cubriéndola por completo y deje actuar el colorante de 7 a 10 minutos.
- Descarte el sobrante de colorante preparado y lave la lámina, introduciéndola en un vaso que contenga solución amortiguada por 3 o 4 veces para eliminar los excesos de colorante de Giemsa.
- Deje secar las láminas en una gradilla de madera, de modo que queden inclinadas y con la gota gruesa hacia abajo.

Método de coloración en bandeja:

Este método de coloración se usa para colorear la gota gruesa y frotis de varias láminas a la vez en una bandeja especial de coloración hecha de material acrílico, la inversión de las láminas disminuye la probabilidad de precipitado del colorante.

- Fije sólo el frotis sumergiéndolo en metanol, por tres segundos y déjelo secar.

- Coloque las láminas con la sangre hacia la concavidad de 2 ó 3mm. de una bandeja esmaltada.
- Déjese deslizar solución acuosa de Giemsa (1 gota/ml de agua amortiguadora) recién preparada por debajo de los portaobjetos hasta que se llene la depresión. Elimínense todas las burbujas que puedan formarse debajo o cerca de la muestra de gota gruesa.
- Déjese que el colorante actúe durante 10 minutos. El tiempo de coloración puede variar de un lote a otro de colorante y para obtener resultados óptimos deben ser controlados estrictamente.
- Descarte el sobrante de colorante preparado y en un vaso que contenga solución amortiguadora, sumerja brevemente 3 o 4 veces el portaobjetos en para eliminar el exceso de colorante de Giemsa.
- Deje escurrir y seque mediante el calor suave.

Recomendaciones

- Las soluciones stock deben guardarse en envases de polietileno tapados, y permanecer en la oscuridad a 4°C para prolongar su vida media.
- El material de vidrio empleado en su preparación y almacén debe estar limpio, seco y sin residuos de detergente ya que estos pueden variar el pH del colorante.
- La solución de trabajo solo es estable por unas pocas horas y debe ser preparada siempre en pocos volúmenes ya que se debe usar fresca.
- Si se usa un tinte deteriorado o viejo es probable que haya pérdida de la coloración rojiza por la precipitación de la eosina.
- La tinción que mejor capacidad de diferenciación da, es la que se hace con un tinte diluido y por más tiempo de incubación.
- Nunca se debe añadir agua a la solución "madre" del colorante porque produce su completo deterioro.
- El frasco de almacenamiento no se debe nunca agitar antes de usar porque suspendería cristales que pudieran encontrarse en el fondo, perjudicando la coloración y dificultarían el examen bajo microscopio.
- Nunca regrese el colorante no utilizado a las botellas que contengan la solución "madre".
- Mantenga el envase (vidrio ámbar u oscuro) con la solución madre Giemsa, cerrado y en lugar seco, fresco y protegido de luz solar directa. Así evitará la volatilización del solvente y la oxidación del colorante prolongando la duración de la solución.

4.6 Coloración de la gota gruesa:

1. Solución de trabajo: 1 gota de sol. de Giemsa por cada mililitro de sol. Amortiguadora pH 7.0-7.2 ò 1 ml de solución de Giemsa en 20 ml de sol. Amortiguadora pH 7.0-7.2 para obtener una solución de trabajo de 20% o 1:20, para colorear unas 7 láminas portaobjetos (aprox. 3 mL/lámina)

No se debe colorear una gota gruesa con coloración de Wright porque éste colorante fija la muestra.

2. Colocar la lámina portaobjetos en un recipiente de coloración o con la muestra hacia la concavidad de la bandeja de tinción. En este caso, deslizar la solución

de trabajo recién preparada por debajo de la lámina hasta que se llene el espacio, eliminando las burbujas. Colorear durante 10 minutos.

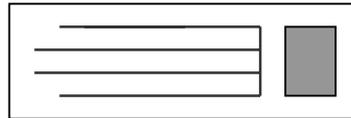
3. El exceso de colorante se lava sumergiendo con delicadeza la lámina portaobjetos en un recipiente con solución amortiguadora o agua corriente.
4. La muestra se puede secar con aire o calor moderado. Observar al microscopio con objetivo de 100X y aceite de inmersión.

4.7 Errores comunes en la preparación de las muestras

Al preparar la gota gruesa y el frotis se pueden cometer errores que pueden afectar la rotulación, la coloración o el examen microscópico de las muestras, y en algunos casos a más de una de estas operaciones. Los errores más comunes se describen a continuación.

Muestras mal colocados

Las muestras no deben colocarse cerca de los extremos de la lámina porque será difícil su examen microscópico. Además, alguna porción de la muestra puede rayarse y hasta desaparecer durante el proceso de coloración.



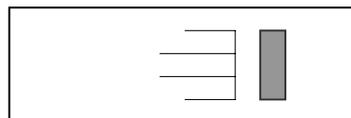
Exceso de sangre

El exceso de sangre puede producir un fondo demasiado azul y exceso de leucocitos que dificultan la observación microscópica en la gota gruesa. En el frotis, provocará que los glóbulos rojos queden traslapados y también dificultará la observación microscópica.



Muy poca sangre

Si la gota gruesa se prepara con muy poca sangre no proporcionará un resultado confiable. Si el frotis, no podrá utilizarse para rotular la muestra.



Muestras preparadas en una lámina portaobjetos sucia

La preparación de muestras sobre láminas grasientas produce un patrón irregular en el frotis y provocará lavado de la gota gruesa en el proceso de coloración.

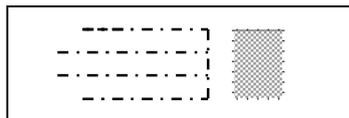


Lámina portaobjetos extensora con borde astillado

Si el borde de la lámina extensora está astillado, el frotis no se extiende de manera uniforme produciendo muchas colas. La gota gruesa también puede resultar irregular.



Otros errores

- Muestras preparadas sobre láminas muy opacas, rayadas o superficie iridiscente.
- Gota gruesa de forma irregular con zonas más gruesas formadas durante el proceso de secado.
- La autofijación de la gota gruesa por exposición a calor o transcurso de demasiados días entre su preparación y coloración, lo que dificulta la observación.
- Láminas envueltas en el formulario antes de que la muestra esté lo suficientemente seca lo que permite que la muestra se pegue en el papel.
- Láminas no coloreadas y descubiertas pueden ser dañadas por insectos (moscas, hormigas, cucarachas, otros).

4.8 Transporte y envío de muestras desde el Puesto de Colaboración Voluntaria

Se debe esperar que las muestras se sequen completamente antes de rotularlas y proceder a envolverlas en su respectivo formulario OC-19. Las muestras se deben guardar en el botiquín o lugar designado en el Puesto de Colaboración Voluntaria hasta que sean transportadas a la unidad de diagnóstico correspondiente. Se debe evitar que durante el transporte las muestras sean expuestas a temperaturas extremas o golpes.

CAPITULO V: CARACTERISTICAS DIAGNOSTICAS DE LOS PARASITOS PLASMODIUM:

En la gota gruesa el fondo debe aparecer limpio, exento de residuos y los parásitos deben encontrarse en forma libre. Los núcleos de los leucocitos o glóbulos blancos deben aparecer teñidos de un color púrpura oscuro intenso y los parásitos deben verse con la cromatina de color rojo oscuro y el citoplasma azul purpúreo pálido. En el frotis, se observan los leucocitos completos (núcleo y citoplasma) y los parásitos se encuentran intracelulares en los glóbulos rojos o eritrocitos (ver Fig. No. 5). El pigmento malárico se observa del color amarillo al café oscuro o negro.

5.1 Elementos formes de la sangre

Es necesario reconocer las diferentes células y componentes encontrados en la sangre. Su apariencia difiere levemente en la gota gruesa y el frotis.

5.1.1 Elementos formes de la sangre en la gota gruesa

Cuando la gota gruesa se examina con un objetivo 100X de inmersión, se observa lo siguiente:

- Restos de glóbulos rojos
- Leucocitos o glóbulos blancos
- Plaquetas o trombocitos

El proceso de deshemoglobinización ocurre mientras la gota gruesa se colorea con el colorante Giemsa produciendo que el contenido de los glóbulos rojos sea disuelto dejando solamente restos de su estructura. Los leucocitos y las plaquetas tienen una apariencia similar a la que muestran en el frotis. En general, los leucocitos se observan más pequeños, con el citoplasma más compacto alrededor del núcleo, porque no han sido extendidos en una sola capa sobre la lámina.

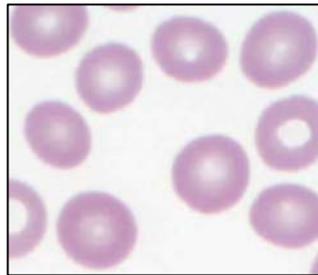
5.1.2 Elementos formes de la sangre en el frotis

Cuando el frotis se examina con un objetivo 100X de inmersión, se observa lo siguiente:

- Glóbulos rojos
- Leucocitos o glóbulos blancos
- Plaquetas

5.1.3 Glóbulos rojos

Los glóbulos rojos tienen una forma de disco bicóncavo. Es la célula más común que se encuentra en el extendido fino. Hay cerca de 5'000.000 de glóbulos rojos por cada microlitro de sangre. Con una buena coloración de Giemsa, los glóbulos rojos, que miden aproximadamente 7.5 μm de diámetro y no tienen núcleo, se colorean rosa-grisáceo pálido. Sin embargo, algunas células inmaduras pueden contener material que se colorea diferente y parecen más grandes que los glóbulos rojos normales. Estos se denominan reticulocitos o glóbulos rojos jóvenes.



Eritrocito

5.1.4 Leucocitos

El número total de leucocitos por microlitro de sangre oscila entre 6,000 y 8,000 células. Existen diferentes tipos de leucocitos los cuales se colorean de manera diferenciada. En el frotis se les puede reconocer el núcleo, el citoplasma y la membrana celular. Cada leucocito contiene un núcleo rodeado por citoplasma, algunos tienen núcleo multilobulado y algunas veces el citoplasma es de apariencia granular. Los leucocitos pueden dividirse en dos grupos.

5.1.4.1 Leucocitos granulocitos o polimorfonucleares.

5.1.4.1.1 Neutrófilos: Corresponden hasta el 60-65% del total de los leucocitos de una persona sana. Tienen gránulos bien definidos en el citoplasma que se colorea generalmente de rosado y su núcleo se colorea púrpura intenso. En algunos casos de malaria se pueden observar neutrófilos conteniendo pigmento malárico, como un producto final de la fagocitosis de los parásitos.

5.1.4.1.2 Eosinófilos: Corresponden a 1-4% del total de leucocitos de una persona sana. La apariencia granular del citoplasma es bien característica, con gránulos gruesos de color rojo cobrizo, y el núcleo se colorea púrpura.

5.1.4.1.3 Basófilos: Son poco frecuentes, usualmente corresponden a menos del 1% del total de leucocitos de una persona sana. Sus gránulos son grandes y de color azul o morado pálido, el núcleo presenta una coloración azul oscura.

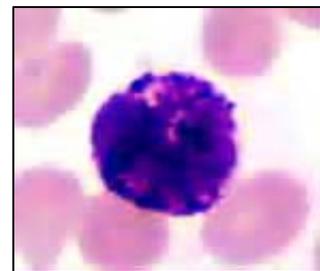
LEUCOCITOS GRANULOCITOS - POLIMORFONUCLEARES



Neutròfilo



Eosinofilo



Basofilo

5.1.4.2 Leucocitos agranulocitos o mononucleares.

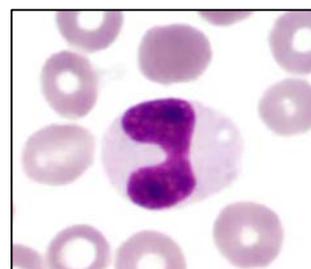
5.1.4.2.1 Monocitos: Son los leucocitos de mayor tamaño, tienen un diámetro de 12-18 μm . Tiene un núcleo grande coloreado del azul al violeta, con forma de riñón o frijol y el citoplasma se colorea azul cielo y puede contener poca cantidad de gránulos. Corresponden a 2-10% del total de leucocitos de una persona sana. También pueden fagocitar parásitos.

5.1.4.2.2 Linfocitos: Los dos tipos de linfocitos, grandes y pequeños, corresponden a 20-45% del total de leucocitos de una persona sana. El núcleo del linfocito grande es redondo y de color morado intenso; el citoplasma se colorea azul celeste y puede presentar algunos gránulos morado claro. El linfocito pequeño es escasamente más grande que un glóbulo rojo, tiene poco citoplasma color azul cielo y su núcleo se colorea azul oscuro.

LEUCOCITOS AGRANULOCITOS – MONONUCLEARE



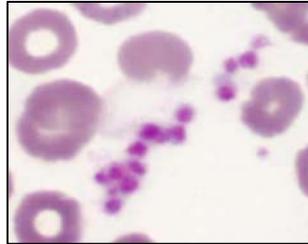
Monocito



Linfocito

5.1.5 Plaquetas

Son pequeños cuerpos de forma irregular que se colorean de rosado intenso y no poseen núcleo. Se estiman unas 150.000 a 400.000 plaquetas por microlitro de sangre. Con frecuencia aparecen en grupos de 5-10 pero puede agruparse un número mayor si el frotis no está bien hecho. Es importante identificarlas porque microscopistas sin experiencia pueden confundirlas con parásitos.



Plaquetas

5.2 Características morfológicas de *Plasmodium* spp.

La morfología de los glóbulos rojos se ve alterada por la presencia del parásito tanto en el frotis y en la gota gruesa; lo mismo sucede con la morfología de los parásitos, cuya forma puede ser alterada por el proceso de elaboración de la lámina.

Los parásitos *Plasmodium* se colorean con Giemsa (gota gruesa y frotis). En su desarrollo, el parásito pasa por una serie de estadios. Es posible distinguir diferentes componentes del parásito en la célula hospedera ya que en todos los estadios, las mismas partes del parásito se colorean de la misma forma (Fig. No. 5):

- Cromatina (núcleo del parásito): usualmente redonda y se colorea de rojo intenso.
- Citoplasma: demuestra una serie de formas, desde la forma de anillo hasta una forma totalmente irregular. Siempre se colorea de azul, aunque la intensidad del color azul puede variar entre diferentes especies de parásito.

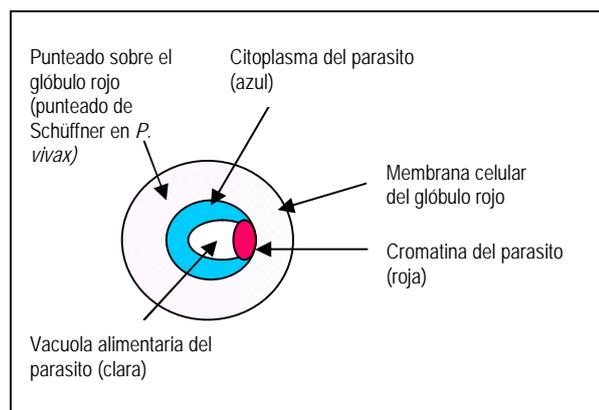


Figura No. 5. Parásito *Plasmodium* intracelular en el glóbulo rojo demostrando sus diferentes componentes.

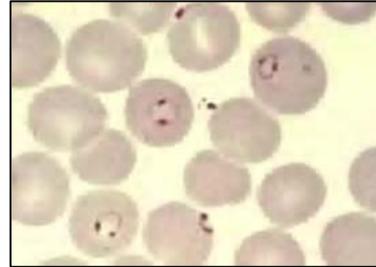
5.2.1 Estadíos del parásito

5.2.1.1 Etapa de trofozoito joven

Ésta etapa es la que se observa con mayor frecuencia en todas las especies. Pueden tomar la forma de coma o anillo aunque a veces puede tener la forma de un anillo incompleto como en el caso de *Plasmodium falcíparum*, o formas ameboideas en el caso de *Plasmodium vivax*.



Trofozoitos de *P. falcíparum* en gota gruesa



Trofozoitos de *P. falcíparum* en frotis

5.2.1.2 Etapa de trofozoito mediano y adulto

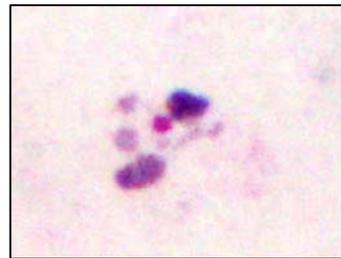
El trofozoito es una etapa del desarrollo del parásito dentro del glóbulo rojo, puede variar en tamaño desde pequeño a grande. Desde el estadio de trofozoito, ya es posible visualizar el pigmento malárico (producto del parásito, luego de metabolizar la hemoglobina del glóbulo rojo) el cual aumenta a medida que el parásito crece. Este pigmento no se colorea porque posee un color propio, que puede variar de amarillo pálido hasta café oscuro o negro, según la especie y el estadio del parásito *Plasmodium*.

El trofozoito mediano se caracteriza porque morfológicamente es grande, de citoplasma fragmentado y con presencia de vacuola, pudiendo ser la cromatina o núcleo del parásito de posición central o excéntrica.

El trofozoito adulto es de menor tamaño, de citoplasma compacto, la cromatina se ubica por lo general excéntricamente y es más pequeña que la de los gametocitos.



Trofozoito de *P. vivax* en frotis



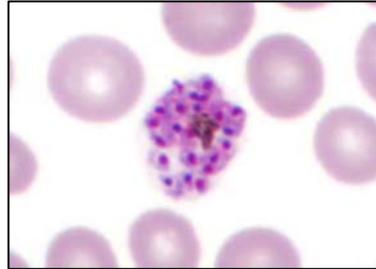
Trofozoito de *P. vivax* en gota gruesa

5.2.1.3 Etapa de esquizonte

En este estadio, el parásito comienza a reproducirse. A esta reproducción se le denomina asexual porque el parásito no es hembra ni macho pero se reproduce por simple división celular. Hay varias fases en éste estadio: desde parásitos con dos

fragmentos de cromatina hasta aquellos con muchos puntos de cromatina y citoplasma definido. Al proceso de formación de esquizontes, en la sangre (esquizonte sanguíneo) y en el hígado (esquizonte tisular), se le denomina esquizogonia.

Cuando éste estadio está presente en un paciente con nivel de hemoglobina normal, el número de núcleos observados son de utilidad para determinar la especie.

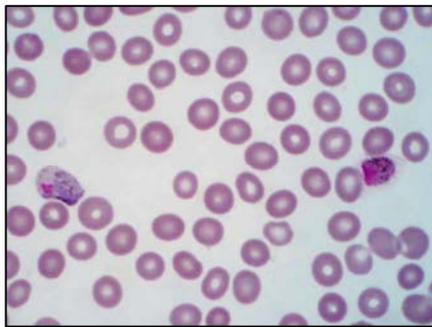


Esquizonte de *P. vivax* en frotis

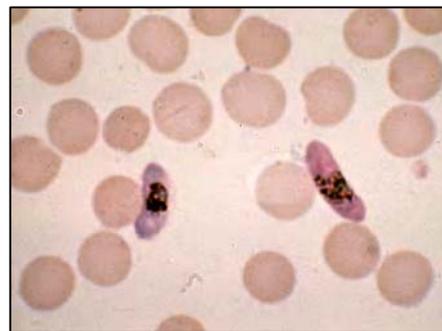
5.2.1.4 Etapa de gametocito

Es el estadio sexual en el cual el parásito se convierte en hembra o macho preparándose para la siguiente fase que ocurre en el estómago del mosquito hembra del género *Anopheles*, proceso denominado gametogonia. Los gametocitos pueden tener forma redonda o forma de banano o media luna, dependiendo de la especie. La forma en que el parásito se colorea, permite identificar si es un gametocito hembra (macrogametocito) o macho (microgametocito).

En malaria por *P. falciparum* se pueden ver en sangre periférica gametocitos y anillos a diferencia de malaria por *P. vivax* y *P. malariae* en los que se visualiza todos los estadios parasitarios.



Micro y macro gametocitos de *P. vivax*



Macro y micro gametocito de *P. falciparum*

5.2.2 Especies de *Plasmodium*:

Para identificar las cuatro especies de *Plasmodium* que parasitan a los seres humanos (*P. falciparum*, *vivax*, *malariae* y *ovale*), se deben reconocer sus características morfológicas en sus diferentes estadios de desarrollo (gota gruesa y frotis) y su efecto sobre los glóbulos rojos parasitados (frotis).

Ciclo biológico o ciclo de vida del parásito;

El *Plasmodium* requiere de dos huéspedes para completar su ciclo de vida:

- Huésped definitivo: El mosquito anofeles o vector: Ciclo esporogónico o sexuado
- Huésped intermediario: El ser humano: Ciclo esquizogónico o asexuado.

Ciclo sexuado o ESPOROGONICO (En el Mosquito):

Cuando hembras de Anopheles pican y succionan sangre de personas enfermas o infectadas, ingresan a su tubo digestivo (estómago) todas las formas evolutivas sanguíneas del parásito, pero solamente los gametocitos hembra y macho, una vez liberados de los eritrocitos en los que se encontraban, tienen la capacidad de continuar su evolución.

El gametocito hembra en esta fase toma el nombre de macrogametocito, experimenta un cierto grado de maduración, al cabo del cual se denomina macrogameto y exponen en un sector externo de su membrana celular receptores específicos para gametos del sexo opuesto. Quedan así constituidos los macrogametos (gametos femeninos). Por otra parte, y al mismo tiempo, el gametocito macho o microgametocito, mediante un complejo proceso denominado exflagelación, dan origen a 6 u 8 microgametos, con morfología semejante a un largo flagelo, que se desprenden del cuerpo del microgametocito.

Antes de transcurridos 30 minutos desde la ingesta de sangre por el mosquito un microgameto localiza un macrogameto y lo fecunda. Cuando los núcleos de los dos elementos sexuales se fusionan, se forma un huevo fertilizado o cigoto. En las siguientes 24 horas, el cigoto adquiere una forma alargada, como un pequeño gusano, que tiene capacidad para desplazarse o moverse (ooquineto o huevo móvil).

Cuando éste toma contacto con la pared del estómago del mosquito, penetra entre las células epiteliales sin sobrepasar la membrana basal de la pared estomacal, donde toma una forma redondeada llamado Ooquiste inmaduro. En los días siguientes el ooquiste crece y divide repetidas veces su núcleo. Finalmente, a partir de cada núcleo se diferencia un esporozoito que son elementos nucleados y alargados. Hay miles de ellos en un ooquiste maduro, aquí toma el nombre de esporoquiste.

Cuando está totalmente lleno el esporoquiste se rompe y los miles de esporozoitos atraviesan la pared intestinal para luego llegar a las glándulas salivales, donde se almacenan; proceso que se denomina esporulación; es así como el anofelino hembra queda con la capacidad de infectar y producir la enfermedad cuando pique a los seres humanos.

El tiempo que demanda el ciclo esporogónico varía con la temperatura, la humedad relativa del aire y los factores que influyen sobre ellos. Las condiciones óptimas son 20 a 30 °C y 60% o más de humedad relativa. En estas condiciones, el ciclo se completa en una o dos semanas, pero puede demandar más tiempo en condiciones no favorables.

Ciclo asexual o ESQUIZOGONICO (En el Hombre):

Este ciclo se realiza en el Hombre y empieza cuando los esporozoitos son inoculados por el mosquito al alimentarse de la sangre de una persona sana. Se subdivide en dos fases: a) Fase Hepática o exoeritrocítica y b) Fase hemática o eritrocítica.

a) Fase Hepática, pre-eritrocítica o exo-eritrocítica:

Los esporozoitos transportados por la circulación sanguínea llegan al hígado en aproximadamente 30 minutos donde penetran en las células hepáticas. Aquí los esporozoitos inician un Ciclo Hepático llamado preeritrocítico, ciclo exoeritrocítico, o ciclo tisular, que demora aproximadamente de 6 a 14 días según la especie del *Plasmodium* y la respuesta inmune del huésped.

Los esporozoitos ingresados en los hepatocitos inician un proceso de crecimiento (trofozoitos exoeritrocíticos), que una vez completado, inician una reproducción o multiplicación asexual que les permite generar una gran cantidad de merozoítos exoeritrocíticos o merozoítos tisulares que hacen aumentar de tamaño a los hepatocitos, hasta que estos estallan y los merozoítos tisulares que salen invaden la sangre circulante para efectuar la siguiente fase del ciclo evolutivo.

b) Fase hemática o eritrocítica:

Los merozoitos tisulares que han llegado a la sangre rápidamente se introducen en los eritrocitos donde adquieren forma esférica. Este estadio recibe el nombre de trofozoito anular debido a la imagen que brinda cuando se los observa microscópicamente en frotis sanguíneos teñidos con los métodos comúnmente usados en Hematología: una banda citoplasmática delgada con la forma de una circunferencia teñida de azul-celeste, que rodea a la vacuola central, la que no toma ningún color, y un pequeño núcleo con la forma de un gránulo de color rojo, localizado en cualquier sitio de la banda citoplasmática. Semeja un anillo con una piedra engarzada.

Éste trofozoito, en cuestión de pocas horas, pierde esta morfología debido a que crece hasta ocupar prácticamente todo el glóbulo rojo (trofozoito maduro). En este punto, comienza el proceso de reproducción por esquizogonia, o sea, el núcleo sufre una serie de divisiones binarias sucesivas sin que simultáneamente acontezcan divisiones del citoplasma llamado esquizonte.

Completadas las divisiones nucleares, recién surge la partición del citoplasma, una porción para cada núcleo, quedando así conformados organismos independientes, que toman el nombre de merozoítos sanguíneos o merozoítos eritrocíticos, los que a continuación provocan el estallido del eritrocito. Los merozoítos liberados invaden nuevos eritrocitos para repetir la esquizogonia. El número de veces que se reitera este proceso depende de varios factores, básicamente los relacionados con la especie y cepa de plasmodio involucrado y con la capacidad de respuesta defensiva del hospedador.

Después de varias y sucesivas esquizogonias eritrocíticas, comienzan a aparecer grupos de merozoítos que, después de invadir eritrocitos, poseen la cualidad genética de transformarse en gametocitos (microgametocitos los masculinos y macrogametocitos los femeninos) que son las formas infecciosas para los mosquitos cuando éstos pican a las personas infectadas.

Durante su evolución intraeritrocítica, los gametocitos no efectúan reproducción alguna y muestran características morfológicas y tintoriales que permiten no confundirlos con las otras formas evolutivas que se encuentran efectuando la esquizogonia. Con el tiempo, son cada vez más los merozoítos genéticamente programados para transformarse en gametocitos.

Comportamiento de cada especie de *Plasmodium* en el hígado y sangre periférica:

***Plasmodium vivax*:** La especie más común en Ecuador y en la sub-región Andina. Es la especie más común en las zonas menos calientes del trópico y el parásito más grande encontrado en el humano. A partir de cada esporozoito que ingresa en el hombre, ésta especie produce unos 10.000 a 12.000 merozoitos tisulares en aproximadamente 8 días.

Una vez que invade la sangre, el merozoito de *P. vivax* tiene una preferencia franca por los glóbulos rojos más jóvenes, que son más elásticos que los viejos y, por lo tanto mejor capacitados para agrandarse y acomodar a un parásito en crecimiento. Puesto que no existe ninguna adhesividad en los glóbulos rojos que los contienen, como ocurre en los glóbulos rojos parasitados por *P. falciparum*; los glóbulos rojos parasitados con *P. vivax*, circulan libremente y en todo momento durante el ciclo o la serie de ciclos eritrocíticos que caracteriza la esquizogonia.

Una parte de los esporozoitos que ingresaron al huésped están genéticamente programados para evolucionar hacia un estadio llamado hipnozoítos (zoítos = dormidos o en estado de vida latente), los cuales permanecen en esta condición por espacios variados de tiempo, desde pocos meses y hasta un máximo de cinco años, para recién entonces iniciar su ciclo preeritrocítico y posterior invasión de la sangre.

Cuando se trata de *P. vivax*, la membrana de los glóbulos rojos, en lugar de tornarse adhesiva, produce una serie de gránulos conocidos como “gránulos de schuffner” que son uniformes en tamaño, forma y distribución; que después de la tinción pueden adquirir un color rojizo.

Contrariamente a lo que ocurre con *P. falciparum*, los gametocitos de *P. vivax* crecen en la sangre periférica y se los encuentra en la circulación antes de haberse desarrollado completamente. En una sola gota de sangre parasitada con *P. vivax* pueden estar representados la totalidad de los estadios evolutivos de crecimiento.

Realiza un ciclo en sangre (esquizogonia eritrocítica) de 48 horas y cada esquizonte pone en libertad de 12 a 24 merozoitos. A diferencia del *P. falciparum*, los gametocitos de *P. vivax* y *P. malariae* desaparecen de la circulación junto con las formas asexuadas, una vez que se administra una droga esquizonticida.

P. falciparum: la segunda especie en frecuencia en Ecuador y en la sub-región Andina. Es la especie más común encontrada en las zonas más calientes del trópico y la más frecuentemente asociada con casos complicados y fatales.

A partir de cada esporozoito que ingresa en el hombre, ésta especie produce unos 40.000 merozoitos tisulares en aproximadamente 6 días. Una vez que invaden la sangre, los merozoitos de *falciparum*, atacan tanto los glóbulos jóvenes y viejos, situación que podría explicar las altas parasitemias encontradas en las infecciones por esta especie de *Plasmodium*.

Otro fenómeno, propio de esta especie parasitaria es el denominado de “citoadherencia”, que determina que los eritrocitos invadidos por el parásito, tanto para efectuar la esquizogonia como la gametogonia, queden pegados y secuestrados en la superficie de capilares de órganos tales como cerebro, pulmones, riñones, intestino e hígado, en donde continúan su evolución. Por esta razón, desaparecen de la sangre circulante hasta el estallido del eritrocito. Este proceso de citoadherencia determina el taponamiento de pequeños capilares que generalmente se encuentran en el cerebro, riñones y pulmones principalmente, produciendo así graves complicaciones y como consecuencia la muerte.

Por la razón anterior, es que en la sangre periférica se encuentra solamente una gran variedad en número y tamaño (pequeñas, medianas y grandes) de formas anulares asexuadas del parásito. Los merozoitos liberados que están programados para la esquizogonia reaparecerán en sangre circulante en el estadio de trofozoito, los que, al cabo de pocas horas, quedarán secuestrados.

En el caso de eritrocitos que contienen parásitos que están transformándose en gametocitos, éstos no estallarán y se despegarán del endotelio cuando los gametocitos hayan alcanzado su completa maduración.

En un ataque primario de malaria por *P. falciparum* puede observarse la parasitemia en la sangre alrededor del décimo o decimosegundo día, que va seguida, en el término de 24 horas de la aparición de síntomas. Los gametocitos comenzarán a aparecer ocho a diez días más tarde

Cada nuevo ciclo en la sangre (esquizogonia eritrocítica) se realiza en 48 horas y cada esquizonte pone en libertad de 12 a 32 merozoitos.

Si un enfermo no recibe tratamiento; las formas anulares y los gametocitos pueden persistir juntos durante varios días a semanas, hasta que se adquiere inmunidad suficiente para eliminar las formas asexuadas. Después de la eliminación de las formas asexuadas con el tratamiento no se producen más gametocitos, aunque aquellos ya presentes pueden continuar circulando por sangre periférica durante un período de cinco a siete semanas.

Es importante indicar que en las infecciones por *P. falciparum*, no quedan formas remanentes del parásito a nivel hepático o “hipnozoítos” y por lo tanto no se producen recidivas de la enfermedad.

P. malariae: Es la especie menos común pero se encuentra en muchos lugares alrededor del mundo y se ha informado de su hallazgo en la sub-región Amazónica. (no se ha reportado su presencia en Ecuador). Esta especie tiene menor prevalencia en las regiones donde se encuentran las otras dos especies descritas anteriormente. A partir de cada esporozoito que ingresa en el hombre, ésta especie produce unos 2.000 merozoitos tisulares en aproximadamente 14 días.

Una vez que invaden la sangre, los merozoitos parasitan glóbulos rojos viejos. Esta característica, unida a un promedio de esquizogonia de 8 a 12 divisiones, da por resultado una parasitemia más baja que en el *P. vivax*. Debido a que los gametocitos por lo común son escasos, su transmisión no es tan frecuente como ocurre con las otras especies.

Presenta fuerte tendencia a evolucionar hacia una cronicidad prolongada, es decir, tiene la capacidad de sobrevivir en pequeño número en la sangre circulante del hospedador ejecutando esquizogonias eritrocíticas y gametogonias durante muchos años (décadas), durante los cuales no provoca manifestaciones clínicas, salvo cuando se producen recrudescencias.

Realiza un ciclo en sangre (esquizogonia eritrocítica) de 72 horas y cada esquizonte pone en libertad de 6 a 12 merozoitos.

P. ovale: Una especie rara pero se ha informado su presencia en muchos países, especialmente de África. No se encuentra en el continente americano. Se puede confundir con *P. vivax*. A partir de cada esporozoito que ingresa en el hombre, ésta especie produce unos 15.000 merozoítos tisulares en aproximadamente 11 días.

Una parte de los esporozoitos que ingresaron al huésped están genéticamente programados para evolucionar hacia un estadio llamado hipnozoítos (zoítos = dormidos o en estado de vida latente), los cuales permanecen en esta condición por espacios variados de tiempo a nivel del hígado, desde pocos meses y hasta incluso cinco años, para recién entonces iniciar y concretar su ciclo preeritrocítico y posterior invasión de la sangre.

Una vez que invaden la sangre, los merozoítos parasitan glóbulos rojos jóvenes, y por lo general las parasitemias son bajas y se producen pocos gametocitos, por tanto su reproducción no logra extenderse.

Realiza un ciclo en sangre (esquizogonia eritrocítica) de 48 horas y cada esquizonte pone en libertad de 4 a 12 merozoítos.

Esta especie se caracteriza por el aspecto ovalado que adquieren los glóbulos rojos cuando están parasitados, aunque este fenómeno no es fácil de observar y es arriesgado para un inexperto tratar de identificar el parásito solo por su morfología, a menos que haya tenido oportunidad de trabajar en países donde se observa con frecuencia.

5.2.2.1 Apariencia de los parásitos en la gota gruesa:

Así como los leucocitos, los parásitos en la gota gruesa parecen más pequeños que en el frotis. Se necesita mirar detenidamente y enfocar ajustando el tornillo micrométrico para observar a diferentes niveles de profundidad en la muestra. Los anillos finos de citoplasma de los trofozoítos más jóvenes parecen incompletos o interrumpidos. La ausencia de glóbulos rojos hace que no se pueda apreciar el punteado de Schüffner (*P. vivax*); aunque en la periferia de la muestra, en las partes más delgadas, se pueden observar algunos glóbulos rojos “fantasmas” que contienen el punteado. Las granulaciones o hendiduras de Maurer (*P. falciparum*) no pueden ser vistas en la gota gruesa para la descripción de las características de los parásitos *Plasmodium* se debe usar el frotis.

5.2.2.2 Apariencia de los parásitos en el frotis:

El efecto de los parásitos sobre el glóbulo rojo es una característica muy útil para diferenciar entre las especies de *Plasmodium*. Estas características incluyen el tamaño de los glóbulos rojos (aumentado o no) y el patrón de coloración que puede revelar punteado de Schüffner o granulaciones de Maurer para la descripción de las características de los *Plasmodium* y morfología del glóbulo rojo en el frotis.

En el caso de *P. falciparum*, generalmente solo se observan los trofozoítos más jóvenes (anillos) y los estadios sexuales o gametocitos. Esto se debe a que los otros estadios (trofozoítos en crecimiento y esquizontes) se encuentran citoadheridos o secuestrados en la microvasculatura. Este secuestro microvascular es mediado por una interacción receptor – ligando: los receptores en la superficie del eritrocito parasitado por *P. falciparum* (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 o PfEMP1) interactúan con ligandos en la superficie de las células endoteliales de capilares y

vénulas (por ejemplo: ICAM-1, CD-36, VCAM, CSA). El secuestro o citoadherencia en la microvasculatura ocasiona trastornos mecánicos y funcionales de la perfusión, nutrición y oxigenación de los tejidos, produciendo las complicaciones asociadas a la malaria falciparum (ver manifestaciones clínicas). En infecciones con hiperparasitemia ($\geq 5\%$ de glóbulos rojos parasitados/método semicuantitativo ++++), los estadios maduros (esquizontes) comienzan a circular y es un signo de malaria grave.

Cuadro No. 2. Comparación de las características morfológicas de los parásitos *Plasmodium*. (Fuente: Comparación de las especies de *Plasmodium* spp. que parasitan a los seres humanos. División de Enfermedades Parasitarias, CDC, Atlanta, GA, Estados Unidos de América. Sitio Web: <http://www.cdc.gov>)

PARASITO	<i>P. vivax</i>	<i>P. falcíparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
TAMAÑO DEL PARÁSITO	Grande	Pequeño	Moderado	Entre <i>vivax</i> y <i>malariae</i>
ERITROCITO	Agrandado, redondo u ovalado, puede estar distorsionado, a menudo se observa granulaciones de Shuffner	Normal, rara vez se observan granulaciones de Maurer	Normal o disminuido, ocasionalmente se observan granulaciones de Zieman	Agrandado, redondo u ovalado, algunos fimbriados, granulaciones de Jame
ESTADIOS OBSERVADOS EN SANGRE PERIFERICA	Todos los estadios	Trofozoitos jóvenes y gametocitos. En infecciones severas: trofozoitos maduros y esquizontes.	Todos los estadios.	Todos los estadios.
PIGMENTO MALARICO	Se observa en el citoplasma del trofozoito maduro con una coloración que varía del amarillo al café. En gametocitos se observan como finas granulaciones oscuras dispersas en el citoplasma y en los esquizontes forma una sola masa de color café oscuro	Se presenta en el citoplasma de los trofozoitos maduros como un tinte amarillo. En los esquizontes: se agrupa formando una masa negra. En los gametocitos, se observa como bastones gruesos, color café oscuro a negro rodeando la cromatina	Se observa en el citoplasma desde los trofozoitos jóvenes como una coloración que varía del amarillo al negro. En los esquizontes, se condensa en una masa única de color café. En los gametocitos es abundante y disperso, color amarillo	Aparece moderadamente como un tinte amarillo en el citoplasma de los parásitos. En las formas maduras, puede formar una masa única de color café oscuro.

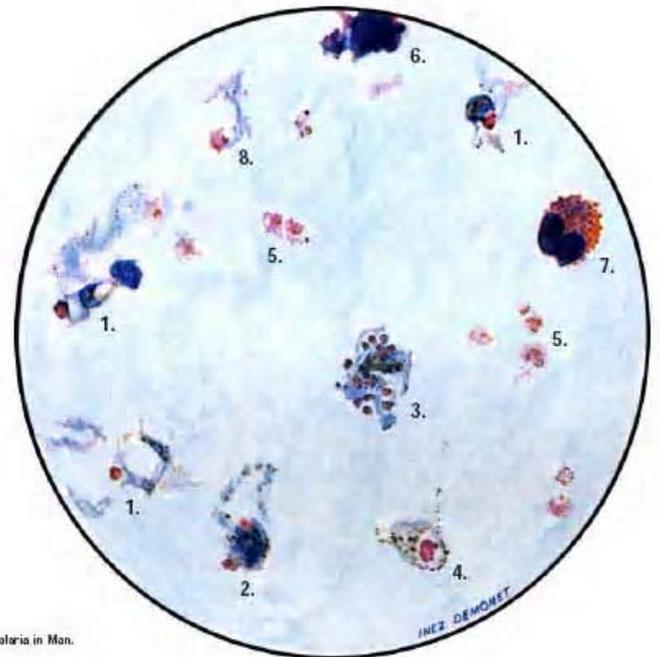
PARASITO	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
TROFOZOIT O JOVEN O ANILLO	Anillo pequeño, a veces fraccionado, mostrando un citoplasma regular o ligeramente grande y amebode, con presencia de vacuola.	Anillo muy pequeño, citoplasma delicado y regular; puede presentarse a manera de corbatín, “i”, “;”. Puede presentar uno o dos puntos de cromatina(forma en halterio), también puede presentar ubicación paraglobular	Anillo pequeño con citoplasma grueso y regular, la cromatina es relativamente grande y se puede presentar como un punto o ligeramente alargada. Ocasionalmente forma bandas.	Anillo pequeño, con citoplasma grueso, regular, compacto y con presencia de vacuola. Cromatina prominente.
TROFOZOIT O MADURO	Grande, citoplasma grueso con variedad de formas ameboides y presencia de vacuola	Normal, compacto, el citoplasma ha ganado tamaño. Cromatina pequeña y presencia de vacuola. Es frecuente la infección múltiple (dos o tres en un mismo glóbulo rojo)	Mediano, con citoplasma grande redondo y compacto; algunas veces no se evidencia la vacuola. Citoplasma coloreado intensamente, con una cromatina grande que puede observarse como un punto o ligeramente alargada a manera de rectángulo, triángulo o en formas de bandas.	Mediano, con citoplasma grande redondo y compacto. Presencia de vacuola y posee una cromatina más prominente.
ESQUIZONTE	Ocupa generalmente todo el glóbulo rojo. Tiene de 12 a 24 merozoitos distribuidos irregularmente	Ocasionalmente, se observa el esquizonte joven con 3 a 7 merozoitos. El esquizonte maduro tiene de 12 a 32 merozoitos.	Ocupa generalmente todo el eritrocito, tiene de 6 a 12 merozoitos que pueden estar dispuestos ordenadamente a manera de roseta.	No ocupa más de 2/3 partes del eritrocito; tiene de 4 a 12 merozoitos, dispuestos irregularmente.
GAMETOCITO	Grande, redondo u ovalado. Ocupa generalmente todo el eritrocito; cromatina grande, única y compacta, excéntrica en el macrogametocito y difusa en el microgametocito. Se pueden confundir con los trofozoitos maduros.	Tiene forma de semiluna, salchicha o banano. Cuando hay exceso de muestra y debido a que el proceso de secado es muy lento tiende a redondearse. Cromatina difusa (microgametocito), o en una sola masa (macrogametocito) Pigmento malárico	Es redondo u ovalado; ocupa todo el eritrocito; no posee vacuola. Presenta abundante pigmento. Cromatina grande, compacta y excéntrica (macrogametocito), difusa en el microgametocito. Puede llegar a ser	Redondo u ovalado, de menor tamaño que en <i>vivax</i> ; la cromatina es grande y compacta, excéntrica (macrogametocito), difusa en el microgametocito.

		color café oscuro al negro a manera de bastones.	indistinguible del trofozoito maduro.	
--	--	--	---------------------------------------	--

Figura No. 6. Características de las diferentes especies de *Plasmodium* en la gota gruesa
 (Fuente: *Plasmodium* spp. Estadios sanguíneos, gota gruesa. División de Enfermedades Parasitarias, CDC, Atlanta, GA, Estados Unidos de América. Sitio Web: <http://www.cdc.gov>).

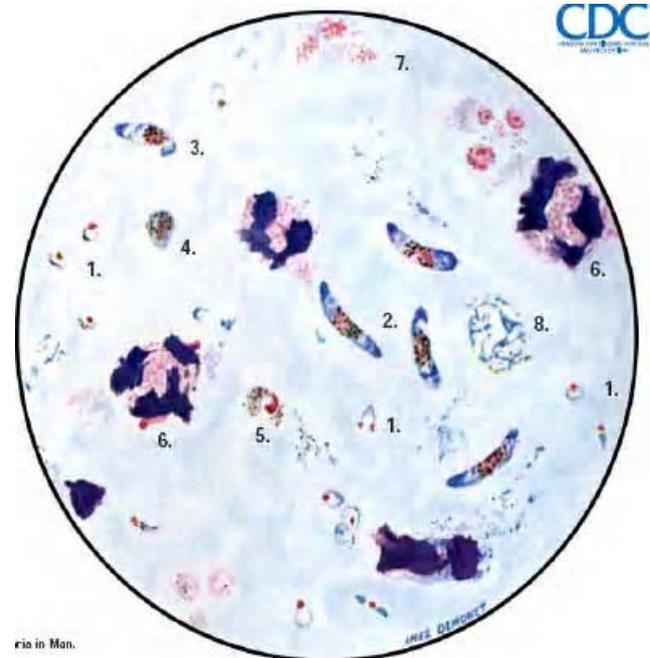
6A. *Plasmodium vivax*

1. Trofozoíto anular o anillo
2. Esquizontes con dos fragmentos de cromatina
3. Esquizonte maduro
4. Gametocito
5. Plaquetas
6. Neutrófilo
7. Eosinófilo
8. Plaqueta asociada a restos de un glóbulo rojo joven



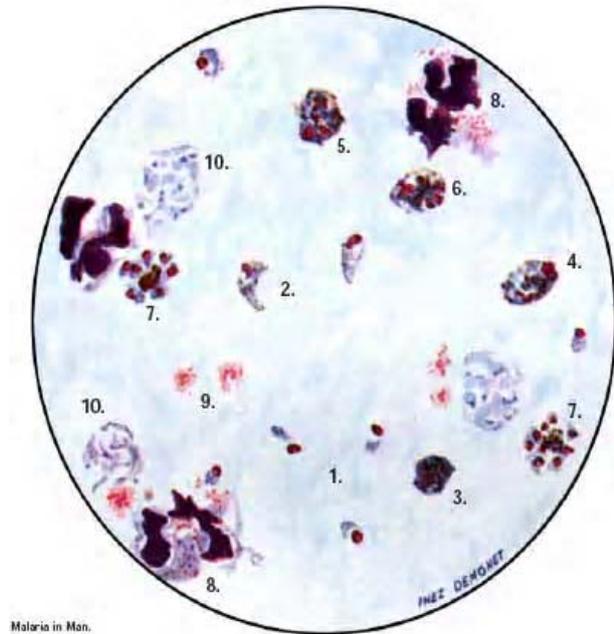
6B. *Plasmodium falciparum*

1. Trofozoíto anular o anillo
2. Gametocitos normales
3. Gametocito levemente distorsionado
4. Gametocito enrollado
5. Gametocito desintegrado
6. Leucocito polimorfonuclear
7. Plaquetas
8. Restos de glóbulo rojo joven



6C. *Plasmodium malariae*

1. Trofozoíto anular o anillo
2. Trofozoíto inmaduro
3. Trofozoíto maduro
- 4, 5, 6. Esquizontes con diferente número de fragmentos de cromatina
7. Esquizonte maduro
8. Leucocito polimorfonuclear
9. Plaquetas
10. Restos de glóbulo rojo joven



6D. *Plasmodium ovale*

1. Trofozoíto anular o anillo
2. Trofozoítos inmaduros
3. Trofozoítos maduros
4. Esquizontes
5. Gametocitos
6. Leucocitos polimorfonucleares
7. Plaquetas

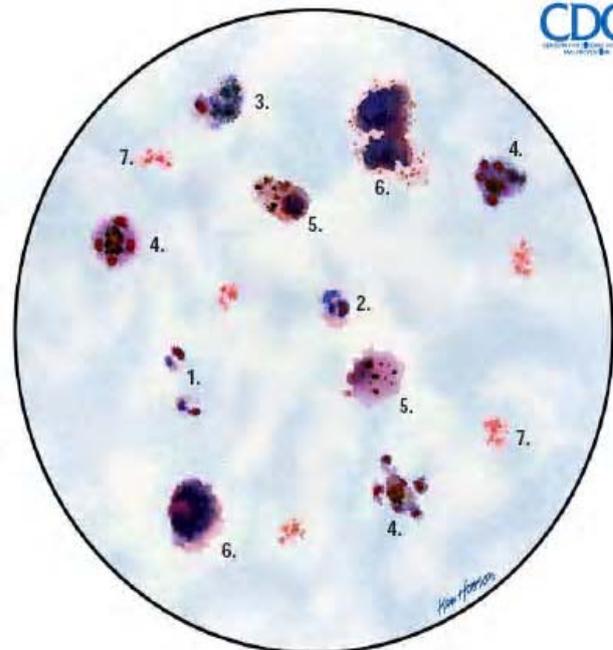
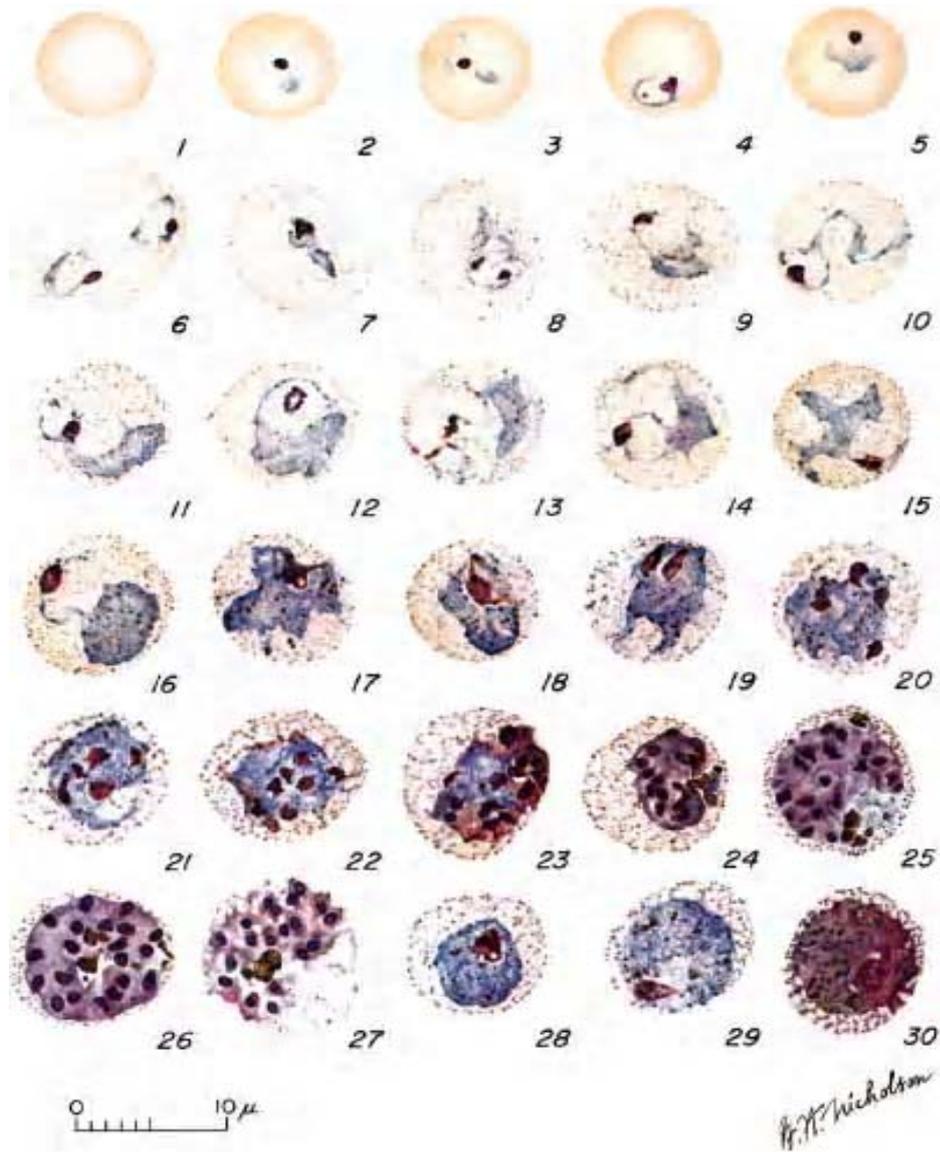


Figura No. 7. Características de las diferentes especies de *Plasmodium* en el extendido fino. (Fuente: *Plasmodium* spp. Estadios sanguíneos, extendido fino. División de Enfermedades Parasitarias, CDC, Atlanta, GA, Estados Unidos de América. Sitio Web: <http://www.cdc.gov>).

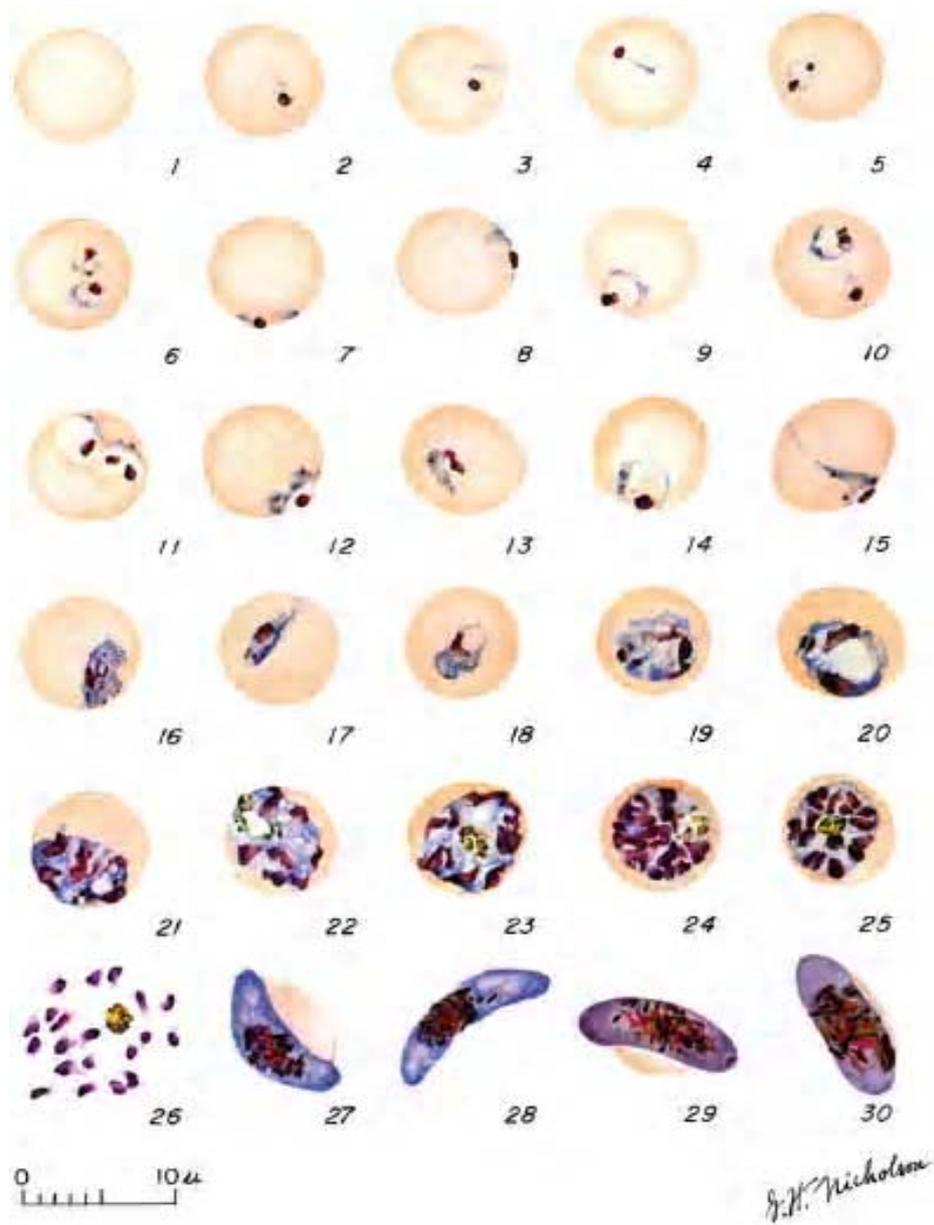
7A. *Plasmodium vivax*



- 1. Glóbulo rojo normal
- 2-6. Trofozoítos em forma anular
- 7-18. Trofozoítos

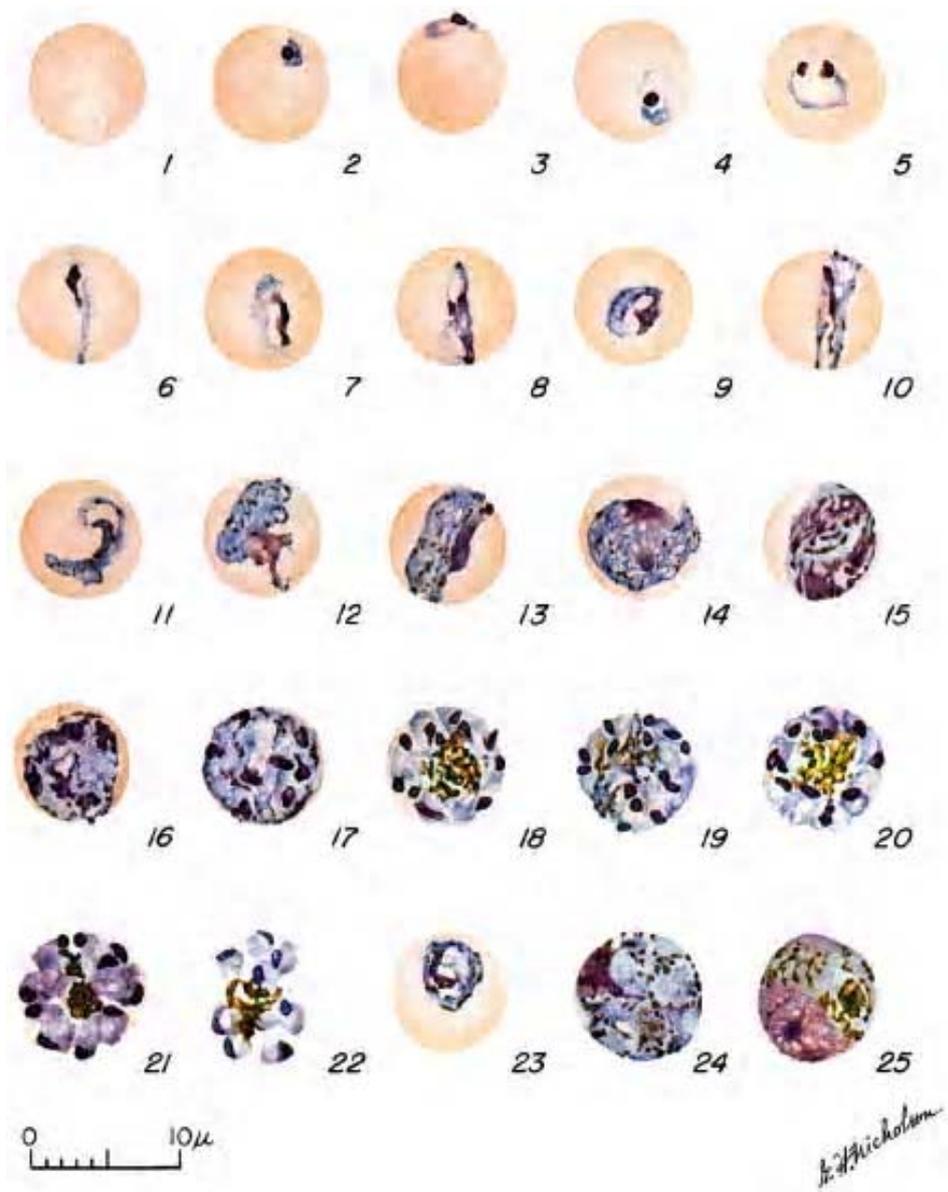
- 19-27. Esquizontes
- 28-29. Macrogametocitos (hembra)
- 30. Microgametocito (macho)

7B. *Plasmodium falciparum*



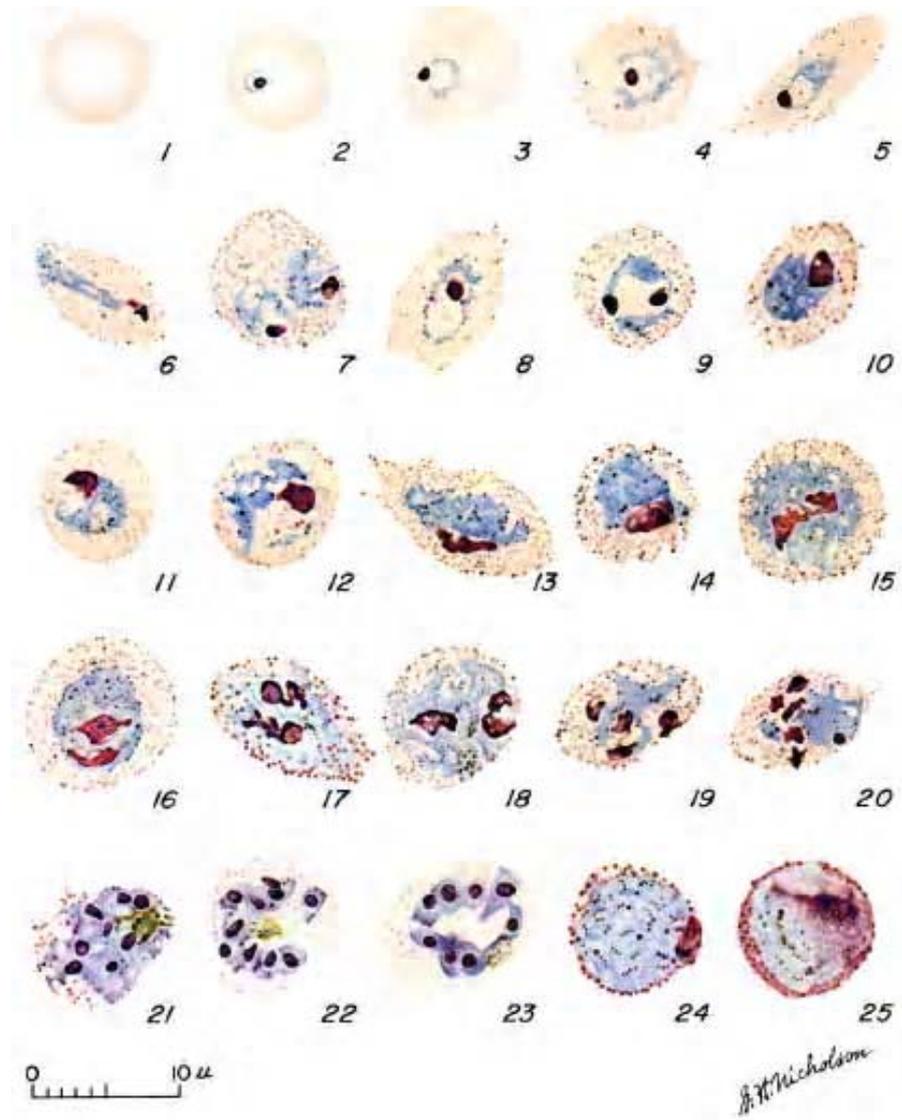
1. Glóbulo rojo normal
- 2-10. Trofozoítos em forma anular o anillos
- 11-18. Trofozoítos immaduros
- 19-26. Esquizontes
- 27-28. Gametocitos maduros (macrogametocito o hembra)
- 29-30. Gametocito maduro (microgametocito o macho)

7C. *Plasmodium malariae*



1. Glóbulo rojo normal
- 2-5. Trofozoítos en forma anular o anillos
- 6-13. Trofozoítos
- 14-22. Esquizontes
23. Gametocito en desarrollo
24. Gametocito maduro (macrogametocito o hembra)
25. Gametocito maduro (microgametocito o macho)

7D. *Plasmodium ovale*



1. Glóbulo rojo normal
- 2-5. Trofozoítos en forma anular o anillos
- 6-15. Trofozoítos
- 16-23. Esquizontes
24. Macrogametocito (hembra)
25. Microgametocito (macho)

5.3 Artefactos

Las muestras de sangre, gota gruesa y frotis, pueden demostrar algunas características que producen confusión y dificultan el diagnóstico. Estas características se conocen como artefactos. Algunos artefactos son más comunes que otros y algunos se pueden prevenir (ver Figs. No. 8 y 9). Los hongos están entre los artefactos comunes y la mejor manera de prevenirlos es utilizar reactivos no contaminados (láminas, agua, soluciones) y colorear las muestras dentro de 48 horas de haber sido tomadas. Esto no siempre es posible. Otros contaminantes están en el ambiente y se depositan en las muestras: partículas de polvo, sucio, células vegetales y bacterias.

5.4 Otros parásitos:

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 o frotis.

- *Leishmania* spp. (Fig. No. 9.1): los amastigotes de *Leishmania* spp. se pueden observar libres o intracelulares en monocitos. Tienen una forma esférica a ovoide, tamaño de 1-5 μm de largo y 1-2 μm de ancho, y contienen un núcleo grande y un kinetoplasto (ADN extranuclear de forma ovoide o de barra).
- *Histoplasma capsulatum* (Fig. 9.2): las formas de levaduras de *H. capsulatum* no deben confundirse con amastigotes. Se pueden observar libres o intracelulares en leucocitos polimorfonucleares o mononucleares, tienen una forma esférica a ovoide, tamaño de 2-4 μm de largo, y contienen un núcleo grande.
- *Trypanosoma cruzi* (Fig. 9.3): los tripomastigotes de *T. cruzi* tienen una longitud de 12-30 μm , 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. La porción libre del flagelo mide de 2-11 μm de largo.
- Microfilarias (Fig. 9.4): Existen ocho especies de filarias (nematodos) 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*. Esta microfilaria no tiene vaina, mide 163-203 μm por 3-4 μm y posee una cola delgada cuyos núcleos no se extienden hasta el final.
- *Babesia* spp (Fig. 9.5): 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. El tamaño puede variar de 1-5 μm .

Figura No. 8. Artefactos que se pueden encontrar en la observación microscópica de muestras de sangre (Fuente: World Health Organization. Basic Malaria Microscopy. Part I. Learner's Guide. Geneva 1991. Sitio Web: <http://www.who.int>).

ELEMENTOS DE LA SANGRE



Bacterias



Esporas



Células vegetales



Esporas e hifas



Misceláneas

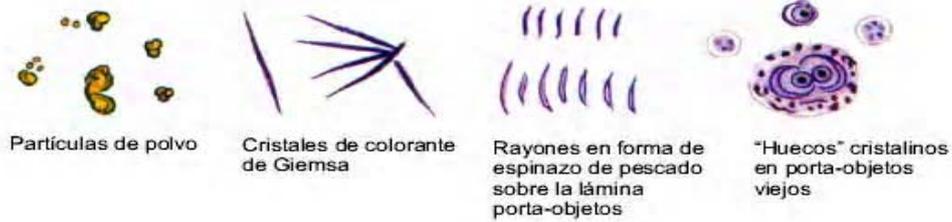
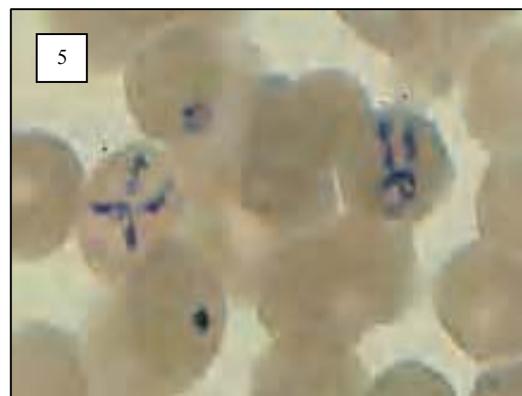
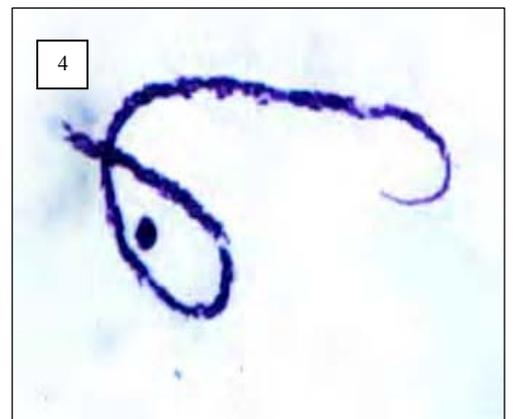
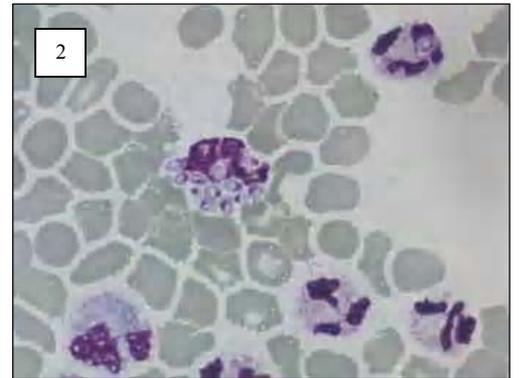
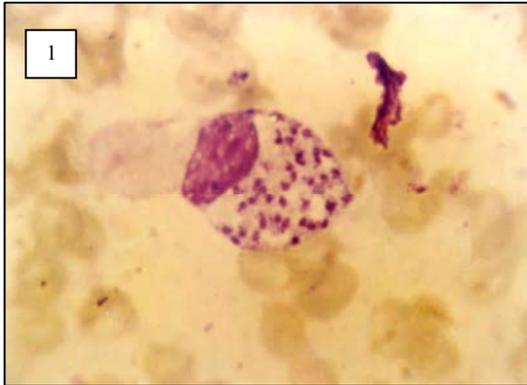


Figura No. 8.- Artefactos observados en la gota gruesa.

Figura No. 9. Microorganismos que se pueden encontrar en la observación microscópica de muestras de sangre: amastigotes de *Leishmania* (1), levaduras de *Histoplasma* (2), tripomastigotes de *T. cruzi* (3), microfilarias (4) y *Babesia* (5).



CAPITULO VI. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

El diagnóstico microscópico de la malaria se basa en la observación inicial de la gota gruesa seguido de la observación del frotis en los casos que sea necesario. Se inicia observando la gota gruesa porque ésta es 20-30 veces más sensible que el frotis ya que está formada por una mayor cantidad de sangre en un área pequeña. Para observar el equivalente de 100 campos de gota gruesa (objetivo 100X de inmersión), tendríamos que observar de 2000 a 3000 campos en el frotis.

Por lo tanto, no se recomienda la observación microscópica del frotis como una práctica rutinaria en el diagnóstico microscópico de la malaria. Se recomienda la observación del frotis en las siguientes situaciones:

- Cuando la gota gruesa es inadecuada o no se cuenta con una gota gruesa,
- cuando es necesario confirmar la especie de *Plasmodium*,
- cuando es necesario determinar la viabilidad de los parásitos.

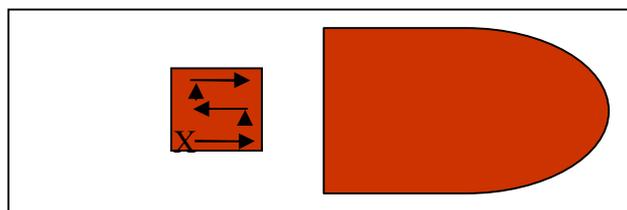
El caso más frecuente de necesidad de confirmar la especie de *Plasmodium* es cuando solo se encuentran trofozoítos jóvenes o anillos. La observación microscópica del frotis provee información sobre el glóbulo rojo parasitado que nos permite identificar al parásito como *P. vivax* (glóbulos rojos agrandados, deformados y con punteado de Schüffner) o como *P. falciparum* (glóbulos rojos no agrandados ni deformados y sin punteado).

Se recomienda revisar primero las muestras con objetivo de 10X para poder identificar las zonas con distribución homogénea de leucocitos (gota gruesa) y eritrocitos (frotis).

6.1 Lectura de la gota gruesa

En general, siempre que la gota gruesa esté bien preparada y coloreada, no debe haber dificultad en la identificación de las especies de *Plasmodium* presentes. Se debe colocar la lámina sobre la platina del microscopio y se dispone del objetivo de inmersión (100X) en dirección a la X marcada en el diagrama abajo. Se coloca una gota de aceite de inmersión en la muestra y se hace ascender la platina con la muestra hasta que el objetivo haga contacto con el aceite. Se deben observar 100 campos siguiendo la pauta de movimiento indicada. Si se encuentran parásitos, se debe observar un total de 100 campos para confirmar la especie encontrada antes de proceder a estimar la densidad parasitaria. La observación de 100 campos posibilita la identificación de infecciones mixtas. Para el conteo de 100 campos y el conteo de la parasitemia se puede utilizar un contador manual. En la detección pasiva de casos, el diagnóstico microscópico de la malaria se realiza con la observación de 100 campos de inmersión. Para control de calidad 200 campos. En la búsqueda activa de casos, se deben observar más campos (300) para detectar infecciones subclínicas e infecciones agudas con parasitemia baja, así también para seguimiento a pacientes cuando se está evaluando la eficacia de los antimaláricos.

Desplazar la lámina que contiene la muestra de sangre siguiendo el patrón mostrado:



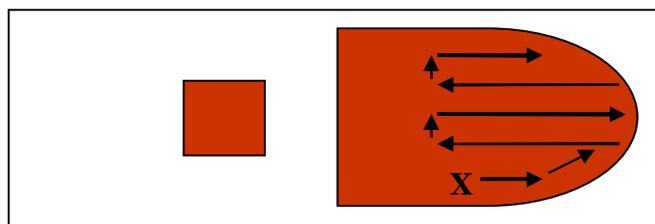
6.2 Lectura del frotis

El frotis se observa en el borde distal (cola) debido a que es ahí donde las células:

- Están distribuidas de manera más uniforme
- se encuentran en una sola capa
- presentan una distorsión mínima.

Se debe colocar la lámina sobre la platina del microscopio y se dispone del objetivo de inmersión (100X) en dirección a la X marcada en el diagrama abajo. Se coloca una gota de aceite de inmersión en la muestra y se hace ascender la platina con la muestra hasta que el objetivo haga contacto con el aceite.

Enfocar y examinar la película de sangre siguiendo el patrón mostrado:



6.3 Estimación de la 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. También sirve para evaluar la eficacia del tratamiento antiparasitario, monitoreando la densidad parasitaria durante el tratamiento. Si este es eficaz, la densidad parasitaria disminuirá progresivamente.

En situaciones de transmisión acentuada y estable de la malaria, la adquisición de inmunidad (premunición) produce una protección clínica de los individuos, quienes podrían no presentar fiebre aún con densidades parasitarias moderadas a altas.

Sin embargo, la gran mayoría de los casos de malaria que se manejan en los hospitales y centros de salud del Ecuador, corresponden a casos agudos, algunos complicados, y en menor proporción, a casos crónicos.

En la malaria aguda, la densidad parasitaria permite evaluar la evolución clínica del paciente y el manejo de complicaciones tales como anemia, acidosis metabólica e hipoglicemia. En la malaria crónica, la parasitemia es generalmente baja pero de larga duración. La parasitemia también proporciona al clínico un dato objetivo para evaluar la respuesta terapéutica y permite vigilar la susceptibilidad *in vivo* a las drogas esquizonticidas sanguíneas como la cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina, quinina y derivados de artemisinina, entre otras. La primaquina es una droga esquizonticida tisular (hipnozoitos) que tiene poco efecto sobre los estadios sanguíneos, excepto los gametocitos de *P. falciparum*.

Al determinar la densidad parasitaria, se debe informar de manera independiente los estadios asexuales y los estadios sexuales (gametocitos). Esto es así, debido a que los estadios asexuales son los responsables de las manifestaciones clínicas y complicaciones.

Existen varios métodos para determinar la densidad parasitaria. A continuación se describe:

- El método simple de cruces o semi-cuantitativo (gota gruesa)
- El método cuantitativo que permite estimar la parasitemia en la gota gruesa y en el frotis, y que se informa como número de parásitos en 200 leucocitos (gota gruesa) o porcentaje de glóbulos rojos parasitados (frotis).

Tanto en la gota gruesa como en el frotis, el cálculo inicial se puede traducir a número de parásitos por microlitro de sangre si conocemos los parámetros hematológicos de los pacientes o utilizamos las constantes recomendadas.

6.3.1 Método de Cruces o semi-cuantitativo

Sistema simple, usado rutinariamente que permite determinar el número de parásitos presentes por microlitro de sangre mediante la suma del total de parásitos observados en 100 campos microscópicos de inmersión, en una muestra de gota gruesa bien preparada y corresponden aproximadamente a 0,2 µl de sangre.

Cuadro No. 3. Densidad parasitaria estimada por cruces, gota gruesa.

Interpretación por cruces *	Cantidad de parásitos observados
1 – 39	1-39 parásitos en 100 campos
½ +	40-60 parásitos en 100 campos
+	60 – 100 parásitos en 100 campos (1 parásito/campo)
++	2-20 parásitos por cada campo
+++	21-200 parásitos por cada campo
++++	Mas de 200 (incontables) por cada campo

*Se indica V, F, Fg si la especie identificada es *P. vivax* o *P. falciparum* respectivamente.

6.3.2 Método Cuantitativo (Gota Gruesa)

Método práctico, razonable y de precisión aceptable. El número de parásitos por microlitro de sangre se mide comparando el número de parásitos con el número de leucocitos en la gota gruesa en base a un recuento medio estimado en cerca de 6.000 leucocitos por microlitro de sangre.

Para poner en práctica este método se necesitan dos contadores: uno para contar los parásitos y otro para los leucocitos.

Se cuentan leucocitos y parásitos simultáneamente:

- Si después de contar 200 leucocitos, 10 ó más parásitos han sido identificados y contados, anotar los resultados en los formatos de registro en términos de número de parásitos por 200 leucocitos.
- Si después de contar 200 leucocitos, menos de 10 parásitos han sido identificados y contados, continuar el recuento de leucocitos hasta llegar a 500, para luego anotar los resultados en los formatos de registro en términos de número de parásitos por 500 leucocitos.

- En caso de parasitemia alta, realizar el recuento en función del número de parásitos, registrando su recuento hasta 500 y reemplazar su valor en la fórmula con la cantidad de leucocitos encontrados.

En cada caso, el número relativo de parásitos al número de leucocitos contados puede ser convertido a parásitos por microlitro de sangre usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de parásitos contados} \times 6000}{\text{N}^\circ \text{ de leucocitos contados}} = \text{Parásitos} / \mu\text{l}$$

Ej: Si se cuentan 205 leucocitos y 50 parásitos, al aplicar la fórmula se tendrá:

$$\text{Parásitos} / \mu\text{L} = \frac{50 \times 6000}{205} = 1463 \text{ p} / \mu\text{l}$$

6.3.3 Método Cuantitativo (frotis):

Se localiza una porción en la cola del frotis en que los campos sean uniformes y se cuenta el número de glóbulos rojos en un campo. Luego se cuentan simultáneamente glóbulos rojos parasitados y campos hasta llegar a un número de campos equivalentes a 10.000 glóbulos rojos. Los glóbulos rojos infectados por más de un parásito se cuentan como uno. Por ejemplo, si el área escogida contiene 280 glóbulos rojos por campo, se deben contar los parásitos presentes en 36 campos. Si el conteo arroja un resultado de 40 parásitos en 10.000 glóbulos rojos, la parasitemia se informa como 0.4%. Una parasitemia de 1% es una densidad parasitaria elevada y de $\geq 5\%$ es hiperparasitemia que puede poner en peligro la vida del paciente.

6.3.4 Densidad parasitaria estimada por microlitro de sangre (Cuadro No. 5).

Se debe disponer del conteo de glóbulos rojos y leucocitos del paciente. Si no se dispone de esta información, se asumen concentraciones constantes de 5'000.000 eritrocitos/ μl y 6.000 leucocitos/ μl .

Gota Gruesa: si se contaron 40 parásitos en 200 leucocitos, entonces $50 \times 6000 / 205 = 2.463$ parásitos/ μl de sangre

Frotis: Si se estimó una parasitemia de 0.4%, entonces $0.4\% \times 5'000,000 / 100\% = 20.000$ parásitos/ μl de sangre.

Cuadro No. 4. Densidad parasitaria estimada por leucocitos y por microlitro de sangre, gota gruesa y extendido fino.

Densidad	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>	
	/200 leucocitos	/microlitro	/200 leucocitos	/microlitro
Baja	< 10	< 800	< 10	< 800
Moderada	10 – 50	800-4000	10-30	800-2400
Alta	> 50	> 4000	> 30	> 2400

6.4 Informe de resultados e interpretación.

La malaria no se descarta con un resultado de gota gruesa negativo. Cuando se está examinando un paciente individual de quien se posee evidencia clínica y

epidemiológica de malaria, es necesario tomar una o dos muestras adicionales si la primera gota gruesa es negativa. Las muestras adicionales se deben tomar durante o inmediatamente después de la fiebre. Esta recomendación es para pacientes que presenta una infección a *P. falciparum* en cuya infección solamente circulan los estadios más jóvenes (anillos), después de la ruptura del esquizonte (asociada a la fiebre), y los gametocitos. Los estadios de *P. vivax* siempre circulan.

En caso de encontrar un parásito durante la observación microscópica de la lámina, se considera lámina positiva con *Plasmodium*, y se debe administrar el esquema terapéutico respectivo.

El resultado de la observación microscópica se debe informar en el formulario respectivo y **no debe ser escrito** sobre la lámina para no sesgar la validación de las láminas diagnosticadas. Cuando la observación de **100 campos microscópicos** de gota gruesa no ha permitido identificar parásitos, se informa Negativa.

Si la infección malárica es por *P. falciparum*, se debe reportar y registrar las fases de desarrollo de la siguiente manera:

F = anillos (estadios asexuales) únicamente

F y Fg = anillos (estadios asexuales) y gametocitos (estadios sexuales)

Fg = gametocitos (estadios sexuales) únicamente

Luego aplicar la densidad parasitaria independientemente para cada estadio.

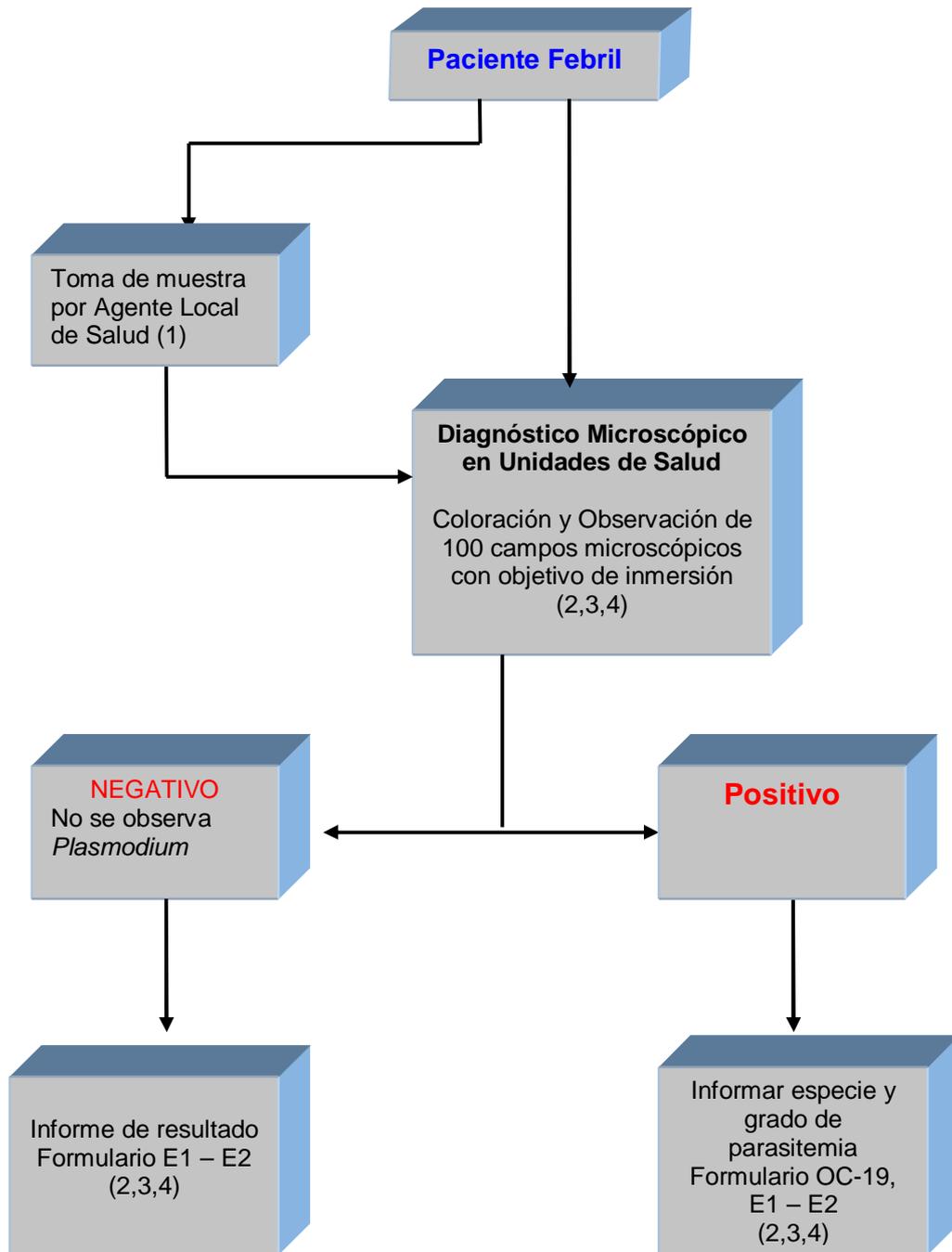
Si la infección malárica es por *P. vivax*, se debe reportar:

V = estadios sexuales y estadios asexuales.

A continuación se presentan varios ejemplos de resultados positivos, informados en el sistema de cruces ó en el sistema cuantitativo:

- 15 V (15 estadios sexuales o asexuales de *P. vivax*)
- *Plasmodium vivax*
20.000 parásitos/ μ l de *P. vivax*
- 15 F (15 anillos o formas asexuales de *P. falciparum*)
- ++ F + Fg (2-20 anillos/campo y 1 gametocito/campo de *P. falciparum*)
- *Plasmodium falciparum*
12.000 parásitos/ μ l de Fg
- *Plasmodium falciparum*
200 parásitos/ μ l de F

Figura No. 10. Flujograma Captación de pacientes y diagnóstico de sospechosos de malaria (Detección Pasiva de Casos)



Personal Responsable:

- 1 Agente Local de Salud
- 2 Microbiólogo
- 3 Técnico de Laboratorio
- 4 Microscopista

6.5 Evaluación de la respuesta terapéutica:

El artesunato + la sulfadoxina/pirimetamina constituye el esquema terapéutico de primera línea para el tratamiento de la malaria por *P. falciparum*, siendo la cloroquina y la primaquina el esquema para los casos de malaria por *P. vivax*; adicionalmente constituyen medicamentos antimaláricos incluidos en el Cuadro Básico de Medicamentos del Ministerio de salud Pública (2006), la quinina, clindamicina, y artemetero + lumefantrina. Hasta la actualidad no se ha evidenciado en el país la presencia de resistencia del *P. vivax* a la cloroquina, motivo por el cual esta sigue constituyendo la primera línea de su tratamiento.

La densidad parasitaria es un parámetro objetivo para estimar la intensidad de la infección y evaluar la respuesta terapéutica, comparando la densidad antes y después del inicio del tratamiento. Para estudios de la susceptibilidad de *Plasmodium* spp. a los esquemas terapéuticos en uso en el país, se recomienda el sistema de evaluación *In vivo* usando el protocolo estandarizado de la Organización Mundial de la Salud.(OMS). En la práctica clínica, se recomienda evaluar la respuesta terapéutica diariamente en los casos complicados y graves hospitalizados, con infecciones debido a *P. vivax* o *P. falciparum*. En los casos no complicados ambulatorios, se recomienda tomar una muestra de seguimiento en cualquier día antes de D28 si los pacientes presentan nuevos síntomas, especialmente fiebre. En infecciones por *P. falciparum*, se recomienda tomar una muestra para revisión una vez concluido el esquema terapéutico (día 4), en caso de infecciones por *P. vivax* en el día 8.

En las muestras de seguimiento se colocará el número que corresponda más la palabra control.

CAPITULO VII: RED DE PUESTOS DE DIAGNOSTICO, LABORATORIOS Y SISTEMA DE INFORMACIÓN

7.1 Estructuración de la Red:

La Red de puestos de diagnóstico y laboratorios provee una estructura en la cual varios laboratorios trabajan en diferentes niveles y están unidos por objetivos comunes, información, suministros, programas, supervisión, evaluación y sistema de control de calidad. La conformación de la Red es necesaria para suministrar información que permita planificar y evaluar las actividades de prevención y control de la malaria.

Los servicios de laboratorio de malaria están organizados en tres niveles:

1. **Nivel Central:** representado por el Laboratorio Nacional de Vigilancia, que es de referencia Nacional.
2. **Nivel Intermedio:** constituido por los Laboratorios zonales.
3. **Nivel local:** Comprendido por los puesto de diagnóstico, Laboratorios de Hospitales, Centros y Subcentros de Salud.

7.2 Funciones específicas de los puestos de diagnóstico y laboratorios de diferentes niveles

7.2.1 Laboratorio Nacional de Vigilancia

1. Funcionar como laboratorio nacional de referencia para el diagnóstico de la malaria.
2. Establecer las normas referentes a métodos y técnicas.
3. Formar al personal nuevo y actualizar al existente en las técnicas normadas.
4. Coordinar las actividades con los Laboratorios zonales, y Locales.
5. Recopilar, consolidar y remitir la información estadística, al departamento correspondiente.
6. Ejercer supervisión directa e indirecta a los puestos de diagnóstico y laboratorios de la Red Nacional.
7. Realizar el control de calidad de los resultados de los puestos de diagnóstico y laboratorios de la Red Nacional.
8. Participar en programas de control de calidad a nivel internacional.
9. Realizar o coordinar investigaciones de interés en Salud Pública.
10. Actuar como centro de estudios de resistencia a los antimaláricos con fines de vigilancia epidemiológica.
11. Coordinar con el departamento correspondiente del SNEM la identificación de necesidades para el fortalecimiento de la red de diagnóstico.
12. Suministrar a los puestos de diagnóstico y laboratorios los insumos adquiridos a través de los laboratorios de referencia zonales en coordinación con la Jefatura de zona.

7.2.2 Laboratorios Zonales:

1. Realizar el diagnóstico microscópico de malaria de la zona que corresponde.
2. Capacitar al personal en la toma de muestra, coloración y diagnóstico microscópico de acuerdo a los lineamientos del Manual Operativo Estándar para la Gestión del diagnóstico Microscópico de *Plasmodium* (Implementación de Centros de Capacitación continua para la descentralización del proceso)
3. Supervisar la realización del diagnóstico microscópico en su Red Regional provincial e implementar las medidas correctivas de acuerdo a los resultados.
4. Realizar el control de calidad del diagnóstico microscópico de malaria en su Red de puestos de diagnóstico y laboratorios e implementar las medidas correctivas de acuerdo a los resultados.
5. Enviar al nivel central los informes de la supervisión directa y control de calidad realizado a su Red, y remitir a su red los resultados de estas evaluaciones.
6. Remitir cada seis meses láminas al Laboratorio Nacional de Malaria, con sus respectivos formularios según lineamientos y calendario establecidos para el Control de Calidad.
7. Recopilar, consolidar y enviar al nivel central la información estadística proveniente de los puestos de diagnóstico y laboratorios locales.
8. Coordinar con el nivel local en lo que respecta a la referencia de muestras y supervisar dicho procedimiento.

9. Coordinar con la administración zonal el abastecimiento de materiales, insumos y equipo de la Red.
10. Preparar las soluciones amortiguadoras, solución stock de Giemsa de acuerdo a los lineamientos del Manual Operativo Estándar para la Gestión del Diagnóstico Microscópico de *Plasmodium* y distribuir las oportunamente en su Red.
11. Participar en las investigaciones operativas que se realizan en la zona o provincia en coordinación con el Programa Nacional de Malaria, incluyendo encuestas parasitológicas.

7.2.3 Puestos de Diagnóstico y Laboratorios Locales

1. Tomar muestras por demanda en su establecimiento de salud y realizar el diagnóstico microscópico de estas muestras y de las muestras tomadas por los Colaboradores voluntarios de su área de influencia, de acuerdo a los lineamientos de este Manual para el Diagnóstico de la Malaria.
2. Remitir láminas al Laboratorio zonal, según lineamientos establecidos para el Control de Calidad.
3. Utilización adecuada de los formularios para el sistema de información, con énfasis en el llenado correcto y completo de los mismos.
4. Apoyar las investigaciones operativas, incluyendo investigación de brotes, encuestas parasitológicas, evaluación de la susceptibilidad a los antimaláricos y otras de interés de salud pública, en coordinación con la zona y el Programa Nacional de Malaria.

Colaboradores voluntarios:

En caso de existir participación de colaboradores voluntarios en el proceso de captación de febriles y tratamiento, estos están encargados de:

1. Brindar asistencia a los pacientes febriles en su comunidad, tomar muestra de gota gruesa, recolectar los datos en el formulario OC-19 (notificación de sospechosos para el diagnóstico de malaria) y administrar el tratamiento.
2. Transportar las muestras al puesto de diagnóstico, Laboratorio local o Microscopista más cercano, el transporte debe ser con una frecuencia que no exceda una semana.
3. Recoger los resultados del diagnóstico de laboratorio a través de la Red de Col-Vol, de líderes comunitarios, u otro personal de salud, por el que se mas accesible a la comunidad, en la forma más rápida posible, dentro de los cuatro días subsiguientes a la fecha de entrega de la muestra. En el caso de *P. falciparum* la notificación deberá ser inmediata.

7.3 Sub-sistema de información

7.3.1 Formulario para la notificación de pacientes sospechosos de malaria (Formulario OC-19, Anexo 10)

El formulario consta de tres secciones, las cuales deben llenarse de forma completa y correcta: **Datos** generales, Datos del paciente y Datos del laboratorio. Es utilizado individualmente por paciente atendido, es llenado por el responsable de la notificación (Col-Vol o personal institucional de salud). Permite establecer ciertos parámetros de Vigilancia Epidemiológica y contiene un apartado para colocar el resultado de laboratorio.

7.3.2 Formulario para el Informe semanal del Laboratorio (Formulario E-1, Anexo 6)

Este formulario es de uso diario para el registro de láminas diagnosticadas, se debe consignar información detallada de láminas positivas y negativas de acuerdo a notificante de origen, el mismo que será entregado semanalmente.

7.3.3 Formulario de Notificación Semanal (Formulario E-2, Anexo 7)

Este formulario es de uso diario, en donde se registra a cada uno de los pacientes positivos atendidos, el mismo que será entregado semanalmente.

7.3.4 Formulario de registro de casos positivos de Malaria (Formulario RP-1, Anexo 9)

En este registro de información se debe consignar: Datos personales de pacientes positivos, esquema terapéutico utilizado y controles realizados.

7.3.5 Formulario para el Informe de evaluación de la Calidad de Toma, coloración de las Muestras y diagnóstico para el del Control de Calidad (Formulario CC-2, Anexo No. 8).

Este formulario es de uso exclusivo de los laboratorios revisores (Nivel Zonal o Central) en el que se evalúa la calidad de los procesos de toma de muestra, coloración de las láminas ingresadas así como la comparación del diagnóstico por parte de los puestos de diagnóstico y laboratorios del Nivel Local en comparación al diagnóstico realizado por los laboratorios revisores (Nivel Zonal o Central).

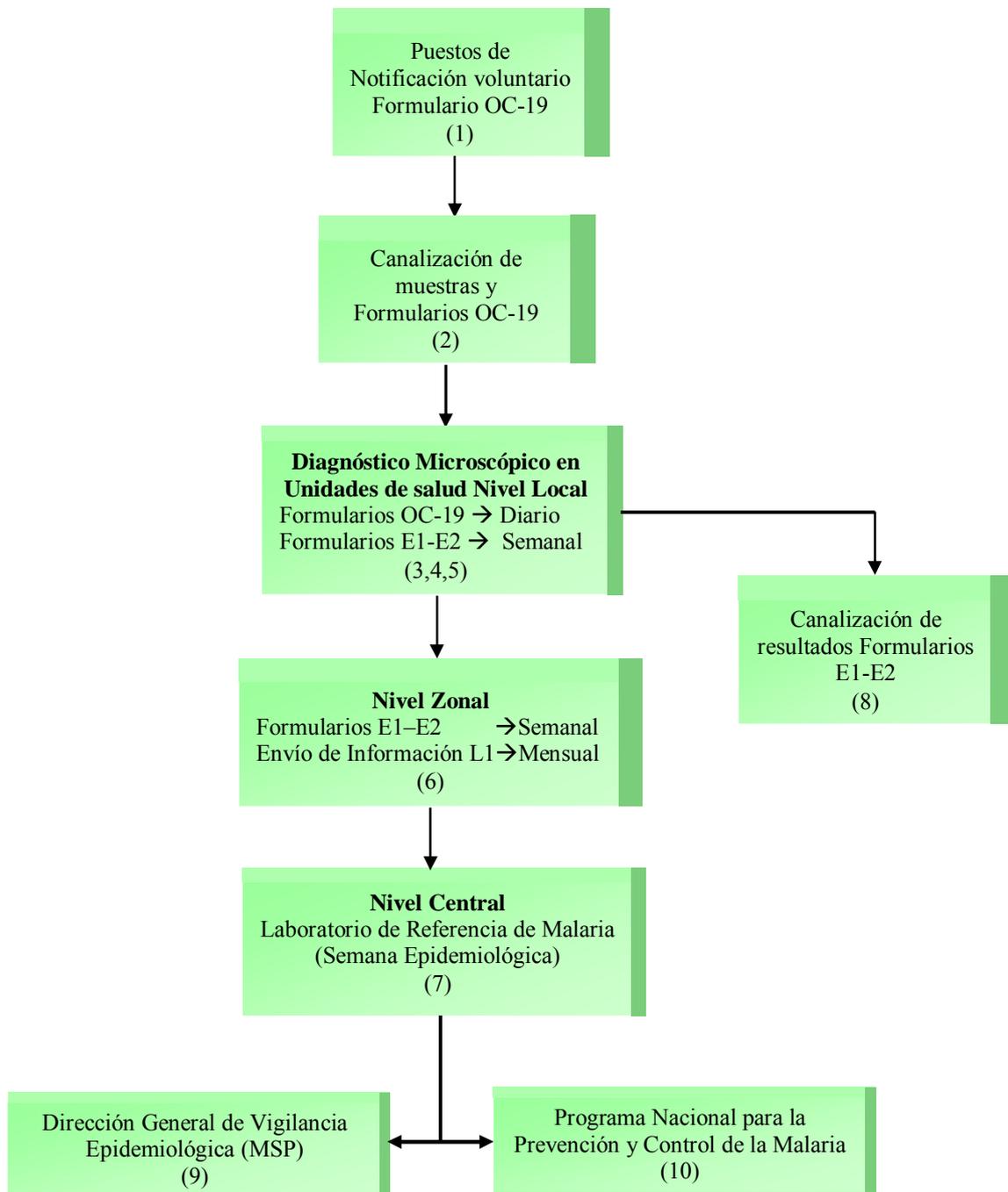
7.3.6 Formulario para envío de laminas a control de calidad (codificación de microscopistas) (Formulario CC-1 Anexo 11)

Este formulario esta diseñado para el envío de láminas al revisor con el código secreto de cada microscopista a ser evaluado.

7.3.7 Formulario para supervisión a microscopistas locales. (Formulario CC-3) Anexo 5

Esta diseñado para realizar la supervisión por parte de los niveles zonales o central a los microscopistas locales, revisando el proceso de gestión de diagnóstico microscópico, disponibilidad y uso de antimalaricos.

**Figura No.11 Flujograma de Canalización y Diagnostico de muestra
Canalización de Información
(Detección Pasiva de Casos)**



Personal Responsable

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1) Colaborador Voluntario (CoVol) | 6) Microbiólogo y Microscopista Revisores Nivel Departamental |
| 2) T.S.A./A.S.A. | 7) Microbiólogo y Microscopista Revisores Nivel Central |
| 3) Microbiólogo | 8) T.S.A. Municipal |
| 4) Técnico de laboratorio | 9) D.G.V.S. |
| 5) Microscopista | 10) Epidemiólogo |

CAPITULO VIII: SUPERVISION Y CONTROL DE CALIDAD:

8.1 Gestión de la Garantía de la Calidad (GGC) en el diagnóstico microscópico de la malaria

La gestión de la garantía de la calidad para el diagnóstico microscópico de la malaria en Ecuador se realiza a través de las siguientes actividades (Figura No, 1):

- 1) Cumplimiento de la Norma y sus estándares técnicos
- 2) Cumplimiento de los Procedimientos Operativos Estándar (POE)
- 3) Evaluación de la Competencia Profesional
- 4) Implementación de un Programa de Capacitación en base a los resultados de la evaluación de la competencia profesional, a la Norma Técnica y a los POE

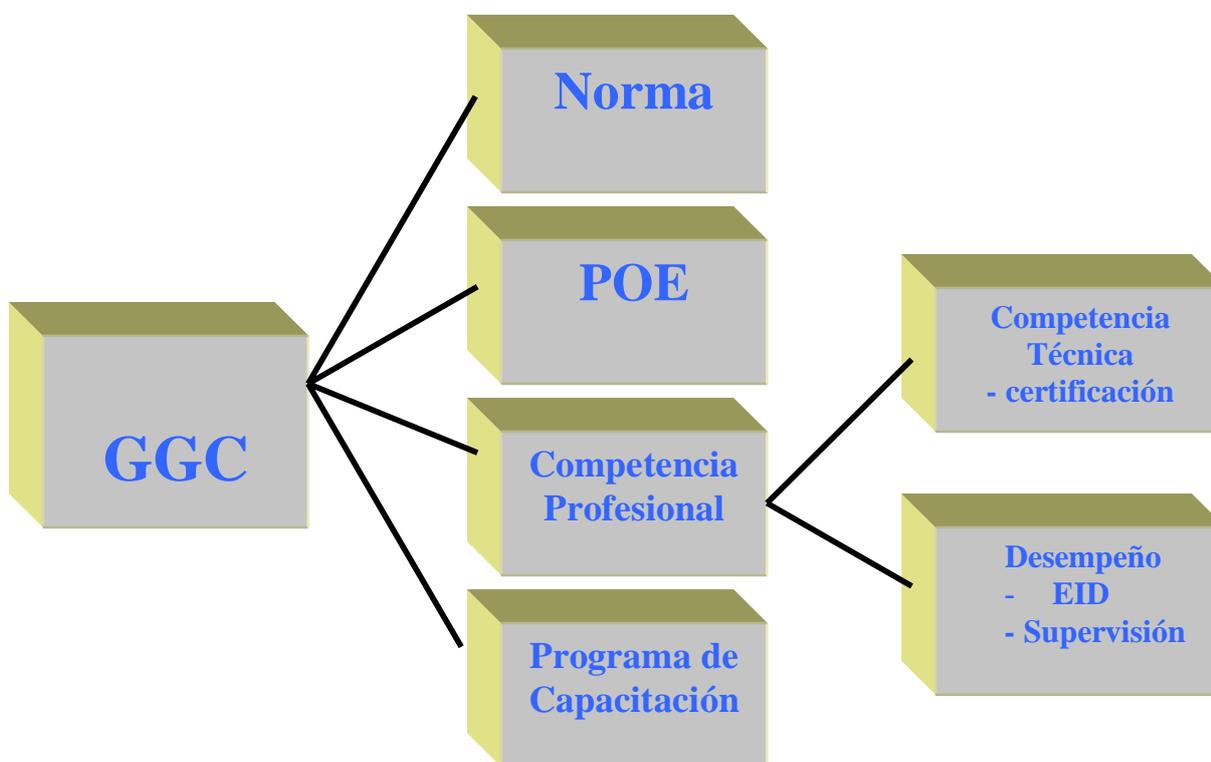


Figura No. 12. Elementos de la Gestión de Garantía de la Calidad (GGC) para el diagnóstico microscópico de la malaria. POE: procedimientos operativos estándar, EID: validación de laminas diagnosticadas, EED: evaluación externa del desempeño.

La Norma y estándares técnicos son el conjunto de lineamientos técnicos que regulan el ejercicio del diagnóstico microscópico de la malaria, desde la selección y capacitación del personal, la estructura y funcionamientos de los puestos de diagnóstico, la lectura de las muestras, hasta el registro y canalización de la información. Los procedimientos operativos estándar describen los diferentes procedimientos relacionados al diagnóstico microscópico con suficiente detalle para ser reproducidos de forma estandarizada por el

personal y se encuentran contenidos en el Manual de Procedimientos Operativos Estándar (Manual POE).

8.2. Control de Calidad

Es un proceso sistemático y continuo en los Puestos de Diagnóstico Microscópicos (PDM) que permite de manera simultánea medir la exactitud y precisión de las pruebas, la calidad de los equipos, instrumentos reactivos, el desempeño personal y un control de resultados emitidos.

Conjunto de acciones que se aplican durante la ejecución de cada prueba para asegurar que los resultados, productos o servicios pueden ser entregados.

Para evaluar la calidad de los PDM se utilizan siguientes métodos:

- 1.- Control de calidad interno
- 2.- Evaluación indirecta
- 3.- Auditoría
- 4.- Supervisión directa
- 5.- Evaluación externa del desempeño

8.2.1. Control de calidad interno.-

Conjunto de acciones correctivas que se aplican durante la ejecución de cada proceso para asegurar que los resultados, productos o servicios pueden ser entregados.

Es un proceso sistemático y continuo, con las siguientes características:

- Exactitud y precisión de las pruebas
- Calidad de los equipos, instrumentos y reactivos
- Desempeño del personal
- Control de los resultados emitidos
- Medidas correctivas

Los puestos de diagnóstico microscópico (PDM) de malaria en todos los niveles deben cumplir y registrar las siguientes etapas:

Pre-analítica: Identificación y registro del caso, toma y rotulación de la muestra, transporte y conservación del material, condiciones de trabajo.

Analítica: Ambiente, equipos, reactivos y procedimientos de elaboración, lectura e interpretación

Post analítica: Validación y registro de resultados, emisión y notificación

Corresponderá al responsable de cada PDM velar por el cumplimiento sistemático de las pautas establecidas para el control de calidad interno. En los laboratorios locales (puestos y/o centros de salud, hospitales) el microscopista debe asumir dicha responsabilidad.

En laboratorios de nivel intermedio y nacional se recomienda efectuar evaluaciones intralaboratorio (auto evaluaciones del personal técnico).

Los visitantes, trabajadores voluntarios, u otro personal de salud que realiza la toma de muestras, preparación y en envío, también deberán cumplir los requerimientos especificados en el manual de procedimientos.

La competencia profesional es el conjunto de conocimientos, habilidades y destrezas (conocimiento teórico y práctico), que posee el individuo (competencia técnica) y la forma en que pone en práctica ese conocimiento, es decir como se desempeña en su ambiente de trabajo (desempeño). La competencia profesional deber ser evaluada. La evaluación puede ser directa e indirecta. La evaluación directa incluye la acreditación (Supervisor, Microscopista Revisor, Microscopista) que se realiza en un Taller y la supervisión que se realiza de acuerdo a programación y que evalúa al microscopista en su ambiente de trabajo y la infraestructura del puesto de diagnostico. La evaluación indirecta incluyen la Validación de Láminas Diagnosticas y la Evaluación Externa del Desempeño (ver Fig. No. 1).

Los resultados de la evaluación de la competencia profesional de cada individuo y de todos los individuos que pertenecen a un puesto de diagnostico son utilizados para planificar las medidas correctivas que incluyen capacitación, dotación de insumos y equipo, reparación o remodelación del espacio físico. El Programa de Capacitación incluye la capacitación a personal nuevo y actualización de conocimientos al personal existente, el cual se fundamenta en la Norma Técnica y Manual POE.

Validación de Láminas Diagnosticadas. Está basado en la proporción de concordancia entre la primera lectura y re-exanimación de 120 muestras por microscopista por año o 10 muestras por mes. Las 10 muestras son examinadas mensualmente y los resultados son analizados en cohortes de 4 meses de 40 muestras. Este número es considerado el tamaño muestral mínimo que puede ser utilizado para un análisis adecuado. La selección de muestras debe ser no sesgada y debe incluir 5 muestras positivas con densidad parasitaria baja (+ y menos) y 5 muestras negativas por mes. Las muestras se deben seleccionar aleatoriamente de los registros.

Procedimiento:

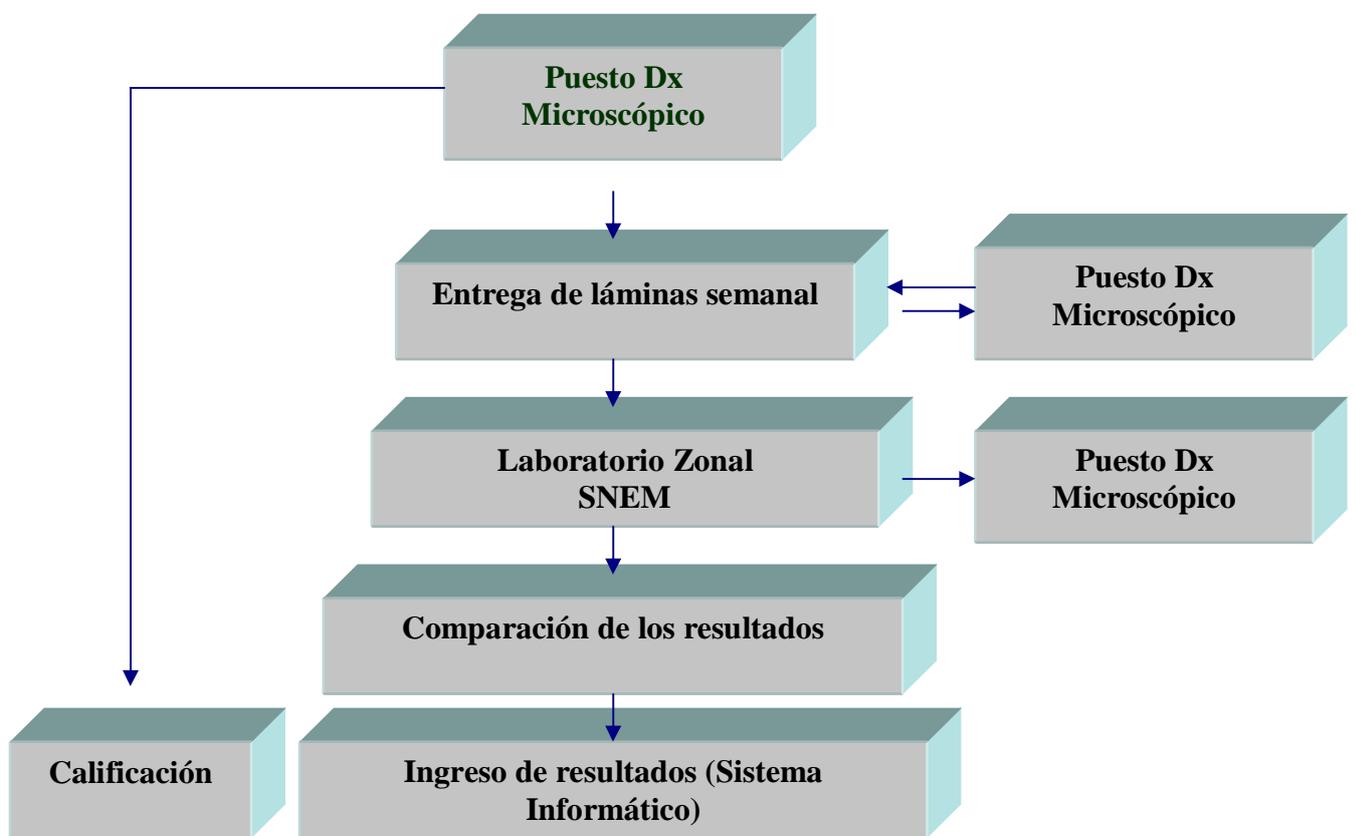
1. La lectura de las muestras por el revisor debe ser sin conocimiento del diagnostico inicial, ni su procedencia.
2. Recibe semanalmente las láminas seleccionadas junto al formulario CC-1.
3. La calidad técnica de la preparación de la muestra debe ser evaluada en base a los siguientes criterios: 1) calidad de la muestra: identificación, tamaño, ubicación y grosor (gota gruesa y frotis) y 2) calidad de la coloración: deshemoglobinización, tonalidad y precipitado. La evaluación se expresa con indicadores de calidad que estiman el porcentaje de error.
4. En caso de desacuerdo en el diagnostico e identificación de especie, debe realizarse una nueva lectura por un tercer microscopista del nivel central.
5. El laboratorio supervisor envía un informe (formulario CC-2) de la validación de laminas diagnosticadas, al encargado de la comparación de resultados de diagnostico de Malaria para verificación de concordancia, semanalmente de acuerdo al promedio de 40 laminas revisadas por día.

8.2.2. Evaluación Indirecta

La evaluación retrospectiva a nivel del laboratorio de referencia de un porcentaje determinado de muestras procedentes de la red.

El control indirecto se realizará por el laboratorio del nivel inmediatamente superior en la Red. El nivel nacional no es objeto de este tipo de evaluación.

Figura No. 13. Flujograma de la Evaluación Indirecta



Envío de material desde los PDM

Los PDM evaluados enviarán al nivel superior 100% de las láminas de diagnóstico (*positivas y negativas*) procesadas durante un periodo de evaluación establecido cada semana. Las láminas al momento del envío deben estar libres de polvo, residuos de aceite, embaladas en cartulina acanalada y sujetas con pabilo.

Método de selección del % de láminas que corresponda de acuerdo al tiempo del microscopista y el número de láminas recibidas, para la relectura por el Laboratorio Zonal.-

Cuadro No. 5 Relectura de láminas de rutina del laboratorio supervisado durante los primero 6 meses

N* LAMINAS	CANTIDAD	TIEMPO
0 – 50	100%	6 Meses
51 – 100	100%	3 Meses
	50% Negativo y 100% positivo	Mas de 3 meses
Más de 100	100%	2 meses
	50% negativo y 100% positivo	4 meses.

Cuadro No. 6 Relectura de láminas de rutina del laboratorio supervisado después de los 6 meses

N* DE LAMINAS	CANTIDAD	Porcentaje cuando no hay laminas positivas
0 – 10	100%	100%
11 – 50	100% positivo y 50% negativo	50%
51 – 100	100% positivo y 20% negativo	50%
Más de 100	100% positivo Y 10% negativo	30%

Análisis de resultados y notificación

- La lectura de las láminas será realizada por otra persona que desconocerá el diagnóstico inicial
- En caso de discordancia en el diagnóstico e identificación de especie entre el laboratorio supervisado se realizará una lectura por una tercera persona
- La evaluación indirecta del desempeño incluirá el análisis de la calidad técnica de la preparación, según los siguientes criterios:

Criterios de evaluación de la calidad técnica y de diagnóstico de la lámina de gota gruesa y frotis.

La reproducibilidad diagnóstica se determinará revisando y confrontando el diagnóstico emitido por el puestos de diagnostico microscópico a ser evaluado.

Se considera error diagnóstico la lámina que siendo positiva o negativa en el nivel evaluado, resulte negativa o positiva en el nivel evaluador.

Se considera error de especie cuando no presenta concordancia con el diagnóstico positivo de especie reportado por el puestos de diagnostico microscópico que está siendo evaluado.

La observación microscópica de la revisión estará en relación directa con la calidad y coloración de la muestra, teniendo que observar como mínimo 100 campos microscópicos en una muestra bien preparada (10 a 20 leucocitos por campo). Si esto no se cumple, se empleará un factor de corrección (FC) cuyo resultado nos indicará el número de campos microscópicos a observar antes de considerar un error de diagnóstico:

Calidad técnica de una buena muestra.

Tamaño de la muestra:

De la gota gruesa:

- Ubicación: 1 a 1,5 cm. del tercio externo de la lámina
- Tamaño: 1 cm de lado ó 1 cm de diámetro
- Calidad: 10 a 20 leucocitos por campo

Del frotis:

- Tamaño: 3 cm
- Ubicación: Del centro al borde externo de la lámina
- Extendido: Fino, con cabeza cuerpo y cola
- Identificación: Legible (fecha y número).

Coloración.-

Deshemoglobinización

- Fondo libre de glóbulos rojos.

Tonalidad

- Coloración del parásito:
- Núcleo: rojo grosella
- Citoplasma: azul cielo.
- Pigmento: amarillo sin brillo.
- Coloración de leucocitos:
- Linfocitos: Citoplasma basófilo azul cielo
- Núcleo: azul oscuro.
- Gránulos inespecíficos: rojo o azul.
- Monocitos: Citoplasma gris.
- Núcleo: azul tenue
- Neutrofilo: Citoplasma rosado.
- Núcleo: púrpura.
- Eosinófilos: Citoplasma rosado.
- Gránulos gruesos, rojo salmón.
- Basófilos: citoplasma y núcleo color azul.
- Granulaciones burdas. (grueso)

Precipitado

- Ausencia de precipitado de colorante

Calidad diagnóstica

Sensibilidad =	Negativo o Positivo
Especificidad =	<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i>
Densidad Parasitaria =	Menos de +/2, +/2, +, ++, +++, +++++

Errores más comunes:

Falso negativo (P/N).

Falso positivo (N/P).

Error de especie.

No existe error por densidad

La concordancia se calificará según la siguiente escala:

Escala de calificación:

La evaluación sobre la calidad técnica de la preparación se calificará de forma sugestiva como Bueno, Regular, Malo.

Técnica:

Bueno.....	80% - 100%
Regular.....	70% - 79%
Deficiente.....	Menos de 70%

Concordancia:

Bueno.....	98% - 100%
Regular.....	95% - 97 %
Deficiente.....	Menos de 95 %

El 2% es el porcentaje máximo de tolerancia para discordancia, cuando sea mayor hay que realizar supervisión directa para determinar las causas y corregirlas.

8.2.3. Auditoria

Examen sistemático e independiente para comprobar si las normas y procedimientos en vigor se están aplicando según los requisitos preestablecidos en todas las etapas de las cuales depende la confiabilidad de los resultados liberados

- = Control de conformidad y de coherencia
- = Concordancia entre teórico y práctico

8.3 Supervisión

Es un proceso educativo y motivador recíproco, permanente, regulador y planificado, que permite desarrollar los conocimientos y la capacidad del personal, crear aptitudes respecto al trabajo y contribuir a mantener la eficacia y eficiencia de una Red de Laboratorios organizados, para el diagnóstico microscópico de la malaria. El Manual de Procedimientos Operativos Estándar para el Diagnóstico de la Malaria constituirá la base para ejercer la supervisión de los laboratorios de la Red Nacional. La supervisión se aplicará en dos modalidades directa e indirecta.

8.3.1 Supervisión Directa

Es una evaluación formalizada efectuada por el nivel superior (Laboratorio Nacional a Laboratorios Zonales y estos a los puestos de diagnóstico y Laboratorios Locales). Este tipo de evaluación permite medir la adecuación del sistema de calidad con respecto a la política de calidad del Ministerio de Salud y a sus objetivos en la Red de puestos de diagnóstico y Laboratorios. Es una forma de observación directa del desempeño por medio de visitas programadas y periódicas al personal de los laboratorios de la Red para observar directamente las condiciones de trabajo, así como los procedimientos técnicos y administrativos. Por el contacto personal, es efectiva y rápida, ya que nos permite tomar decisiones oportunas. Durante la supervisión directa se realizan entrevistas al personal encargado de procesar muestras de pacientes sospechosos de Malaria (Microbiólogos, Técnicos de Laboratorio, Microscopistas.) para conocer directamente las condiciones de trabajo, procedimientos técnicos administrativos, control de calidad, así como los problemas que se presentan en los puestos de diagnóstico y laboratorios, para recomendar soluciones apropiadas de acuerdo a los recursos locales. Se observarán los siguientes aspectos incluidos en el Anexo... formulario CC-3

Comentarios y Sugerencias

En esta sección se describen diferentes aspectos no contemplados en las secciones anteriores.

Al finalizar la supervisión se debe realizar una reunión informativa para discutir la situación encontrada, hacer las sugerencias necesarias y las recomendaciones. Posteriormente se debe elaborar un informe escrito, breve y concreto con los compromisos adquiridos tanto del personal local como del nivel zonal y nacional. El laboratorio nacional conjuntamente con el local o zonal deberá diseñar un plan de intervención y cronograma para periodos de 4 meses.

8.3.2 Supervisión Indirecta

Se ejercerá a través de la revisión y análisis de los resultados del laboratorio en los respectivos formularios del sistema de información (OC-19, E-1, E-2). El nivel nacional analizará la información proveniente de los niveles zonales y estos a su vez serán responsables de analizar la información de los niveles locales. Como resultado de la supervisión indirecta, se dictarán recomendaciones y se podrá tomar decisiones tendientes a corregir los errores detectados.

8.4 Control de Calidad

El control de calidad del diagnóstico microscópico de la malaria ejecutado por la red de laboratorios se efectúa bajo las modalidades de 1) Revisión de láminas diagnosticadas y 2) Evaluación externa del desempeño.

8.4.1 Control de calidad mediante revisión de láminas diagnosticadas

Este control de calidad se realiza a través de 1) revisión por parte del nivel zonal de las láminas diagnosticadas y entregadas semanalmente por el nivel local, y 2) revisión por parte del nivel central de las láminas revisadas por el nivel zonal, que resulten discordantes.

8.4.2 Control de calidad semanal

El personal responsable de cada unidad de diagnóstico local, debe enviar semanalmente al nivel zonal el 100% de las láminas positivas y negativas. El envío debe realizarse en los primeros dos días de la semana siguiente. Las láminas solamente deben estar identificadas con su código, no deben contener el resultado del diagnóstico, y la papelería acompañante (Formulario OC-19, E-1, E-2) debe contener la información completa. La documentación y las láminas deben dirigirse al departamento de epidemiología zonal, quien entregara las laminas al microscopista revisor zonal reteniendo el formulario E-1, después de realizado el Control de Calidad.

Evaluación técnica o concordancia del diagnóstico microscópico.

La concordancia se estima preparando cuadros 2 x 2 para cada persona responsable del diagnóstico microscópico (Microbiólogo, Microscopista, Técnico de Laboratorio. Se estiman los siguientes valores: porcentaje de falsos positivos (% FP), porcentaje de falsos negativos (% FN), valor predictivo positivo (VPP), y valor predictivo negativo (VPN). A continuación se presenta un ejemplo de un microscopista que envió 210 láminas (110 láminas positivas y 100 láminas negativas).

Estándar de oro (Revisor)

		+	-
Láminas	+	100 (a)	10 (b)
(Microscopista)	-	30 (c)	70 (d)

% FP: $b \div (a + b) \times 100 = 9\%$

(a) Verdadero positivo; (b) Falso positivo;

% FN: $c \div (c + d) \times 100 = 30\%$

(c) Falso negativo; (d) Verdadero negativo

VPP: $a \div (a + b) \times 100 = 91\%$

VPN: $d \div (c + d) \times 100 = 70\%$

Para interpretar los resultados, se debe tomar en cuenta que las láminas revisadas no representan la población de todas las láminas sino solamente 100% de láminas positivas y 10% de láminas negativas. Por lo tanto, el VPP y VPN tendrán sentido solamente para los datos verdaderos del personal que realiza el diagnóstico. La verdadera sensibilidad y especificidad son determinadas solo si la proporción de láminas positivas a negativas representa la población de todas las láminas.

8.5 Evaluación externa del desempeño

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 tiene la responsabilidad de preparar paneles de láminas de calidad óptima y resultados conocidos para evaluar la capacidad diagnóstica de las unidades zonales y locales, y

asistir en la diferenciación de las causas de error en el diagnóstico microscópico (toma de muestra, coloración, microscopio, personal). El Laboratorio Nacional será objeto a su vez de un control de calidad externo realizado por un laboratorio internacional reconocido para tal fin.

Es un sistema de comparación retrospectivo, periódico y objetivo de los resultados de diferentes PDM por medio de encuestas organizadas por un ente externo independiente. Se realiza un control externo de los resultados emitidos y se caracteriza por:

- a) Identificar las capacidades del PDM,
- b) Asegurar su integración a la red,
- c) Aplica metodología estandarizada,
- d) Promover la capacitación,
- e) Tomar medidas correctivas

La Evaluación Externa del Desempeño (EED) se puede realizar según dos modalidades complementarias. La primera, con el envío de muestras (o cepas) codificadas del nivel central o zonal a los PDM periféricos; la segunda con el control retrospectivo a nivel central o zonal de un porcentaje a determinar de muestras (o cepas) procedentes de la red.

La EED se realizará en todos los niveles de la red de laboratorios. Compete esencialmente al laboratorio nacional de referencia (LNR) la elaboración de los paneles el envío y análisis de resultados. El LNR será objeto a su vez de un control de calidad externo realizado por laboratorio internacional.

Los laboratorios zonales (LZ) apoyarán al LNR en la distribución de material (Paneles de láminas, etc.) hacia los otros niveles y el flujo de información hacia el nivel nacional. Además podrán implementar directamente un plan de EED con los laboratorios de su área de influencia bajo la metodología establecida a nivel nacional, con muestras certificadas por el LNR.

8.5.1 Preparación y envío de los paneles de láminas

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

1. Se incluirán láminas con preparaciones de gota gruesa y frotis.
2. El número de láminas por panel deberá ser de 10 a 20. Deben elaborarse grupos de paneles uniformes entre sí respecto a las características de las láminas (especie, parasitemia), de forma que la evaluación sea comparable cuando se usen paneles del mismo tipo para evaluar a microscopistas.
3. Las láminas deben incluir especies presentes en la región y diagnósticos diferenciales, infecciones mixtas, diferentes densidades parasitarias y muestras negativas.
4. cada panel enviado llevara un formato donde responderá una serie de preguntas que corresponden a la evaluación del panel, por parte del puesto de diagnostico receptor.
5. El envío de los paneles cumplirá con las normas de bioseguridad.
6. El puesto de diagnostico o laboratorio realizara la lectura del panel durante la visita de supervisión directa.
7. Las laminas deberan tener lamina cubreobjetos.
8. Incluir una información clinica-epidemiologica de antecedentes del posible caso.

Análisis y retroalimentación

El LNR y el laboratorio intermedio (Provincial o zonal = LZ) analizará los resultados de evaluación con base en los siguientes criterios:

- Concordancia en resultado.
- Concordancia en especie.
- Concordancia en estadio.

La concordancia se calificará según la siguiente escala

Escala de calificación:

Concordancia:

Bueno.....	98% - 100%
Regular.....	95% - 97 %
Deficiente.....	Menos de 95 %

El 2% es el porcentaje máximo de tolerancia para discordancia, cuando sea mayor hay que realizar supervisión directa para determinar las causas y corregirlas.

El LNR deberá elaborar un informe para cada laboratorio con los resultados de la evaluación individual y global y recomendaciones.

Medidas correctivas

Aspectos a tener en cuenta para la priorización de intervenciones correctivas:

- errores en la identificación de la presencia o no de infección
- errores en la identificación de infecciones por *P. falciparum*
- errores en la diferenciación entre *P. vivax* y *P. falciparum*
- errores en la diferenciación de formas sexuales y asexuales

Qué hacer?

- Con base en el informe individual enviado por el LNR/LZ, las discrepancias identificadas serán analizadas y revisadas in situ por el mismo microscopista, disponiendo del panel de evaluación.
- El laboratorio discrepante documentará la medida correctiva correspondiente
- El LNR/LZ implementará plan de supervisión directa y capacitación que incluya los laboratorios con deficiencias , con base en :
 - Magnitud del error
 - Análisis cruzado de los resultados de la EED con los del control indirecto

8.5.2 Revisión de informe del panel de láminas

Los resultados de la observación microscópica del panel de láminas para cada unidad de diagnóstico se tabulan para estimar los siguientes valores: porcentaje de error en la identificación de 1) la presencia o no de infección por *Plasmodium* spp., 2) la especie, 3) los estadios y 4) la parasitemia. A continuación se presenta un ejemplo de un puesto de diagnóstico que fue evaluada con un panel de 10 láminas (8 láminas positivas y 2 lámina negativa).

Cuadro No. 7 Ejemplo Revisión del informe de la lectura de un panel de láminas

Resultado	Presencia o ausencia de infección por <i>Plasmodium</i> spp.	Láminas positivas		
		Especie	Estadios	Parasitemia
Correcto	10	6	4	6
Incorrecto	0	2	4	2
Total	10	8	8	8

Indicadores

% error presencia de infección: número de respuestas incorrectas / total de láminas por cien (100) = $(0 / 10) \times 100 = 0\%$

% error identificación de especie: número de respuestas incorrectas / total de láminas positivas por cien (100) = $(2 / 8) \times 100 = 25\%$

% error identificación de estadio: número de respuestas incorrectas / total de láminas positivas por cien (100) = $(4 / 8) \times 100 = 50\%$

% error estimación de parasitemia: número de respuestas incorrectas / total de láminas positivas por cien (100) = $(2/8) \times 100 = 25\%$

8.6 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 Malaria administrará una base de datos para cada unidad de diagnóstico para automatizar el manejo de la información y deberá elaborar informes periódicos trimestrales con los resultados de la evaluación individual y global así como las recomendaciones.

La concordancia cualitativa (positividad, identificación de especie, estadios) es más importante que la concordancia cuantitativa (parasitemia). La diferenciación de especie es muy importante porque significa diferentes actividades de seguimiento.

Se establecen los siguientes estándares de comparación para aceptación de error en el diagnóstico microscópico:

Estándar de la calidad técnica de las muestras

% error identificación de la muestra:	$\leq 5\%$
% error tamaño de la muestra:	$\leq 5\%$
% error ubicación de la muestra:	$\leq 5\%$
% error grosor de la muestra:	$\leq 5\%$
% error deshemoglobinización de la muestra:	$\leq 5\%$
% error tonalidad de la coloración:	$\leq 5\%$
% de muestras con precipitado:	$\leq 5\%$
% de muestras que no se pueden diagnosticar	$\leq 5\%$

Estándares de concordancia del diagnóstico

% FP:	$< 1\%$
% FN:	$\leq 5\%$
VPP:	$> 99\%$
VPN:	$\geq 95\%$

Estándar de concordancia para la evaluación externa del desempeño

% error presencia de infección:	< 5%
% error identificación de especie:	< 1%
% error identificación de estadio:	< 1%
% error estimación de parasitemia:	< 10%

Siempre se debe considerar el valor de los resultados falsos positivos y falsos negativos desde el punto de vista tanto del paciente, como del Programa Nacional de Prevención y Control.

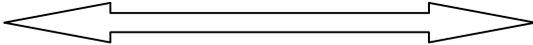
Al final de todo este proceso del análisis del control de calidad se deben de realizar medidas correctivas diseñadas a través de un plan de intervención que tomará en cuenta la gravedad del problema y la repetición de los errores. Se establecerá un tiempo para que los criterios sean alcanzados por el personal de las unidades de diagnóstico estableciendo incrementos anuales. El plan comprende entre otros, supervisión estricta, readiestramiento y cambio de insumos y equipo.

CAPITULO IX. LINEAMIENTOS PARA DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO OPORTUNO DE LA MALARIA:

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 posibilidad de transmisión. Como resultado de un diagnóstico rápido y reducción de la transmisión a través de intervenciones oportunas, se puede alcanzar una mejor detección y control de brotes. Adicionalmente, el contar con un diagnóstico rápido y preciso permitirá que los antimaláricos no sean entregados a los pacientes hasta la confirmación por laboratorio. Esto optimizará su uso, reduciendo el costo por drogas y minimizando el riesgo de desarrollar malaria resistente.

Para realizar las actividades que permitan alcanzar un diagnóstico rápido y preciso, se debe tomar en cuenta que existen factores que favorecen el tratamiento antes del diagnóstico y otros que favorecen el diagnóstico antes del tratamiento (ver Figura No. 14). La situación ideal es proveer un diagnóstico antes del tratamiento para que el tratamiento sea oportuno y adecuado. Sin embargo, esto no siempre es posible. Se debe evaluar la situación de cada comunidad y que estrategia se debe implementar para dirigirse hacia el diagnóstico antes del tratamiento. Cuando la transmisión ha disminuido y el diagnóstico ha sido mejorado, la tendencia debe ser de izquierda a derecha. Sin embargo, si ocurrieran eventos no esperados (por ejemplo, conflictos sociales, desastres naturales), la estrategia puede volver a moverse de la derecha hacia la izquierda.

Figura No. 14. Factores que influyen en la oportunidad del tratamiento.

TRATAMIENTO ANTES DEL DIAGNOSTICO	DIAGNOSTICO ANTES DEL TRATAMIENTO
	
Diagnóstico retardado (> 1 semana) Alto Índice de Láminas Positivas (ILP) Baja probabilidad de resistencia Muchos casos de <i>P. falciparum</i> Drogas seguras, baratas, efectivas	Diagnóstico rápido (3-5 días) Bajo ILP (muchos casos de fiebre no debido a malaria) Alta Probabilidad de resistencia Pocos casos de <i>P. falciparum</i> Drogas caras y tóxicas

Para la ejecución de un diagnóstico rápido y tratamiento oportuno de la malaria se deben ejecutar una serie de tareas de tres actividades fundamentales: 1) Capacitación, 2) Supervisión y 3) Participación comunitaria. A continuación se describen las tareas principales en cada actividad.

9.1 Capacitación de la Red zonal de Microscopistas y Técnicos de Laboratorio que ejecutan el diagnóstico de la malaria

1. Utilizar el Manual de Procedimientos Operativos Estándar para el Diagnóstico de la Malaria para capacitar a la Red de Microscopistas y Técnicos de Laboratorio Clínico en la preparación de muestras, identificación, coloración, almacenamiento de las láminas, sistema de información y control de calidad.
2. Utilizar el Manual para capacitar en diagnóstico microscópico de malaria y supervisión de la Red de Microscopistas y Técnicos de Laboratorio Clínico.
3. Utilizar el Manual para capacitar a la Red de Microscopistas y Técnicos de Laboratorio Clínico en el mantenimiento preventivo de los microscopios.
4. El responsable de estas tareas es el personal de revisores zonales y supervisores nacionales.

9.2 Supervisión de la Red de puestos de Diagnóstico, Laboratorios y control de calidad

1. Supervisar cada cuatrimestre a todas las unidades de diagnóstico locales, de acuerdo a los lineamientos de supervisión descritos en el Manual, incluyendo la actualización de la base de datos de la Red de Laboratorios. El responsable de esta tarea es el personal del Laboratorio Nacional.
2. Supervisar cada cuatrimestre a todas las unidades de diagnóstico locales, de acuerdo a los lineamientos de supervisión descritos en el Manual POE, incluyendo la presentación de un informe al Laboratorio Nacional. El responsable de esta tarea es el personal de los laboratorios de diagnóstico zonales.
3. Realizar las acciones necesarias (readiestramiento, supervisión estricta, cambio de microscopio, etc.) de acuerdo a los resultados de la supervisión cuatrimestral

y del control de calidad fundamentado en los criterios establecidos de aceptación de error. Los responsables de esta tarea es el personal de las unidades de diagnóstico zonales y laboratorio central.

9.3 Participación comunitaria

1. El personal de los puestos de diagnóstico y unidades de salud que tomen muestras a pacientes, deben utilizar el sistema de identificación de láminas para distinguir láminas iniciales de aquellas de seguimiento o control, para lo cual el formulario OC-19 .
2. El personal que realiza diagnóstico microscópico en coordinación con Col-Vol debe notificar a los líderes comunitarios y a los Auxiliares de evaluación, en las localidades que cuentan con este recurso, sobre los casos nuevos de malaria para que se ejecuten actividades de promoción de la salud y control vectorial.
3. El auxiliar de evaluación debe realizar visita domiciliar y notificar los resultados del diagnóstico microscópico a los pacientes positivos. En la visita domiciliar, debe supervisar y promover la adherencia al tratamiento, y completar el tratamiento según los resultados del examen microscópico. Además debe solicitarles a los pacientes que se presenten al centro de diagnóstico más cercano en cualquier momento que presenten de nuevo síntomas, especialmente fiebre, dentro de los primeros 28 días a partir del inicio del tratamiento, se debe citar al paciente para tomarle una muestra de seguimiento el día 4 en caso de *P falciparum* y el día 8 en caso de *P vivax*, contado a partir del inicio del tratamiento.
4. El auxiliar de evaluación, y agentes locales de salud en coordinación con el Col-Vol, en las localidades que cuentan con este recurso, y los líderes comunitarios, deben rastrear los contactos de los casos positivos entre miembros de la familia y vecinos del caso positivo durante la primera visita de seguimiento. Durante el rastreo se debe preguntar por síntomas, especialmente fiebre (o historia de fiebre en los 28 días pasados), tomar muestras para diagnóstico rápido y administrar tratamiento, además muestras para diagnóstico microscópico.

CAPITULO X. LIMPIEZA Y ALMACENAMIENTO DE LAS LÁMINAS PORTAOBJETOS

Las láminas portaobjetos son suministrados en cajas. Aunque en la caja se describan como “lavadas” o “pre-limpiadas”, las láminas deben ser lavadas adecuadamente, secadas y envueltas. No es posible hacer gotas gruesas o frotis de buena calidad sobre láminas sucias. Las muestras que se preparan sobre láminas sucias o grasosas, se desprenderán fácilmente durante la coloración. Por lo tanto, no se deben utilizar láminas que tengan una sombra iridiscente o que aparecen opacas, que no estén limpias o que estén viejas, con rayones en su superficie o bordes astillados. Para limpiar las láminas portaobjetos se necesita: 1) un recipiente grande de material plástico, 2) gasa, 3) detergente de buena calidad en polvo o líquido, 4) dos a cuatro retazos de tela de algodón seca, limpia y que no forme pelusa, 5) agua limpia, 6) alcohol, 7) aplicar normas de bioseguridad.

Láminas nuevas. Todas las láminas nuevas deben lavarse con detergente y agua limpia. Después de ser puestas en remojo por un período de 30-60 minutos, las

láminas deben ser lavadas bajo agua corriente o en varios cambios de agua limpia, y luego sumergirlas en un recipiente que contenga alcohol por el lapso de 2 a 3 minutos. Cada lámina debe ser secada y pulida individualmente con un retazo de tela seca, limpia y que no forme pelusa. Las láminas limpias solamente deben manejarse tocándolas de los bordes para evitar que se deposite sucio o grasa en su superficie. Este procedimiento es de responsabilidad de cada microscopista.

Láminas usadas. Se recomienda no reutilizar las láminas, pero en el caso de desabastecimiento se procederá de la siguiente manera: Para lavarlas se deben sumergir por uno o dos días en agua con detergente. Cuando sea posible se debe utilizar agua caliente. Después deben limpiarse uno por uno con una tela. Se deben remover todos los restos de muestra, colorante y aceite de inmersión. No se deben dejar las láminas en detergente por más del tiempo indicado. Si el agua se evapora, el detergente se deposita en la superficie de las láminas y es casi imposible removerlo. Después de limpiadas, las láminas deben colocarse en una solución nueva de agua y detergente y después de una hora ser lavadas bajo agua corriente o varios cambios de agua limpia, y luego colocadas en un recipiente que contenga alcohol por 2 a 3 minutos. Cada lámina debe ser secada y pulida individualmente como descrito arriba. Las láminas que se clasifiquen inapropiadas (rayadas, opacas, bordes astillados), deben descartarse. Este procedimiento podrá ser realizado hasta por 2 ocasiones siendo de responsabilidad del microscopista.

Almacenamiento de las láminas. Para almacenar correctamente las láminas se necesita:

1. hojas de papel copia tamaño A4
2. cajas de láminas vacías
3. bandas elásticas o cinta adhesiva

Las láminas limpias deben empacarse en paquetes de 10 láminas envueltas en papel copia. Cada paquete puede asegurarse con bandas elásticas o cinta adhesiva. Los paquetes pueden colocarse en las cajas de láminas para ser enviados al campo. Las láminas deben almacenarse en lugares secos. Si se almacenan en lugares calientes y húmedos, las láminas se pegaran entre ellas después de unas semanas y solo será posible separarlas si se lavan nuevamente y son secadas.

CAPITULO XI. EL MICROSCOPIO

11.1 Introducción:

En su afán de llegar siempre más lejos en la investigación de la naturaleza, el hombre ha construido múltiples instrumentos que le han permitido acceder allí donde los sentidos no podían penetrar. Así como el telescopio abrió a la humanidad las puertas de lo infinitamente grande, el microscopio hizo posible conocer los mundos de dimensiones ínfimas, entre ellos la célula, base de la vida.

El microscopio es un instrumento óptico y mecánico que aumenta la imagen de pequeños detalles de una muestra, que a simple vista no se percibirían.

11.2 Partes del microscopio

El microscopio es un instrumento esencial para el diagnóstico de la malaria. Se requiere conocer a fondo sus diferentes sistemas y partes, con el fin de brindarle un mantenimiento adecuado, prevenir daños y para evitar el crecimiento de hongos que pueden afectar sus lentes.

El microscopio está formado por componentes que pertenecen a cuatro diferentes sistemas:

- Sistema mecánico (pie, brazo, revolver, platina mecánica)
- Sistema óptico (objetivo, ocular)
- Sistema de iluminación (condensador con diafragma, fuente de luz, filtros)
- Sistema de ajuste (tornillo macrométrico, tornillo micrométrico, tornillos de ajuste del condensador).

Las partes de un microscopio compuesto se ilustran en la Figura No. 15



11.2.1 EL SISTEMA MECÁNICO:

11.2.1.1 La base: es la parte sobre la que se apoya el microscopio y tiene por lo general forma rectangular.

11.2.1.2 Base de oculares/Cuerpo: está ennegrecido internamente para evitar las molestias que ocasionan los reflejos de la luz. Por dentro se encuentran los prismas y en su extremidad superior se colocan los oculares.

11.2.1.3 El Brazo: Es una pieza colocada en la parte posterior del aparato. Sostiene al Cuerpo en su porción superior y por el extremo inferior se adapta a la Base.

11.2.1.4 Revólver: Componente móvil en el que van atornillados los objetivos.

11.2.1.5 Platina: Es una pieza metálica plana en la que se coloca la preparación u objeto que se va a observar. Presenta un orificio en el centro que permite el paso de los rayos

luminosos a la preparación, provenientes del condensador. La platina puede ser fija, en cuyo caso permanece inmóvil; en otros casos puede ser giratoria, es decir, mediante tornillos laterales puede centrarse o producir movimientos circulares.

11.2.1.6 Carro: Es un dispositivo colocado sobre la platina que permite deslizar la lámina porta objeto con la muestra, de delante hacia atrás y, de derecha a izquierda o viceversa. Fijada al carro está la pinza, que asegura la lámina portaobjetos.

11.2.2 SISTEMA DE AJUSTE:

11.2.2.1 Tornillo macrométrico: Está ubicado a ambos lados del microscopio. Girando éste tornillo, asciende o desciende la platina gracias a una cremallera. Estos movimientos largos permiten el enfoque rápido de la preparación.

11.2.2.2 Tornillo micrométrico: Está ubicado a ambos lados del microscopio. Girando éste tornillo, asciende o desciende la platina mediante un movimiento casi imperceptible, logrando un enfoque exacto y nítido de la muestra.

11.2.3 EL SISTEMA ÓPTICO:

El sistema óptico es el encargado de reproducir y aumentar las imágenes mediante el conjunto de lentes que lo componen. Está formado por los oculares y los objetivos.

11.2.3.1 Oculares: Son dos tubos ubicados en la parte superior y contienen en su interior dos lentes cada uno. Los oculares generalmente más utilizados son los de 8X y 10X. A través de ellos puede hacerse contacto visual hasta los objetivos.

11.2.3.2 Objetivos: Los objetivos nos permiten aumentar las imágenes de los objetos a observar y, por tanto, se hallan cerca de la preparación que se examina. Los objetivos van atornillados al revólver y sirven para el contacto visual hasta la muestra.

Los objetivos utilizados comúnmente son de dos tipos: objetivos secos y objetivos de inmersión.

11.2.3.2.1 Los objetivos secos se utilizan sin necesidad de colocar sustancia alguna entre ellos y la muestra. El número de objetivos varía con el tipo de microscopio y el uso a que se destina. Los aumentos de los objetivos secos más frecuentemente utilizados son: 4X, 10X y 40X.

11.2.3.2.2 El objetivo de inmersión está compuesto por un complicado sistema de lentes. Para observar a través de éste objetivo es necesario colocar una gota de aceite de inmersión entre el objetivo y la muestra, de manera que la lente frontal entre en contacto con el aceite. Generalmente, estos objetivos tienen un aumento de 100X y se distinguen por uno o dos círculos o anillos de color negro y blanco que rodea su extremo inferior.

La X se utiliza para expresar en forma abreviada los aumentos de las lentes.

11.2.4 COMPONENTE DE ILUMINACIÓN Y SU FUNCIÓN:

Este sistema tiene como finalidad dirigir la luz natural o artificial de tal manera que ilumine la preparación u objeto que se va a observar en el microscopio.

Comprende los siguientes elementos:

11.2.4.1 Condensador: El condensador está formado por un sistema de lentes, cuya finalidad es concentrar los rayos luminosos provenientes de la fuente de luz, sobre el plano de la muestra. El condensador se halla debajo de la platina y puede deslizarse sobre un sistema de cremallera mediante un tornillo que determina su movimiento ascendente o descendente.

11.2.4.2 Diafragma: Generalmente, el condensador está provisto de un diafragma-iris, que regula su abertura y controla la calidad de luz que debe pasar a través del condensador. Está ubicado dentro de la pieza que contiene el condensador y posee unas láminas que al cerrarse estrechan el rayo de luz y al abrirse lo amplían.

11.2.4.3 El Espejo: Tiene dos caras: una cóncava y otra plana. Goza de movimientos en todas las direcciones. La cara plana se emplea de preferencia con iluminación artificial, y la cóncava, para iluminación natural (luz solar). Modernamente se prescinde del espejo en la fabricación de microscopios, ya que éstos traen incorporada una bombilla eléctrica halógena colocada en el eje del microscopio. Aunque esta pieza es importante en zonas donde no se cuenta con energía eléctrica y es necesario utilizar la luz natural (solar).

Si se usa como fuente luz artificial una bombilla incandescente, la luz se debe hacer pasar por un filtro azul o preparar la "solución luz del día" para disminuir la entrada directa de los rayos de luz.

11.3 TRAYECTORIA DEL RAYO DE LUZ A TRAVÉS DEL MICROSCOPIO:

El haz luminoso procedente bombilla halógena o del espejo, pasa directamente a través del diafragma al condensador. Gracias al sistema de lentes que posee el condensador, la luz es concentrada sobre la muestra a observar. El haz de luz penetra en el objetivo y sigue por el tubo hasta llegar el ocular, donde es captado por el ojo del observador.

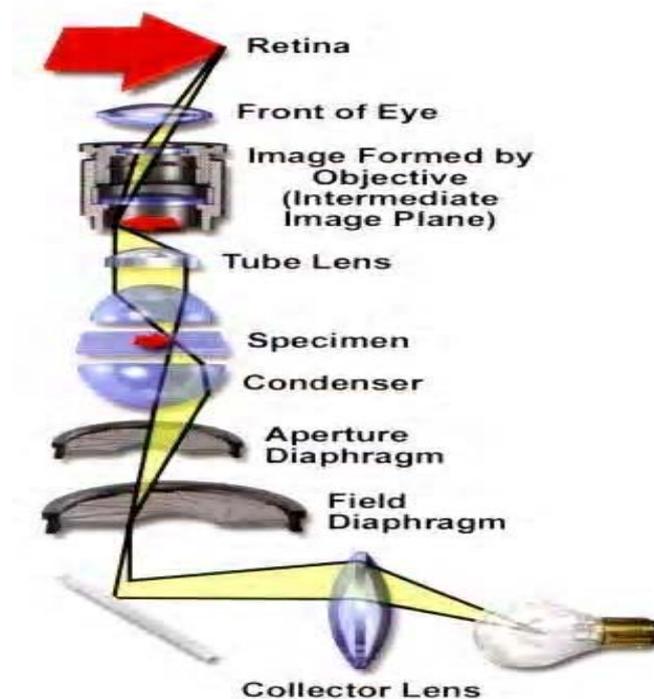


Figura No. 16. Esquema de la trayectoria del rayo de luz en el microscopio

11.4 PROPIEDADES DEL MICROSCOPIO

11.4.1 Poder separador

También llamado a veces poder de resolución, es una cualidad del microscopio, y se define como la distancia mínima entre dos puntos próximos que pueden verse separados. El ojo normal no puede ver separados dos puntos cuando su distancia es menor a una décima de milímetro.

En el microscopio óptico, el poder separador máximo conseguido es de 2 décimas de micra, y en el microscopio electrónico, el poder separador llega hasta 10 ángstrom.

11.4.2 Poder de definición

Se refiere a la nitidez de las imágenes obtenidas, sobre todo respecto a sus contornos. Esta propiedad depende de la calidad y de la corrección de las aberraciones de las lentes utilizadas.

11.4.3 Aumento del microscopio

En términos generales se define como la relación entre el diámetro aparente de la imagen y el diámetro o longitud del objeto. Esto quiere decir que si el microscopio aumenta 100 diámetros un objeto, la imagen que estamos viendo es 100 veces mayor que el tamaño real del objeto. Para calcular el aumento de un microscopio, basta multiplicar el aumento del ocular por el aumento del objetivo.

Por ejemplo, si estamos utilizando un ocular de 10X y un objetivo de 100X, el aumento a que estamos viendo la preparación será: $10X \times 100X = 1000X$, lo cual quiere decir que la imagen del objeto está ampliada 1000 veces.

11.5 Campo del Microscopio:

Se denomina "campo del microscopio" al círculo visible que se observa a través del microscopio. También podemos definirlo como la porción del plano visible observado a través del microscopio.

Si el aumento es mayor, el campo disminuye, lo cual quiere decir que el campo es inversamente proporcional al aumento del microscopio.

11.6 Uso del Microscopio:

Es importante aprender como se usa apropiadamente el microscopio, comprender sus limitaciones y conocer las medidas que se deben tomar para mantenerlo en buenas condiciones. Se necesita conocer el nombre de las partes del microscopio para poder seguir instrucciones durante las capacitaciones y visitas de supervisión, así como para describir aquellas partes que necesitan revisión o reemplazo.

Una combinación de lentes existentes en un ocular 10X y un objetivo 100X, para un aumento total de 1000 veces, es la norma a la que se ajustan los microscopios compuestos clásicos.

Todos los microscopios tienen incorporada una combinación de condensador y diafragma con los que se logra la intensidad luminosa óptima. Para una buena microscopía es necesario contar con una iluminación regulable.

11.6.1 Enfoque interpupilar

El espacio entre los ojos es variable para cada persona. Por lo tanto, es necesario ajustar los oculares a la correspondiente distancia interpupilar para observar, con ambos ojos y a través de ambos oculares, un solo campo microscópico.

Instrucciones: encienda el microscopio a una intensidad de iluminación comfortable. Observe a través de ambos oculares. Observará un campo luminoso con el ojo izquierdo y otro con el ojo derecho. Para lograr la distancia interpupilar correcta, continúe observando el campo a través de un ocular mientras acerca o separa los oculares, ya sea utilizando la rosca entre ambos o tomando los oculares con ambas manos y presionando para juntarlos o separarlos. Cuando la imagen del ojo izquierdo y la imagen del ojo derecho se juntan en una sola imagen y se observa un solo campo luminoso con ambos ojos, se ha encontrado la distancia interpupilar correcta.

11.6.2 Enfoque ocular

Es necesario ajustar los oculares a cada ojo para poder observar una imagen nítida. Instrucciones: Enfoque la muestra con el micrométrico lo más claro posible, observando con ambos ojos. Coloque una tarjeta enfrente del ojo izquierdo y enfoque nuevamente lo más claro posible, haciendo girar suavemente el tornillo macrométrico o micrométrico. Cuando se logra esto, coloque la tarjeta cubriendo el ojo derecho. Ya no toque el macrométrico ni el micrométrico. Para enfocar la imagen, gire la rosca del ocular izquierdo hasta que observe nítidamente el objeto enfocado. Ahora los oculares ya están ajustados a cada ojo, asegurando así una observación clara evitando esfuerzo innecesario y cansancio.

11.6.3 Iluminación

La mejor iluminación ofrece el mejor contraste. Instrucciones: encienda el microscopio y abra a su máxima apertura el diafragma de campo y el diafragma del condensador. Ajuste la luz a una intensidad comfortable y enfoque la muestra. Observando por los oculares, disminuya la apertura del diafragma de campo hasta una pequeña luz. Si esta luz no está centrada en el campo microscópico, quiere decir que el condensador no está centrado. Utilizando ambos tornillos del condensador, gírelos despacio y alternativamente hasta colocar la luz en el centro del campo. A continuación, abra despacio el diafragma de campo hasta que la luz apenas desaparezca del campo visual. Ahora se debe ajustar el diafragma del condensador. Para ello, retire con cuidado el ocular izquierdo, vea a través del orificio y observe la imagen que se forma al cerrar despacio el diafragma del condensador. Debe obtener una imagen clara y con buen contraste, y la luz debe estar centrada en el campo microscópico. Coloque el ocular izquierdo en su lugar. Ya puede trabajar con el microscopio alineado y debidamente iluminado.

11.7 CUIDADOS DEL MICROSCOPIO

- El microscopio mientras no se utiliza debe estar protegido (forro protector de tela) del polvo, humedad y otros agentes que pudieran dañarlo. Debe colocarse en un sitio seco y ventilado, sobre una superficie limpia y libre de vibraciones.
- Para proteger el microscopio de la proliferación de hongos especialmente en zonas de clima cálido húmedo. Se debe guardar en un cuarto con aire acondicionado o con deshumidificación permanente colocando en la caja del microscopio una bombilla de 15w que quede constantemente encendida, o

conectando varias bombillas de 15 o 25w que queden constantemente encendidas en un armario cuyas puertas cierren bien.

- Debe contar con un estuche o caja transportadora, el cual debe ser liviano, impermeable y de material resistente (plástico u otro que brinde protección a golpes y vibraciones) con compartimientos internos para lentes y accesorios y cierre de seguridad con ajuste al cuerpo del equipo.
- Para mover el microscopio de un sitio a otro, deben usarse las dos manos: con una se toma el microscopio por el brazo y con la otra se soporta por su base. Si se va a transportar entre dos sitios distantes, siempre debe usarse su caja transportadora o el estuche original, en el cual viene empacado.



Figura No. 17. Caja transportadora para Microscopios

- El maquillaje ocasiona una película aceitosa en las lentes de los oculares, por esta razón, se acostumbra a limpiar los oculares regularmente con papel de lente, igual que el objetivo de inmersión luego de examinar.
- El objetivo de inmersión, el cual debe limpiarse todos los días, puede presentar problemas por el exceso de aceite, para esto se debe limpiar con una mezcla que consiste en 30% de éter y 70% de alcohol etílico, realizar secado perfecto inmediatamente con una tela que no suelte hilacha.
- La limpieza de las partes ópticas requiere precauciones especiales. Para ello debe emplearse papel "lente" que expenden las casas distribuidoras de material de laboratorio. Nunca deben tocarse las lentes del ocular, objetivo y condensador con los dedos; las huellas digitales perjudican la visibilidad, y cuando se secan resulta trabajoso eliminarlas.

- Las partes mecánicas deben limpiarse con un paño suave; en algunos casos, éste se puede humedecer con xilol para desprender ciertas manchas de grasa, aceite de cedro, parafina, etc. que hayan caído sobre las citadas partes.
- Después de trabajar, se baja la intensidad de la luz del microscopio antes de apagarlo; se deja el microscopio en el objetivo de menor aumento, se centra el carro, y se desconecta el microscopio directamente del tomacorriente la superficies externas del microscopio se pueden limpiar con productos para limpiar computadores.
- Debe elaborarse un plan de mantenimiento (preventivo y correctivo) una o dos veces al año.
- No se deben dejar abiertos los portales. Si es necesario retirar los objetivos se debe utilizar la tapa o una cinta selladora para cerrar la abertura.
- No debe recibir los rayos solares, porque se puede condensar el agua en las lentes lo cual facilita el crecimiento de hongos. El microscopio debe permanecer con su respectivo forro cuando no se esté utilizando, para evitar que se acumule polvo en la superficie.
- No se deben fumar en el lugar donde se tiene ubicado el microscopio porque las lentes se cubren de una capa de material no combustible mezclados con restos de carbón lo cual impide una visualización nítida de los campos.
- No se deben intercambiar las lentes ni las piezas del microscopio.
- No se deben guardar los distintos oculares y objetivos sin antes haber colocado cada uno en un saco plástico herméticamente cerrado con una bolsita de gel de sílice autoindicador. Este gel es azul cuando está activo y cambia al rosado cuando ha absorbido toda el agua posible. El gel puede reactivarse por calentamiento y volverá a tomar el color azul.

GLOSARIO:

Agente biológico.- Todo organismo viviente capaz de causar infección, enfermedad o muerte en el ser humano con inclusión de los genéticamente modificados y endoparásitos humanos susceptibles de originar cualquier tipo de infección, alergia o toxicidad.

Antisépticos.- Agentes germicidas para ser usados sobre la piel y los tejidos vivos. Aunque algunos germicidas pueden ser utilizados como desinfectantes y antisépticos (alcohol 70-90%), su efectividad no es necesariamente la misma en cada caso, un buen antiséptico puede no ser eficaz como desinfectante y viceversa.

Antígeno.- Cualquier sustancia que, introducida en el organismo, induce a la producción de anticuerpos. Pueden penetrar en el organismo a través del tracto respiratorio, el tracto digestivo o la piel.

Anticuerpo.- Cualquiera de las moléculas proteicas que producen más células denominadas linfocitos, y cuyo papel principal es actuar como defensas contra la invasión de sustancias extrañas. Los anticuerpos, que son un componente importante del sistema inmunológico, es una fracción de la sangre llamada gammaglobulina.

Área contaminada.- Área donde se manipulan microorganismos de riesgo. Ejemplo: Laboratorios donde se manipulan virus, producción de antígenos, etc.

Área limpia.- Área del laboratorio donde no se manipulan microorganismos de riesgo. Ejemplo: donde se mantienen los medios de cultivos celulares, se preparan los medios de cultivo y a la vez se realiza la formulación de la vacuna.

Accidente de trabajo.- Ocurrencia durante las horas de trabajo que causa la inhabilitación temporal o permanente del trabajador.

Acción correctiva.- Procedimiento realizado para eliminar la causa de una disconformidad, defecto u otra situación no deseable y existente con el propósito de evitar que vuelva a suceder.

Acción preventiva.- Acción tomada para eliminar las causas de una disconformidad, defecto u otra situación potencial no deseada a fin de evitar que se produzca.

Anopheles: género de dípteros culícideo que comprende mosquitos caracterizados por poseer palpos largos y finos, casi tan largos como la trompa. Algunas especies transmiten el *Plasmodium*, agente de la malaria.

Bioseguridad.- Conjunto de medidas preventivas reconocidas internacionalmente orientadas a proteger la salud y la seguridad del personal y su entorno. Complementariamente se incluye normas contra riesgos producidos por agentes físicos, químicos y mecánicos.

Comensalismo.- En este tipo de asociaciones, uno de los seres vivos funciona como huésped sin recibir perjuicio ni beneficio, mientras que el otro asociado (comensal) se procura casa y sustento del huésped, ejemplo: Entamoeba Coli y el hombre, en donde la amiba es comensal y el hombre el huésped.

Desinfección.- Proceso que mediante el empleo de agentes (sobre todo químicos), es capaz de eliminar los microorganismos patógenos de un material. Generalmente se presentan efectos tóxicos sobre tejidos vivos, por lo que se emplea sólo sobre materiales inertes.

Descontaminación.- Es un pretratamiento necesario para la protección cuando se manipulará materiales potencialmente infectados. Se pueden emplear soluciones de hipoclorito de sodio al 0,5%, fenol al 5%, peróxido de hidrógeno al 6%, glutaraldehído, formaldehído, etc.

Desinfectante: agente químico utilizado para el proceso de desinfección.

Esterilización.- Proceso que mediante el empleo de agentes físicos o químicos produce la inactivación total de todas las formas de vida microbiana en forma irreversible (estado esporulado y vegetativo).

Hiperparasitismo.- Asociación biológica la cual un parásito infecta a otro parásito, ejemplo: fago y bacterias patógenas.

Infestación.- desde el punto de vista de la parasitología humana, este término se refiere a la presencia de artrópodos sobre la [piel](#) y anexas.

Infeción.- es la entrada, desarrollo y/o multiplicación de un agente

Inquilinismo.- Asociación entre dos seres vivos, en la cual uno (el inquilino) utiliza como morada las [estructuras](#) a cavidades del otro (el huésped) al que no le ofrece ninguna ventaja, cangrejo ermitaño y concha de caracol.

Incubación: mantenimiento de microorganismos en condiciones favorables para su crecimiento y reproducción.

Limpieza.- Es el proceso físico por el cual se elimina de los objetos en uso, las materias orgánicas y otros elementos sucios, mediante el lavado con agua con o sin detergente. El propósito de la limpieza no es destruir o matar los microorganismos que contaminan los objetos, sino eliminarlos por arrastre.

Microorganismo.- Toda entidad microbiológica, celular o no, capaz de reproducirse o de transferir material genético.

Muestra para diagnóstico.- Es el material de origen humano o animal consistente en excretas, secreciones, sangre y sus componentes, tejidos y líquidos tisulares enviados para diagnóstico. Se excluyen los animales vivos infectados.

Mutualismo.- Es la asociación biológica entre dos seres vivos en la que a los asociados se les denomina mutualista y ambos reciben beneficios sin que tengan dependencia necesaria para su existencia, ya que cada uno podría vivir sin la presencia del otro. Ejemplo: anémonas de mar y glifidodones.

Malaria: paludismo.

Paludismo: enfermedad infecciosa, febril, producida por protozoarios del género *Plasmodium*, que es transmitida por la picadura de mosquitos infectados del género *Anopheles*. La enfermedad se caracteriza por ataques de escalofríos, fiebre y sudoración.

Plasmodia: plural de *Plasmodium*.

Plasmodium: género de protozoarios plásmidos que comprende numerosas especies de parásitos de los glóbulos rojos del hombre y de diversos vertebrados. Tienen un alto grado de especialización parasitaria y su ciclo evolutivo es muy complejo. Son los agentes etiológicos del paludismo.

Parásito: todo organismo que vive a expensas de otro, causándole daño.

Peligro biológico.- Todo agente biológico y materiales que son potencialmente peligrosos para los seres humanos, animales o plantas.

Producto biológico.- Es una vacuna producida con microorganismos vivos o atenuados, componentes celulares, reactivos de diagnóstico o productos terapéuticos de naturaleza biológica destinados para uso humano o animal y fabricados según los requisitos estándares.

Pandemia.- Es una epidemia o endemia que abarca una extensión geográfica muy grande, varias naciones, todo un continente o más.

Paludismo autóctono o indígena.- Es el que presenta un sujeto que reside en una región malárica, causado por determinada/s especie/s y cepa/s de plasmodio/s allí existente/s, sin que en el tiempo inmediato anterior se haya desplazado a otras regiones malárica.

Paludismo importado.- Es el que presenta un sujeto en su lugar de residencia donde no existe paludismo, pero que en el tiempo inmediato anterior se ha trasladado temporariamente a una zona malárica. También cabe esta calificación a aquel que se hace presente en un sitio de residencia en un sujeto que vive en una zona malárica y se ha desplazado a otra zona malárica en el tiempo inmediato anterior, pero ahora causado por una especie de plasmodio que no existía en su zona de residencia.

Paludismo introducido.- En una región son casos derivados de un paludismo importado. Obviamente, en dicha región están dadas las condiciones necesarias para la existencia del paludismo, y existen los mosquitos receptivos del parásito, quienes se han infectado del caso introducido y lo han transmitido a los otros residentes. De persistir esta transmisión durante tres años, los casos introducidos pasan a ser considerados de paludismo autóctono o indígena de la región.

Paludismo inducido.- Son casos donde la transmisión ocurrió sin la participación del insecto, es decir, por transfusiones sanguíneas, uso de agujas hipodérmicas contaminadas o vía congénita.

Pigmento malárico.- Se conoce también con el nombre de Hematina o Hemazoina y se encuentra en una vacuola digestiva del Glóbulo Rojo parasitado. Son el producto de los desechos que deja el parásito al metabolizar la hemoglobina (proteína del glóbulo rojo, que contiene hierro, enzimas y otros nutrientes). Se presenta como gránulos finos y gruesos, coloreados del amarillo al café oscuro.

Recrudescencia.- Reparición de síntomas y parasitemia en un paciente que ha tenido un episodio previo de malaria, ocasionada por la persistencia de formas sanguíneas asexuales. Ocurre en todas las especies de Plasmodium dentro de los primeros 30 días siguientes al episodio inicial. Las causas más frecuentes son falla terapéutica y un tratamiento incompleto.

Recaída.- Reparición de síntomas y parasitemia en un paciente que ha tenido un episodio previo de malaria, ocasionada por la persistencia de formas latentes en hígado (hipnozoitos). Ocurre en Plasmodium vivax y Plasmodium ovale después de

transcurridos 30 días del episodio inicial. Se debe exclusivamente a la persistencia de hipnozoitos, aún a pesar de tratamiento con primaquina x 14 días.

Reinfección.- Reaparición de síntomas y parasitemia en un paciente que ha tenido un episodio previo de malaria, ocasionada por una nueva picadura infectante. Ocurre en todas las especies de Plasmodium en cualquier momento.

Registro: documento que provee evidencias objetivas de las actividades efectuadas o de los resultados obtenidos.

Sustancia infecciosa.- Es aquella que contiene microorganismos viables (bacterias, virus, rickettsias, parásitos, hongos o recombinantes híbridos mutantes) que pueden causar enfermedades tanto en el hombre como en los animales. No incluye toxina que no contiene ninguna sustancia infecciosa.

Simbiosis.- Este tipo de asociación biológica que es muy similar a la anterior, ya que existe dependencia necesaria para la supervivencia, es decir, los dos asociados no pueden vivir separados.

Sincronización: procedimiento por el cual es posible obtener un solo estadio de *Plasmodium falciparum* luego de haberlo cultivado *in vitro*

Zona endémica.- Es aquella donde existe el paludismo transmitiéndose de modo natural entre sus habitantes, causado por determinadas especies y cepas de plasmodios, con un número más o menos estable e importante de casos anuales durante algunos o muchos años sucesivos (un mínimo de tres años).

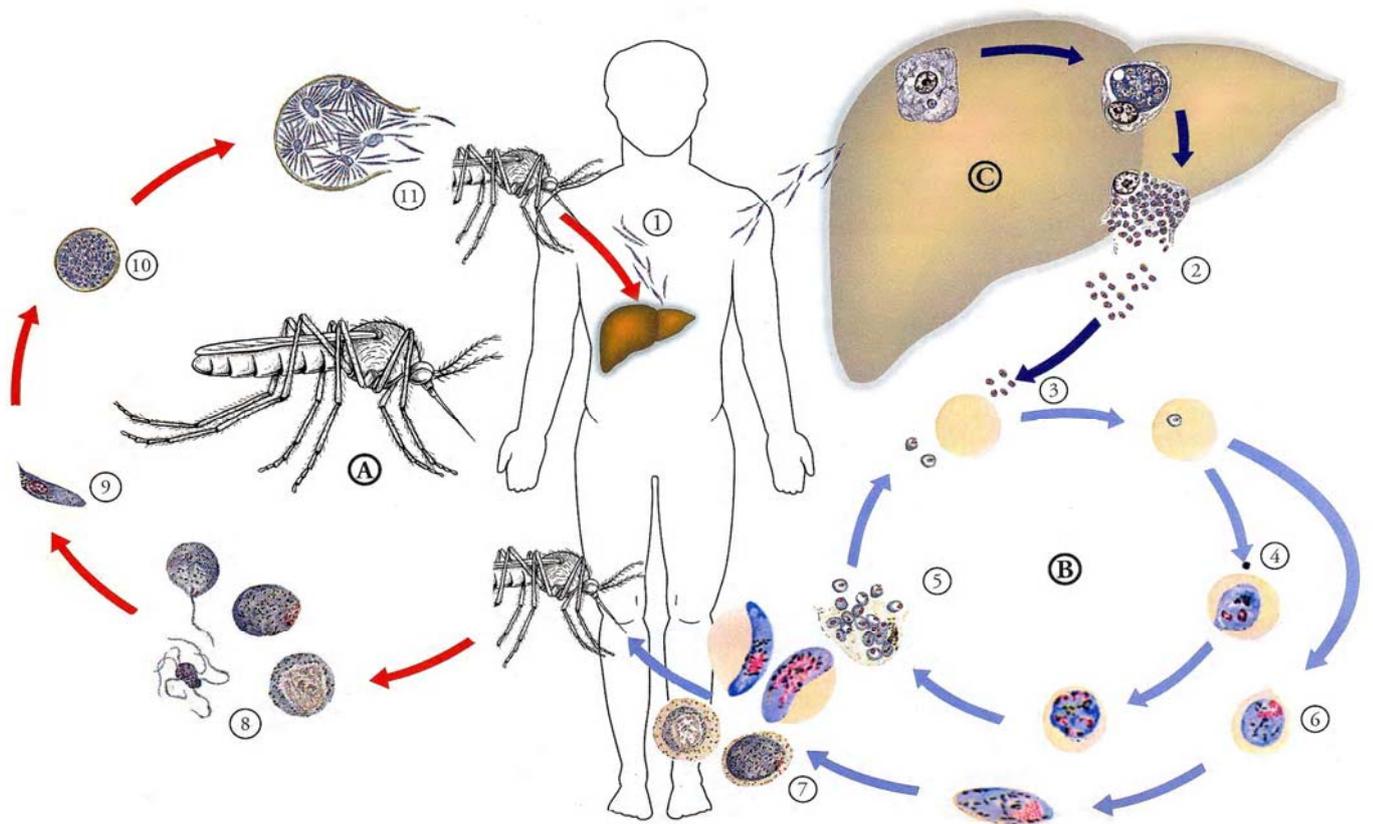
Zona endémica esporádica.- Es aquella que, siendo endémica, el número de casos anuales es pequeño, pudiendo haber años sin que se presente ninguno.

Zona epidémica.- Es aquella donde no existiendo paludismo, éste hace su aparición, así como también, aquella donde el paludismo siendo endémico con una ocurrencia estable de casos anuales, ésta se incrementa nítidamente, acompañada de un fuerte incremento de la morbilidad. Cuando esta condición de zona epidémica mantiene las nuevas condiciones de ocurrencia y morbilidad durante un mínimo de tres años, vuelve a ser considerada endémica, pero ahora con otros valores de importancia.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Alger J, ML Matute, RE Mejía. Manual de Procedimientos Operativos Estándar para el Diagnóstico Microscópico de la Malaria en Honduras. Departamento de Laboratorio Nacional de Vigilancia de la Salud, Secretaría de Salud de Honduras, 2006.
2. Atlas de Malaria Humana, Giovanni Swierczynski, 2007
3. Norma de Diagnostico de Laboratorio de la Malaria. Sección de Malaria, Departamento Laboratorio Nacional de Vigilancia de la Salud, Secretaría de Salud de Honduras, 2007.
4. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Guía para la implementación de un sistema de gestión de calidad en el diagnóstico microscópico de malaria: Estandarización de procedimientos y herramientas sobre el control de calidad y la evaluación externa del desempeño en las redes de laboratorio. Propuesta de un grupo técnico, Caracas, Venezuela, julio de 2004. OPS/DPC/CD/M/393/06.
5. SNEM. Manual para el diagnostico microscópico de la malaria. Publicación Científica No. 276, Organización Panamericana de la Salud, Cuarta Edición.
6. World Health Organization. Basic Malaria Microscopy. Part 1 Learner's Handbook; Part 2 Tutor's Guide, 2007 (electronic version from PAHO/WHO Sharing Point).
7. World Health Organization. Informal consultation on Quality Control of Malaria Microscopy. World Health Organization, Geneva, WHO/HTM/MAL/2006.1117, 2006.
8. World Health Organization. Malaria light microscopy. Creating a culture of quality. Report of a WHO SEARO/WPRO Workshop on quality assurance for malaria microscopy. Kuala Lumpur, Malaysia, 2005.
9. World Health Organization. Bench aids for the Diagnosis of Malaria Infections. Second Edition, World Health Organization, 2000.
10. World Health Organization. Basic Malaria Microscopy. Part I. Learner's Guide; Part II. Tutor's Guide, Geneva 1991.

ANEXO 1.-CICLO BIOLÓGICO DEL PLASMODIUM



ANEXO 2. ACREDITACION:

Los siguientes componentes de evaluación de la competencia técnica fueron recomendados como el fundamento de un proceso de acreditación en diagnóstico microscópico de la malaria coordinado por OMS (World Health Organization. Informal consultation on Quality Control of Malaria Microscopy. World Health Organization, Geneva, WHO/HTM/MAL/2006.1117, 2006).

1. Objetivo de la acreditación

La acreditación o certificación de la competencia técnica debe ser estandarizada para microscopistas con experiencia. Esto implica que los criterios de selección para el curso deben incluir el criterio de experiencia. Los países deben establecer sus estándares para asegurar que los participantes tengan un cierto número de años de experiencia antes de que ingresen al programa de acreditación.

Aunque estos estándares están básicamente orientados para microscopistas “supervisores nacionales” y “capacitadores centrales”, los mismos estándares pueden ser aplicables en otras circunstancias y situaciones tales como personal de organizaciones no gubernamentales y el sector privado.

2. Principios sobre los cuales la evaluación debe ser fundamentada

- a. La calificación debe ser realista, factible y sostenible. Una re-evaluación planificada de los estándares debe realizarse después de que el programa comience y se adquiera experiencia.
- b. La evaluación de la competencia debe incluir una evaluación de la sensibilidad de la lectura e identificación de las especies de *Plasmodium* así como cuantificación de la densidad parasitaria.

3. Estándares mínimos para estructurar un programa de acreditación

Criterios de estándares mínimos para curso de acreditación

- a. El curso debe durar un mínimo de 5 días
- b. Mínimamente debe incluir:
 - i. Preparación de muestras de sangre, incluyendo medidas de bioseguridad.
 - ii. Coloración de las muestras.
 - iii. Uso del microscopio.
 - iv. Lectura e interpretación de las muestras de sangre.
- c. La capacitación debe incluir interacciones uno a uno entre instructores y participantes, por lo tanto hasta un máximo de 12 participantes por instructor es apropiado.
- d. El curso debe incluir un pre-test teórico y de lectura de láminas (con retroalimentación inmediata) y una evaluación enmascarada del post-test, una “evaluación final de la competencia” sobre la cual la acreditación está fundamentada.
- e. Los instructores deben ser microscopistas y capacitadores con amplia experiencia.
- f. La acreditación debe ser estandarizada utilizando láminas con muestras validadas más que fundamentadas en el juicio de los instructores.

Panel de láminas: criterios mínimos

1. Cada lámina debe incluir gota gruesa y frotis. El microscopista utilizará ambas muestras para proporcionar su diagnóstico.

2. Debe incluir entre 10 a 20 laminas (ajustar el número de láminas por especie de acuerdo a la situación epidemiológica local):
 - a. 4 láminas negativas
 - b. 1 lámina con presentación inusual
 - c. 2 láminas de *P. falciparum* con densidad de 50-100 parásitos/ μ L
 - d. 3-5 láminas de *P. falciparum* con densidad de 300-800 parásitos/ μ L
 - e. 2 láminas de *P. vivax* con densidad de 100-500 parásitos/ μ L
 - f. 2 láminas de *P. vivax* con densidad de >500 parásitos/ μ L
 - g. 2 láminas de *P. malariae* con densidad de >500 parásitos/ μ L
 - h. 2 láminas de *P. ovale* con densidad de >500 parásitos/ μ L
 - i. 1 lámina con infección mixta
 - j. 1 Láminas con otros tipos de parasitos.

Condiciones para la evaluación final o acreditación

1. Evaluar la competencia en la identificación de especies de *Plasmodium* y de densidad parasitaria.
2. Permitir 10 minutos por lámina.
3. Permitir la utilización de material que normalmente es utilizado en el laboratorio (manuales, atlas, etc.).
4. Asegurar que los microscopios estén en condiciones óptimas.
5. Las laminas deben estar en orden aleatorio
6. Mantener condiciones estrictas de evaluación: confidencialidad y silencio

4. Estándares mínimos para la evaluación final o acreditación

Recomendaciones:

- a. *Panel de láminas*: aunque pueden ser incluidas láminas de calidad pobre para ser revisadas y discutidas durante el curso, la evaluación final para la acreditación debe incluir solamente láminas de calidad óptima, validadas por microscopistas expertos que participen en un programa de evaluación externa del desempeño.
- b. *Condiciones de evaluación*: es importante crear una atmósfera de relajamiento. Los participantes deben tener la oportunidad de adaptarse al ambiente y equipo antes de la evaluación final. A los participantes se les debe permitir utilizar material de consulta.
- c. *Calificación*: La acreditación debe durar inicialmente un máximo de 3 años. Aquellos que no obtuvieron buena calificación deben ser re-evaluados antes. La acreditación es independiente de las otras actividades de la gestión de la garantía de la calidad: validación de láminas diagnosticadas, evaluación externa del desempeño, supervisión.

Estándares para la evaluación final de la competencia o acreditación (basado en experiencia en países asiáticos)

Calificación	Exactitud de la identificación de la especie	Cuantificación de la densidad parasitaria
1. Experto	$\geq 90\%$	$\geq 50\%$
2. Referencia	$\geq 80\%$	$\geq 40\%$
3. Acreditado	$\geq 70\%$	$\geq 30\%$
4. En entrenamiento	$< 70\%$	$< 30\%$

Ambos criterios de identificación y cuantificación deben cumplirse. Adicionalmente, los certificados deben incluir el número (1-4) y el rango de porcentaje de cada calificación para fines de comparación.

ANEXO 3 PROGRAMA DE CAPACITACIÓN Y OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Constituye un importante capítulo en la formación de un microscopista así como en el proceso de capacitación continua de éstos, a continuación se detalla el programa mínimo requerido y sus contenidos.

Programa

Se debe definir en cuantas jornadas de capacitación se cubrirán los diferentes módulos tanto en un programa para personal nuevo o personal existente.

Módulo 1. Malaria, la enfermedad

Módulo 2. Limpieza y almacenamiento de laminas portaobjetos

Módulo 3. Manteniendo registros correctos

Módulo 4. Muestras de sangre

Módulo 5. Coloración de las muestras de sangre

Módulo 6. El microscopio

Módulo 7. Lectura de las muestras

Módulo 8. Examen de las muestras

Módulo 9. Artefactos en las muestras

Módulo 10. Lectura rutinaria de la gota gruesa y extendido fino para el diagnóstico de la malaria

Módulo 11. Red de Laboratorio y Gestión de la Garantía de la Calidad

Módulo 12. Ciclo de vida de *Plasmodium*

Modulo 13. Llenado de formularios y registro de información.

Objetivos de Aprendizaje

Módulo 1. Malaria, la enfermedad

Al final de esta Unidad, el estudiante debe:

1. Reconocer la importancia de la malaria como una enfermedad
2. Ser capaz de reconocer los signos y síntomas más comunes de la malaria
3. Saber que algunas personas pueden tener malaria sin síntomas
4. Saber que la malaria esta causada por la presencia de parásitos en la sangre del paciente
5. Saber que el mosquito hembra del género *Anopheles* puede transmitir la malaria a las personas
6. Comprender que para diagnosticar la malaria correctamente, el estudiante debe ser capaz de encontrar e identificar parásitos en una muestra de sangre coloreada examinada en un microscopio

Módulo 2. Limpieza y almacenamiento de laminas portaobjetos

Al final de esta Unidad, el estudiante debe:

1. Describir como las laminas porta-objetos para la toma de muestras de sangre son limpiadas adecuadamente, envueltas y almacenadas

2. Distinguir entre laminas portaobjetos adecuadas para preparar muestras de aquellas que no son adecuadas
3. Demostrar como se lavan, secan, envuelven y almacenan laminas portaobjetos para muestras de sangre

Módulo 3. Manteniendo registros correctos

Al final de esta Unidad, el estudiante debe:

1. Identificar cuales formularios de registro deben ser utilizados para registrar la información para diferentes actividades
2. Registrar correctamente toda la información requerida en los formularios apropiados
3. Seleccionar la(s) copia(s) apropiada(s) de los formularios para canalizarla(s) a través del sistema de información

Módulo 4. Muestras de sangre

Al final de esta Unidad, el estudiante debe:

1. Nombrar las enfermedades que pueden ser transmitidas por sangre contaminada
2. Enlistar las precauciones que deben ser tomadas para prevenir la contaminación
3. Enlistar todos los materiales requeridos para preparar las muestras de sangre
4. Demostrar bajo condiciones de campo la preparación en la misma lamina portaobjetos de la gota gruesa y el extendido fino, de buena calidad
5. Explicar las razones por las cuales una muestra debe ser correctamente identificada
6. Demostrar la identificación correcta de una muestra de sangre
7. Reconocer y seleccionar las muestras gota gruesa y extendido fino de buena calidad
8. Identificar las causas de las fallas comunes en la preparación de ambos, gota gruesa y extendido fino

Módulo 5. Coloración de las muestras de sangre

Al final de esta Unidad, el estudiante debe:

1. Ser capaz de operar la balanza utilizada en el laboratorio
2. Ser capaz de preparar agua tamponada para mezclar con el colorante Giemsa, pesando y mezclando correctamente las sales amortiguadoras
3. Ser capaz de preparar soluciones correctoras para ajustar el pH
4. Conocer porque es esencial para la solución amortiguadora alcanzar un pH de 7.2 para la coloración de buena calidad de las muestras con el colorante Giemsa
5. Conocer cuando debe utilizar el método regular o el método rápido de coloración con Giemsa
6. Ser capaz de demostrar el uso del colorante Giemsa y de las soluciones tamponadas para colorear las muestras de sangre sospechosas de contener parásitos de malaria, utilizando ya sea el método regular o el método rápido
7. Ser capaz de demostrar la preparación de la coloración de la gota gruesa y el extendido fino

8. Conocer las formas correctas e incorrectas de manejar y utilizar el colorante Giemsa
9. Ser capaz de demostrar el secado y almacenamiento correctos de las laminas coloreadas

Módulo 6. El microscopio

Al final de esta Unidad, el estudiante debe:

1. Ser capaz de demostrar el uso del microscopio con luz artificial o natural
2. Ser capaz de demostrar el uso del objetivo con aceite de inmersión
3. Ser capaz de operar la platina
4. Conocer los nombres de los principales componentes del microscopio
5. Saber como mantener el microscopio y sus componentes en buenas condiciones de funcionamiento
6. Saber que es lo que no debe hacerse con el microscopio y sus componentes
7. Saber como almacenar el microscopio
8. Saber como empacar el microscopio para transportarlo de un lugar a otro

Módulo 7. Lectura de las muestras

Al final de esta Unidad, el estudiante debe:

1. Enlistar los componentes de la sangre
2. Examinar la gota gruesa y el extendido fino con el objetivo 100X y aceite de inmersión
3. Reconocer y clasificar los elementos formes de la sangre
4. Reconocer artefactos (contaminantes, etc.) que pueden confundirse por parásitos de la malaria y causar confusión en el diagnostico de la malaria

Módulo 8. Examen de las muestras

Al final de esta Unidad, el estudiante debe:

1. Nombrar los componentes de un parásito *Plasmodium*
2. Distinguir los parásitos en la gota gruesa y el extendido fino
3. Reconocer y nombrar los estadios de trofozoito, esquizonte y gametocito, en la gota gruesa y el extendido fino
4. Reconocer y nombrar las especies de *Plasmodium* en la gota gruesa y el extendido fino

Módulo 9. Artefactos en las muestras

Al final de esta Unidad, el estudiante debe:

1. Conocer los contaminantes de la sangre que pueden ser confundidos con parásitos de la malaria y otros microorganismos que pueden encontrarse en la sangre (*Trypanosoma*, *Histoplasma*, *Leishmania*, *Babesia*, microfilarias)

2. Reconocer y ser capaz de distinguir entre los parásitos de la malaria y artefactos comunes
3. Conocer las diferentes maneras en las cuales los artefactos pueden contaminar las muestras de sangre
4. Conocer cómo prevenir la contaminación de las muestras de sangre

Módulo 10. Lectura rutinaria de la gota gruesa y extendido fino para el diagnóstico de la malaria

Al final de esta Unidad, el estudiante debe:

1. Saber que la gota gruesa y el extendido fino deben ser examinados de acuerdo al procedimiento recomendado y de manera consistente
2. Saber que el extendido fino es examinado solamente en situaciones excepcionales y conocer cuáles son las excepciones
3. Ser capaz de demostrar las habilidades necesarias para examinar la gota gruesa y el extendido fino utilizando el procedimiento estándar
4. Saber porque la densidad parasitaria debe ser informada
5. Ser capaz de utilizar correctamente los diferentes métodos para estimar la densidad parasitaria

Módulo 11. Red de Laboratorio y Gestión de la Garantía de la Calidad

Al final de esta Unidad, el estudiante debe:

1. Comprender la estructura y funcionamiento de la red de laboratorio y sus diferentes niveles
2. Conocer la importancia del subsistema de información
3. Comprender el proceso de gestión de la garantía de la calidad del diagnóstico microscópico de la malaria
4. Conocer como se evalúa la competencia profesional

Módulo 12. Ciclo de vida de *Plasmodium*

Al final de esta Unidad, el estudiante debe:

1. Describir el ciclo de vida de *Plasmodium*
2. Describir las fases del ciclo de vida de *Plasmodium* que se cumplen en el ser humano y que se cumplen en el vector
3. Recordar los estadios de *Plasmodium* que se encuentran en el humano

ANEXO 4. SELECCIÓN DE PERSONAL QUE SE DESEMPEÑARA COMO MICROSCOPISTA.

ACTA DE SELECCIÓN

NOMBRE DEL PUESTO: Microscopista del Puesto de Diagnostico de Malaria de....
[Indicar el lugar y el nombre de la institución si corresponde a un hospital o centro de salud]

Provincia de _____, Cantón _____

LUGAR: lugar donde se realizo la selección

FECHA: fecha en que se realizo la selección

MIEMBROS DE LA TERNA (Subdirector Técnico, Jefe de Epidemiología, Jefe de Laboratorio o sus delegados a nivel central o zonal)

1. NOMBRE Y CARGO
2. NOMBRE Y CARGO
3. NOMBRE Y CARGO

ANTECEDENTES

ESCRIBIR UN PARRAFO LOS ANTECEDENTES/JUSTIFICACION DE LA CREACION DE UN NUEVO PUESTO DE DIAGNOSTICO. (a continuación un ejemplo). La red de diagnóstico de laboratorio para malaria está conformada por el Laboratorio de Referencia en el nivel central, laboratorios regionales (departamentales), de área (municipales), hospitales y centros de salud. En la mayoría de las situaciones, el diagnóstico es ejecutado por microscopistas de malaria y técnicos de laboratorio, éstos además realizan otros diagnósticos en diferentes muestras clínicas. Por lo tanto, el número de microscopistas debe ser suficiente para cubrir las necesidades de diagnóstico de acuerdo a la situación epidemiológica y a las actividades de vigilancia. El propósito de contratar recursos adicionales es fortalecer la capacidad diagnóstica de la red de laboratorio en el nivel local para proporcionar al usuario de los servicios un diagnostico temprano y tratamiento oportuno. Se solicitó a las autoridades de salud local que a través de las organizaciones municipales (sociedad civil y municipalidad) identificaran candidatos e hicieran llegar las hojas de vida al nivel central.

CANDIDATOS CONSIDERADOS

1. NOMBRE COMPLETO DE CANDIDATO
2. NOMBRE COMPLETO DE CANDIDATO
3. NOMBRE COMPLETO DE CANDIDATO
4. NOMBRE COMPLETO DE CANDIDATO
5. Etc.

CRITERIOS DE EVALUACION Y PUNTAJE

1. Experiencia laboral (2 puntos)
2. Experiencia en diagnóstico de malaria (2 puntos)

3. Condición física (agudeza visual) adecuada (1 punto)
4. Residencia en el área de influencia de la sede o cerca (2 puntos)
5. Entrevista (1 puntos)
6. Edad. (no mayor a 30 años) (2)
7. Bachiller (preferentemente químico-biólogo) (2)

RESULTADOS DE LA EVALUACION DE LOS CANDIDATOS

CRITERIOS	CANDIDATO 1	CANDIDATO 2	CANDIDATO 3	CANDIDATO 4
Experiencia laboral (2)				
Experiencia en diagnóstico de malaria (2)				
Agudeza visual (1)				
Residencia en/cerca del área de la sede (2)				
Entrevista (2)				
Total Puntos (9)				

RECOMENDACIÓN DE CONTRATACION

INDICAR EL NOMBRE DEL CANDIDATO SELECCIONADO Y DESCRIBIR BREVEMENTE LA FUNDAMENTACION DE SU SELECCIÓN. A CONTINUACION UN EJEMPLO. El Sr o la Sra. Xxxxxx fue seleccionado(a) en base a sus meritos, obteniendo el mayor puntaje (xx puntos) entre los candidatos.

FIRMA DE CADA UNO DE LOS MIEMBROS DE LA TERNA EXAMINADORA

REQUISITOS PARA APROBAR EL CURSO DE CAPACITACION PARA MICROSCOPISTA:

- 1.- Duración del curso de dos meses en nivel central mas un mes a nivel zonal
- 2.- El examen teórico consistirá de 20 preguntas y lectura práctica de 20 laminas.
- 3.- Para poder realizar el examen teórico-practico deberá acreditar un mínimo de 90% de asistencia al curso de capacitación.
- 4.- Puntaje mínimo alcanzado de 18/20 en el capitulo practico y 17/20 en el capitulo teórico.
- 5.- En caso de no aprobar el curso se considerara la posibilidad de una segunda y única evaluación en un tiempo posterior no mayor a 15 días, del capitulo no aprobado.
- 6.- Si el puntaje alcanzado en el examen inicial es menor a 14 en ambos capítulos no podrá ser susceptible de un nuevo examen.
- 7.- El examen final teórico-práctico será realizado en el laboratorio del nivel central o por excepción en una zona operativa con presencia de delegados del nivel central (jefe de Laboratorio, supervisores, y un representante del departamento técnico del SNEM, o sus delegados).

**ANEXO 5. SISTEMA DE GARANTÍA DE CALIDAD PARA LA RED DE
PUESTOS DE DIAGNÓSTICO Y LABORATORIOS DEL SNEM**

FORMULARIO DE SUPERVISIÓN:

Cantón	Localidad	Microscopista	Puesto Dx	Fecha

Supervisor	Cargo	Hora de llegada	Hora de salida

Número de gotas gruesas realizadas en el último mes	
Días de no disponibilidad del Microscopista en el último mes	
Horas de no disponibilidad por día	

1. CALIDEZ DE ATENCIÓN

	SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Saluda con calidez al paciente				
Se interrelaciona con el paciente				
Da un buen mensaje sobre la enfermedad al paciente				
Tiempo de entrega de resultado (1 hora)				
Supervisa 1ra. dosis de tratamiento				
Explica y entrega prescripción grafica de tratamiento				
Indica la importancia de regresar a los controles				

2. BIOSEGURIDAD

	SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Se lava las manos cada vez que es necesario				
Utiliza guantes				
Utiliza Mandil				
Utiliza Mascarilla (si es necesario)				
Limpia el o los equipos antes y después de utilizarlos				
Maneja correctamente los objetos corto-punzantes				
Fuma dentro del Laboratorio				
Come dentro del Laboratorio				
Se protege adecuadamente lesiones superficiales.				
Utiliza lancetas más de una vez				
Utiliza soluciones desinfectantes (hipoclorito de sodio)				
Utiliza recipientes para el descarte de desechos infecciosos, comunes y corto punzantes				
Rotula recipientes para el descarte de desechos				
Informa oportunamente accidentes de Laboratorio				

3. TOMA DE MUESTRA

	SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Almacena apropiadamente los materiales e				

insumos				
Toma la mano correcta del paciente				
Limpia el dedo con alcohol				
Seca el dedo estimulando la circulación				
Sostiene el dedo a muestrear apropiadamente				
Toma la lanceta adecuadamente				
Realiza correctamente la dígito punción				
Descarta adecuadamente la lanceta				
Descarta la primera gota de sangre				
Manipula láminas limpias				
Presiona el dedo para aumentar la muestra				
Limpia el dedo del paciente después del procedimiento				
Da indicaciones posteriores al paciente				

3.1. EXTENSIÓN GOTA GRUESA

	SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Esparce la sangre de acuerdo la norma				
Distribuye la muestra en forma homogénea				
Tamaño adecuado de la muestra				
Grosor apropiado de la muestra				

3.2. EXTENSIÓN FROTIS

	SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Usa la segunda lámina en el ángulo apropiado para esparcir la muestra				
El frotis es homogéneo y fino				
Deja secar el frotis				
Rotula sobre la cabeza del frotis				

3.3. CRITERIO DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD TÉCNICA DE LA TOMA DE MUESTRA

	SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Gota gruesa				
- Ubicación: Entre el 1ro. y 2do. tercio de la lámina				
- Tamaño: 1 cm. cuadrado o 1 cm. de diámetro				
- Grosor: 10 a 20 leucocitos x campo (microscopio)				
Frotis				
- Tamaño: 3 cm.				
- Ubicación : Del centro al borde externo de la lámina				
- Extendido: Fino, con cabeza cuerpo y cola				
- Identificación: Legible (número).				

3.4. SECADO DE LA MUESTRA

	SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Seca horizontalmente la lámina				
Usa apropiadamente algún método de secado rápido				
Protege la muestra para no contaminarse				

4. TINCIÓN

4.1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

	SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Almacena correctamente los reactivos				

Uso del solvente adecuado para la solución madre				
Uso de buffer para preparar la solución de trabajo				
Deja precipitar la solución de trabajo				
Prepara la cantidad necesaria de solución de trabajo				
Deshecha el colorante diluido no usado				

4.2. PROCESO DE TINCIÓN

	SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Deja secar la muestra antes de teñir				
Fija correctamente el frotis				
Colorea el frotis y la gota gruesa en una misma lámina				
Tiñe por 10 minutos				
Enjuaga adecuadamente la lámina				
Realiza un secado apropiado de la muestra				

5. LECTURA

5.1. MANEJO DEL MICROSCOPIO

	SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Mantiene limpio el Microscopio				
Utiliza el filtro azul				
Usa los objetivos 10X, 100X según corresponde				
Usa aceite de inmersión				
Limpia el aceite del objetivo después de observar				

5.2. LECTURA DE GOTA GRUESA

	SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Verifica y registra la clave de la muestra				
Lee la gota gruesa según protocolo				
Revisa 100 campos microscópicos				
Reconoce al parásito				
Diferencia trofozoitos				
Diferencia esquizontes				
Diferencia gametocitos				
Diferencia Pf				
Diferencia Pv				
Anota el número y especie de parásitos encontrados				

5.3. CRITERIOS PARA EVALUAR LA CALIDAD TÉCNICA DE LA COLORACIÓN

		SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Deshemoglobinización					
Fondo libre de glóbulos rojos					
T O N A L I D A	Coloración del parásito: Núcleo: Rojo grosella Citoplasma: azul cielo. Pigmento: amarillo sin brillo.				
	Coloración Linfocitos: Citoplasma azul cielo Núcleo: azul oscuro				
	Leucocitos Monocitos: Citoplasma gris. Núcleo: azul tenue				

D	Neutròfilo: Citoplasma rosado. Núcleo: púrpura.				
	Eosinófilos: Citoplasma rosado. Gránulos gruesos, rojo salmón.				
Ausencia de Precipitado del colorante					

6. INFORMACIÓN

	SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Llena los formularios (OC-19, E1-E2) diariamente				
Lleva el registro de casos positivos				
Realiza el balance mensual de medicamentos e insumos de Laboratorio				
Entrega copia de la información semanal a la Unidad de Salud donde labora				
Entrega la información semanalmente al SNEM				
Rotula la información a entregar				
Registra diariamente la temperatura				

7. MEDICAMENTOS

	SI	NO	ALGUNAS VECES	OBSERVACIONES
Almacena correctamente los medicamentos				
Aplica los esquemas actuales de tratamiento				
Dispones de Tablas de tratamiento por dosis de peso o edad				
Entrega medicamentos caducados				

8. CONSTATAción DEL BALANCE DE MEDICAMENTOS

Medicamentos	Nro. de comprimidos		Nro. de días de desabastecimiento				Causas
	Vencidos	No vencidos	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Total	
CLOROQUINA 150 mg							
PRIMAQUINA 15 mg							
PRIMAQUINA 7.5 mg							
ARTESUNATO 200 mg							
ARTESUNATO 100 mg							
ARTESUNATO 50 mg							
Sulfadoxina/Pyrimetamina 500mg							
QUININA (Ampollas 600 mg)							
QUININA Tabletas 100 mg							
CLINDAMICINA 300 mg							
Clindamicina suspensión 5mg/80ml							
Artemether/Lumefantrina 140 mg							

1=Incremento no esperado de casos. 2=No suministra el nivel superior. 3= No solicitud de suministro por parte del Puesto. 4=Otros

9. CONSTATAción DEL BALANCE DE MATERIALES E INSUMOS

DESCRIPCION	OBSERVACION	CAUSA DE DESABASTECIMIENTO
LÁMINAS PORTAOBJETO		
LANCETAS ESTÉRILES		
ALCOHOL (Litros)		
ALGODÓN (Libras)		
GIEMSA 100ml		

ACEITE DE INMERSIÓN 120ml		
BUFFER		
AZUL DE METILENO		
XILOL		
METANOL		
KLEENEX caja		
GUANTES		
MASCARILLAS		
FUNDAS ROJAS		
FUNDAS NEGRAS		
JABONES DE TOCADOR		
PAPEL HIGIÉNICO		
FORMULARIO OC-19		
FORMULARIO E-1		
FORMULARIO E-2		

1=No hay

2=Cantidad insuficiente

3=Cantidad adecuada

10. OBSERVACIONES VARIAS

(Estructura, equipos, almacenamiento, etc.)

Le han realizado mantenimiento y limpieza a su Microscopio 1:				SI		NO	
Estado actual del Microscopio 1:	Funcional		No funcional		Funcional con desperfectos		
Si presenta desperfectos, descríbalos:							
Le han realizado mantenimiento y limpieza a su Microscopio 2:				SI		NO	
Estado actual del Microscopio 2:	Funcional		No funcional		Funcional con desperfectos		
Si presenta desperfectos, descríbalos:							
Ha recibido capacitaciones por lo menos una vez al año:				SI		NO	
Cuenta con manuales o guías actualizadas:				SI		NO	
(fecha de la última):							
Requiere de alguna adecuación en cuanto a la estructura de su local:				SI		NO	
(especifíquelos):							
Describa otro requerimiento actual:							
Observaciones (Describa acciones tomadas en el momento de esta supervisión para corregir las deficiencias detectadas):							

Formulario CC-3

FIRMA SUPERVISOR

FIRMA MICROSCOPISTA

ESQUEMA DE TRATAMIENTO PARA MALARIA NO COMPLICADA

TRATAMIENTO RADICAL DE INFECCIONES A *P. falciparum*

PRIMERA ELECCIÓN

GRUPO DE EDAD	SULFADOXINA / PIRIMETAMINA (FANSIDAR)	ARTESUNATO (3 Días)		
	1er Día	1er Día	2do Día	3er Día
Menores de 6 meses	NO DAR	1/4	1/4	1/4
De 6 a 11 meses	1/2	1/2	1/2	1/2
De 1 a 2 años	1/2	1/2	1/2	1/2
De 3 a 6 años	1	1	1	1
De 7 a 11 años	1 y 1/2	1 y 1/2	1 y 1/2	1 y 1/2
De 12 a 14 años	2	2	2	2
De 15 y Más años	3	2 1/2	2 1/2	2 1/2

Dosis: sulfadoxina / Pirimetamina
25 mg x Kg ç de peso dosis unica
Dosis Artesunato 4 mg x Kg de peso dia

Presentacion
S/P tabletas : 500/25 mg
Artesunato: tabletas: 100 mg

La Sulfadoxina y la Pirimetamina, solas o asociadas están contraindicadas
En niños menores de 6 meses, infantes prematuros, alergia a la sulfanomidas

TRATAMIENTO RADICAL DE INFECCIONES A *P. falciparum*

PRIMERA ELECCIÓN

GRUPO DE EDAD	SULFADOXINA / PIRIMETAMINA (FANSIDAR)	ARTESUNATO (3 Días)		
	1er Día	1er Día	2do Día	3er Día
Menores de 6 meses	NO DAR	1/4	1/4	1/4
De 6 a 11 meses	1/2	1/4	1/4	1/4
De 1 a 2 años	1/2	1/4	1/4	1/4
De 3 a 6 años	1	1/2	1/2	1/2
De 7 a 11 años	1 y 1/2	3/4	3/4	3/4
De 12 a 14 años	2	3/4	3/4	3/4
De 15 y Más años	3	1	1	1

Dosis: sulfadoxina / Pirimetamina
25 mg x Kg ç de peso dosis unica
Dosis Artesunato 4 mg x Kg de peso dia

Presentacion
S/P tabletas : 500/25 mg
Artesunato: tabletas: 250 mg

La Sulfadoxina y la Pirimetamina, solas o asociadas están contraindicadas
En niños menores de 6 meses, infantes prematuros, alergia a la sulfanomidas

TRATAMIENTO RADICAL DE INFECCIONES A *P. falciparum*

PRIMERA ELECCIÓN

GRUPO DE EDAD	SULFADOXINA / PIRIMETAMINA (FANSIDAR)	ARTESUNATO (3 Días)		
	1er Día	1er Día	2do Día	3er Día
Menores de 6 meses	NO DAR	1/2	1/2	1/2
De 6 a 11 meses	1/2	1	1	1
De 1 a 2 años	1/2	1	1	1
De 3 a 6 años	1	2	2	2
De 7 a 11 años	1 y 1/2	3	3	3
De 12 a 14 años	2	4	4	4
De 15 y Más años	3	5	5	5

Dosis: sulfadoxina / Pirimetamina
25 mg x Kg ç de peso dosis unica
Dosis Artesunato 4 mg x Kg de peso dia

Presentacion
S/P tabletas : 500/25 mg
Artesunato: tabletas: 50 mg

La Sulfadoxina y la Pirimetamina, solas o asociadas están contraindicadas
En niños menores de 6 meses, infantes prematuros, alergia a la sulfanomidas

TRATAMIENTO RADICAL DE INFECCIONES A *P. falciparum*

SEGUNDA ELECCIÓN

GRUPO DE EDAD	COARTEM NUMERO DE TABLETAS			
	5-14 Kg	15-24 Kg	25-34 Kg	> 35 Kg
	6 meses a 2 años	3 a 8 años	9 a 14 años	> 14 años
0 horas	1	2	3	4
12 horas	1	2	3	4
24 horas	1	2	3	4
36 horas	1	2	3	4
48 horas	1	2	3	4
60 horas	1	2	3	4
TOTAL	6	12	18	24

Presentacion: **Coartem** (Artemether + Lumefantrine)

tabletas: Artemether: 20 mg + Lumefantrine 120 mg

Observaciones: No usar en embarazadas o pacientes con malaria complicada

CONTRAINDICACIONES:

Primaquina: Menores de 6 meses, embarazadas, enfermedades hepáticas renales o medulares severas, e infantes prematuros.

TRATAMIENTO RADICAL DE INFECCIONES A *P. falciparum*

TERCERA ELECCIÓN

Horario	Medicamento	N° Días	Dosis por días	
Mañana	Quinina mg/kg	7	desde 1er al 7mo	10 mg/kg
	Clindamicina mg/kg	5	desde 3er al 7mo	10 mg/kg
Tarde	Quinina mg/kg	7	desde 1er al 7mo	10 mg/kg
	Quinina mg/kg	7	desde 1er al 7mo	10 mg/kg
Noche	Quinina mg/kg	7	desde 1er al 7mo	10 mg/kg
	Clindamicina mg/kg	5	desde 3er al 7mo	10 mg/kg

TRATAMIENTO INFECCIÓN A *P. falciparum* (GESTANTES)

PRIMERA ELECCIÓN PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO

Horario	Medicamento	N° Días	Dosis por días	
Mañana	Quinina mg/kg	7	desde 1er al 7mo	10 mg/kg
	Clindamicina mg/kg	5	desde 3er al 7mo	10 mg/kg
Tarde	Quinina mg/kg	7	desde 1er al 7mo	10 mg/kg
Noche	Quinina mg/kg	7	desde 1er al 7mo	10 mg/kg
	Clindamicina mg/kg	5	desde 3er al 7mo	10 mg/kg

Contraindicaciones:

Primaquina: **No se debe administrar durante la gestación**

VIA: **Oral**

Una vez culminada la gestación se puede optar por suspender la lactancia y administrar Primaquina o continuar con el tratamiento supresivo hasta el cuarto (16) semanas posparto (tiempo promedio de buena lactancia) y administra Primaquina según esquema.

TRATAMIENTO INFECCIÓN A *P. falciparum* (GESTANTES)

PRIMERA ELECCIÓN SEGUNDO Y TERCER TRIMESTRE DEL EMBARAZO

GRUPO DE EDAD	SULFADOXINA / PIRIMETAMINA (FANSIDAR)	ARTESUNATO (3 Días)		
		1er Día	2do Día	3er Día
Gestantes	3	21/2	21/2	21/2

Dosis: sulfadoxina / Pirimetamina

25 mg x Kg ç de peso dosis unica

Dosis Artesunato 4 mg x Kg de peso dia

Presentacion

S/P tablatas : 500/25 mg

Artesonato:tabletas: 100 mg

La Sulfadoxina y la Pirimetamina, solas o asociadas están contraindicadas

En niños menores de 6 meses, infantes prematuros, alergia a la sulfanomidas

ESQUEMA DE TRATAMIENTO PARA MALARIA COMPLICADA

TRATAMIENTO RADICAL DE INFECCIONES A *P. falciparum*

GRUPO DE EDAD	DOSIFICACIÓN DE QUININA		
	Peso Kg.	mg./base	
De 1 a 3 años	10 - 14	90	Dosis 10 mg/kg/peso - Diluida 300cc Maximo 3 dosis eon intervalo de 8 horas
De 3 a 6 años	15 - 16	130	
De 7 a 11 años	20 - 29	200	Presentación: Ampollas Biclóridrato de Quinina 2ml.= 600 mg
De 12 a 14 años	30 - 40	300	
De 15 y Más años	50	600	

Observaciones: La Quinina debe ser utilizada bajo supervisión médica. Diluida en DW agua 5%. Controlar glicemia c/4 horas

ESQUEMA DE TRATAMIENTO PARA MALARIA NO COMPLICADA

TRATAMIENTO RADICAL DE INFECCIÓN A *P. vivax*

GRUPO DE EDAD	CLOROQUINA (3 Días)			PRIMAQUINA (7 Días)			
	1er Día	2do Día	3er Día	1er Día	2do Día	Día	
Menores de 6 meses	1/4	1/4	1/4	0	0	0	Dosis Cloroquina Base: 1er día: 10 mg/kg./peso 2do día: 7,5 mg/kg./peso 3er día: 7,5 mg/kg./peso
De 6 a 11 meses	1/2	1/2	1/2	1 Inf	1 Inf	1 Inf	
De 1 a 2 años	1	1/2	1/2	1 Inf	1 Inf	1 Inf	
De 3 a 6 años	1	1	1	2 Inf	2 Inf	2 Inf	Dosis Primaquina 0,50 mg/kg/PESO/Día / 7 dias
De 7 a 11 años	2	1 1/2	1 1/2	3 Inf	3 Inf	3 Inf	
De 12 a 14 años	3	2	2	2 Ad.	2 Ad.	2 Ad.	Presentación: Cloroquina Tabletas: 150 mg Primaquina Adulto Tabl. 15 mg Primaquina Infantil Tabl. 7,5 mg
De 15 y Más años	4	3	3	2 Ad.	2 Ad.	2 Ad.	

TRATAMIENTO INFECCIÓN A *P. vivax* (GESTANTES)

Medicamento	Semana 1			Semanas Seguimiento
	1er Día	2do Día	3er Día	
Cloroquina	10 mg/kg	7,5 mg/kg	7,5 mg/kg	2 tabletas semanal, desde el diagnóstico hasta el final de gestacion y luego 16 semanas postparto

Observaciones

PRIMAQUINA: No se debe administrar durante la gestación

VIA: **Oral**

Una vez culminada la gestación se puede optar por suspender la lactación y administrar Primaquina o continuar con el tratamiento supresivo hasta el cuarto (16) semanas posparto (tiempo promedio de buena lactancia) y administra Primaquina según esquema.

