



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
DIRECCIÓN DE REGULACIÓN
DIRECCIÓN DE VIGILANCIA DE LA SALUD
LABORATORIO CENTRAL "DR. MAX BLOCH"

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
TÉCNICOS PARA EL
DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO
DE LA MALARIA**

OCTUBRE 2007



**AUTORIDADES DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y
ASISTENCIA SOCIAL**

**DR. JOSÉ GUILLERMO MAZA BRIZUELA
MINISTRO DE SALUD**

**DR. JOSÉ ERNESTO NAVARRO MARÍN
VICEMINISTRO DE SALUD**

**DR. HUMBERTO ALCIDES URBINA
DIRECTOR GENERAL DE SALUD**

**DR. JOSÉ ROBERTO RIVAS AMAYA
DIRECTOR DE REGULACIÓN**

**DR. MARIO VICENTE SERPAS MONTOYA
DIRECTOR DE VIGILANCIA DE LA SALUD**

**DRA. ENA GARCÍA
DIRECTORA DE PLANIFICACIÓN.**

**LIC. JUDITH ZARATE DE LÓPEZ
DIRECTORA ADMINISTRATIVA**

CRÉDITOS

EQUIPO TÉCNICO QUE PARTICIPÓ EN LA ELABORACIÓN DEL MANUAL:

| | |
|---------------------------------------|--|
| Lic. María Guadalupe de Guzmán | Jefe Laboratorio Central "Dr. Max Bloch" |
| Dr. Jaime Enrique Alemán Escobar | Jefe del Programa Nacional de la Malaria |
| Lic. Ana Vilma Guevara de Aguilar | Jefe Área Clínica, Laboratorio Central |
| Lic. Blanca Sonia Velásquez de Pérez | Coordinadora de Gestión de la Calidad, Laboratorio Central |
| Lic. Ana Telma Méndez de Pineda | Coordinadora Área Inmunohematología, Laboratorio Central |
| Lic. Ana Vilma de Vásquez | Coordinadora de Proyectos, Laboratorio Central |
| Lic. Ana Elizabeth García Callejas | Sección Hematología y Bco. Sangre, Laboratorio Central |
| Tec. Rosa Milagro Flores de Aguilar | Sección Malaria, Laboratorio Central |
| Lic. Tania Ledisse González Marroquín | Sección Malaria, Laboratorio Central |
| Ing. Mariano de Jesús Zepeda | Microscopista del diagnóstico laboratorial de la Malaria |
| Lic. Deisy Suárez Someta | Jefe de Laboratorio Clínico, Hospital Nacional San Bartolo |
| Lic. Mayra Elizabeth Ángel | Profesional en Laboratorio Clínico, Laboratorio Clínico Hospital Nacional Rosales. |
| Lic. Wilfredo Góchez | Coordinador de la Carrera Licenciatura en Laboratorio Clínico, Universidad Dr. Andrés Bello |
| Lic. María Eugenia de Carranza | Coordinador de la Carrera Licenciatura en Laboratorio Clínico, Universidad Autónoma de Santa Ana |
| Lic. Hortensia Reyes | Docente Licenciatura en Laboratorio Clínico, Universidad Nacional de El Salvador de Oriente |
| Lic. Patricia de Soriano | Coordinador de la Carrera Licenciatura en Laboratorio Clínico, Universidad Nacional de El Salvador |

COORDINACIÓN

Lic. Marmin Ruth Carrillo de Sosa

Jefe Sección Malaria y Serología e
Inmunología, Laboratorio Central

DIAGRAMACIÓN Y DISEÑO

Julio Adalberto Castillo

Coordinador Centro de Cómputo,
Laboratorio Central

ASESORÍA TÉCNICA

Dr. Herbert Leonel Díaz Orellana

Colaborador Técnico, Dirección de
Regulación del MSPAS

PRESENTACIÓN

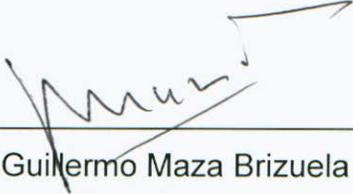
El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social como ente rector de la salud a nivel nacional, conciente de la necesidad de contar con procedimientos técnicos estandarizados que contribuyan a garantizar la calidad de la detección oportuna de enfermedades transmisibles como la Malaria, ha considerado necesaria la elaboración del “ **Manual de Procedimientos Técnicos para el Diagnóstico Microscópico de la Malaria** “.

El presente manual contiene los lineamientos técnicos para realizar adecuadamente los procedimientos relacionados con el diagnóstico microscópico de la Malaria, aspecto fundamental en la prevención y control de la enfermedad.

Este documento ha sido elaborado a iniciativa del Laboratorio Central “Dr. Max Bloch” siguiendo los lineamientos establecidos por la Dirección de Regulación del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y su contenido fue rigurosamente revisado por un equipo idóneo multidisciplinario de diferentes entidades.

Se espera que los lineamientos y disposiciones incluidos en este manual sean cumplidos estrictamente por el personal de salud encargado de su aplicación y contribuir así a mejorar la calidad del diagnóstico microscópico de la Malaria en los establecimientos de la red.




Dr. José Guillermo Maza Brizuela
Ministro de Salud

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | |
| 2. OBJETIVOS..... | 1 |
| 2.1. General..... | 1 |
| 2.2. Específicos:..... | 1 |
| 3. MARCO CONCEPTUAL..... | 2 |
| 3.1. Ciclo biológico de la Malaria:..... | 2 |
| 4. BIOSEGURIDAD..... | 4 |
| 5. CONTROL DE CALIDAD..... | 6 |
| 6. DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE LA MALARIA..... | 15 |
| 7. REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN..... | 29 |
| 8. GLOSARIO DE TÉRMINOS..... | 30 |
| 9. ABREVIATURAS..... | 32 |
| 10. ANEXOS..... | 33 |
| Anexo 1: Ciclo biológico del Plasmodium en el humano y en el mosquito..... | 34 |
| Anexo 2: Preparación para una solución porcentual de hipoclorito..... | 35 |
| Anexo 3: Reporte epidemiológico..... | 37 |
| Anexo 4: Control de calidad semanal..... | 40 |
| Anexo 5: Control de calidad anual..... | 41 |
| Anexo 6: Limpieza y almacenamiento de las láminas..... | 42 |
| Anexo 7: Solución de Giemsa (1000 mL)..... | 45 |
| Anexo 8: Elementos formes de la sangre..... | 47 |
| Anexo 9: Comparación de las especies de Plasmodium..... | 49 |

| | |
|--|----|
| Anexo 10: Características de las diferentes especies de Plasmodium en la gota gruesa. | 50 |
| Anexo 11: Características morfológicas de las diferentes especies de Plasmodium en el extendido fino. | 52 |
| Anexo 12: Protocolo para la observación microscópica de la gota gruesa. | 56 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA. | 57 |

1. INTRODUCCIÓN

En El Salvador la Malaria ha tenido un descenso muy importante según su evolución, con un total de más de 95 mil casos confirmados en 1979, año en el cual se reportó el mayor número de casos, conservando una tendencia epidemiológica estable en la última década, reportándose un total de 49 casos en el año 2006 con predominio del agente etiológico *Plasmodium vivax*.

Este logro ha sido atribuido a las estrategias y actividades implementadas por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), a la labor desarrollada por el equipo de microscopistas responsables del diagnóstico laboratorial de la Malaria y a la implementación de procedimientos técnicos que van desde una buena toma de muestra hasta su diagnóstico y tratamiento eficiente y eficaz.

En la última década la Malaria se encuentra con una tendencia estable, sin embargo, existen factores determinantes tales como: presencia del vector, circulación del parásito en áreas endémicas, constante migración e incremento de la población de inmigrantes portadores sintomáticos y asintomáticos, lo que hace posible el riesgo de brotes epidémicos de esta enfermedad.

Lo anterior obliga a garantizar la calidad del diagnóstico que fortalece la vigilancia epidemiológica.

Este manual contiene los lineamientos para la toma, manejo, envío y procesamiento de muestras para el diagnóstico microscópico de la Malaria según los procedimientos estandarizados por la Organización Panamericana de la Salud y la experiencia técnica de microscopistas del diagnóstico laboratorial de la Malaria del MSPAS, también explica los diferentes controles de calidad que se realizan para evaluar el desempeño del personal que hace este diagnóstico.

2. OBJETIVOS.

2.1. General.

Estandarizar los procedimientos que se llevan a cabo para la detección de la Malaria con el fin de contribuir a garantizar la calidad del diagnóstico microscópico de la enfermedad.

2.2. Específicos:

- Proporcionar elementos básicos de bioseguridad al personal que realiza el diagnóstico microscópico de la Malaria.
- Establecer los lineamientos para la realización del control de calidad del diagnóstico microscópico de la Malaria.
- Proporcionar al personal técnico los lineamientos relacionados con la toma, manejo, envío y procesamiento de muestra para el diagnóstico microscópico de la Malaria.
- Generar las instrucciones técnicas sobre el manejo y uso adecuado del microscopio.
- Facilitar el monitoreo, supervisión y evaluación de los procedimientos técnicos.
- Promover la mejora continua en el diagnóstico microscópico de la Malaria.

3. MARCO CONCEPTUAL

La Malaria o paludismo se define como una enfermedad infecciosa producida por un parásito protozoario del género *Plasmodium* y del cual se conocen cuatro especies: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*. La infección sucede cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* (Figura 3.1) infectada pica al hombre y le inocula los parásitos.

La Malaria puede ser también adquirida por la inoculación de sangre fresca o sus derivados infectados, mediante el uso de agujas contaminadas o por medio de transfusiones sanguíneas que contienen *Plasmodium*.

3.1. Ciclo biológico de la Malaria:

Un mosquito hembra, infectado con plasmodios, al picar vierte al torrente sanguíneo las formas infectantes para el hombre (esporozoítos), los cuales permanecen en sangre periférica aproximadamente 30 minutos; luego penetran a las células del hígado, en donde comienzan a multiplicarse de inmediato, (fase preeritrocítica). Mientras crecen, su núcleo se divide rápidamente formando esquizontes hepáticos, los que se fraccionan dejando en libertad parásitos jóvenes o merozoítos, que llegan al torrente circulatorio e invaden los glóbulos rojos, iniciándose la fase eritrocítica, que produce el cuadro clínico ya descrito.

Algunos de éstos esporozoítos permanecen en las células del hígado como formas durmientes llamadas hipnozoítos, las que al reactivarse pueden dar lugar a las recaídas, desarrollando una nueva esquizogonía exo-eritrocítica, dando lugar a la repetición del ciclo anterior. Las especies de plasmodios que producen recaídas son *Plasmodium vivax* y *Plasmodium ovale*, este último no se encuentra en América.

Estos merozoítos se desarrollan y adquieren la forma de anillo o trofozoíto, cada uno de éstos se multiplica dentro del glóbulo rojo, dando lugar a merozoítos los que forman una estructura en forma de roseta o margarita llamada esquizonte.

Estos esquizontes al ser liberados invaden nuevos glóbulos rojos, repitiendo el ciclo anterior (esquizogónico o asexual), mientras que otros parásitos invaden el glóbulo rojo convirtiéndose en forma sexuales o gametocitos, los cuales son infectantes para el mosquito.

El mosquito al alimentarse de sangre de una persona infectada ingiere los gametos masculinos y femeninos, el gameto masculino (microgametocito) sufre una exflagelación, estos flagelos fecundan a los gametocitos femeninos (macrogametos), (fase sexual).

Cada macrogameto fecundado da origen a un huevo o cigoto, éste adquiere movimiento (ooquinetos), y se enquistan en la pared del intestino del mosquito (ooquiste), éstos se dividen formando el esporoquiste, el cual contiene unas formas móviles llamadas esporozoitos las que se alojan en las glándulas salivales del mosquito, que al alimentarse, las inocula y producen infección en el humano¹.
(Anexo 1)

¹ Ministerio de Salud de Costa Rica, Normas técnicas para el control de la Malaria. 1997. Páginas 4 y 5.

4. BIOSEGURIDAD

Todo laboratorio debe tener las instrucciones por escrito para el recibo, manejo, envío, transporte y procesamiento de muestras²; se debe contar con el personal capacitado y un área específica para el recibo de éstas.

El personal involucrado en el diagnóstico de la Malaria debe seguir las instrucciones de bioseguridad ya que todas las muestras de sangre son potencialmente infecciosas y pueden contaminar al personal de recepción, al de transporte y al que lo manipula.

Para reducir el riesgo de contaminación del profesional que realiza el diagnóstico de laboratorio de la Malaria y proteger al medio ambiente deben seguirse las siguientes indicaciones:

- El trabajo en el laboratorio se debe realizar utilizando ropa de protección como gabacha manga larga la cual debe quitarse antes de salir del laboratorio.
- Se deben utilizar guantes descartables al manipular las muestras de sangre.
- No se debe salir, ni caminar por el laboratorio con los guantes puestos.
- No se debe tocar la boca, ojos, nariz u otras mucosas expuestas, con las manos enguantadas.
- Se debe lavar las manos con agua y jabón inmediatamente después de cualquier contaminación y una vez finalizado el trabajo.
- Cuando se considere que los guantes se han contaminado, deben descartarse inmediatamente. Se deben lavar las manos y utilizar guantes nuevos.
- En caso de heridas corto punzantes debe apretarse fuertemente el área próxima a la lesión, hasta hacerla sangrar. Lavar inmediatamente con abundante agua y jabón, aplicar antiséptico, cubrir con gasa estéril. Si la herida es profunda, se recomienda buscar atención médica.

² Manual de Toma Manejo y Envío de Muestras, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Laboratorio Central "Dr. Max. Bloch", Edición 2006.

- Las lancetas o jeringas usadas se deben colocar en un recipiente, resistente a perforaciones y con cierre hermético, conteniendo una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%. Nunca debe descartarse material cortopunzante en bolsas plásticas.
- Se deben desinfectar las superficies de trabajo al concluir los análisis y al final del día. Se recomienda una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, la cual debe estar protegida de la luz y el calor. (Anexo 2)

5. CONTROL DE CALIDAD

En la Sección de Malaria de la Unidad del Laboratorio Central se verifican tres modalidades de control de calidad:

- Control de calidad semanal.
- Control de calidad anual.
- Evaluación externa del desempeño.

5.1. Control de Calidad Semanal:

5.1.1. Propósito: comprobar en el Laboratorio Central el diagnóstico de *Plasmodium* emitido por los microscopistas del diagnóstico laboratorial de la Malaria del MSPAS.

5.1.2. Muestra requerida: Láminas con muestras de gota gruesa diagnosticadas por los microscopistas del diagnóstico laboratorial de la Malaria en los niveles locales.

5.1.3. Materiales.

- Formulario de reporte epidemiológico Lab-2 (Anexo 3).
- Formulario de envío de resultados de la evaluación del control de calidad semanal. (Anexo 4)
- Aceite de inmersión.
- Papel limpia lentes.

5.1.4. Equipo:

- Microscopio.

5.1.5. Procedimiento:

- Los microscopistas del diagnóstico laboratorio de la Malaria enviarán al Laboratorio Central, el día viernes de cada semana el 100% de muestras positivas y el 10% de muestras negativas a *Plasmodium*, las cuales deben ser seleccionadas por el microscopista del nivel local, en forma aleatoria.
- Las láminas enviadas para control de calidad semanal, deben cumplir los siguientes requisitos:
 - a. Identificación. número correlativo y Clave del establecimiento.
 - b. La muestra tiene que ser significativa. (Ver página No. 16).
 - c. La lámina debe estar coloreada adecuadamente y sin restos de aceite de inmersión.
 - d. Proteger la lámina para su transporte con el fin de evitar que se dañen, envolviendo la lámina en papel absorbente, luego empaquetándola con papel bond o colocándolas en cajas de baquelita si fuere posible.
 - e. Adjuntar las láminas con el formulario del Reporte Epidemiológico LAB-2 debidamente lleno. (Anexo 3).
 - f. El paquete de láminas se identifica de la siguiente manera (Figura 5.1):

Remitente: Se anota la siguiente información: nombre del responsable del envío, nombre del establecimiento de donde proceden las muestras y teléfono de contacto.

Destinatario: Se anota la siguiente información: Sección de Malaria, Laboratorio Central “Dr. Max Bloch”, Alameda Roosevelt, Frente a parque Cuscatlán, San Salvador.

Contenido: Se anota la siguiente información: Láminas referidas para el control de calidad de la Malaria.

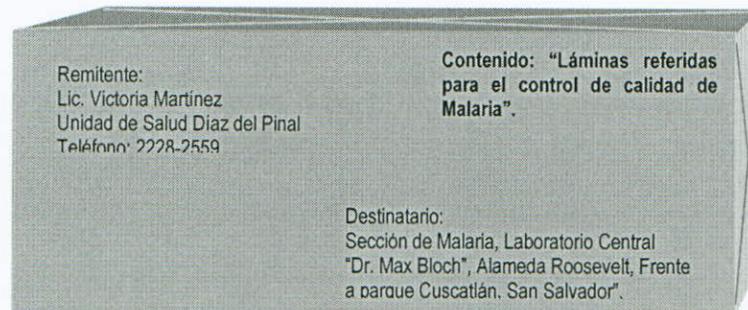


Figura 5.1: Ejemplo de Paquete de láminas para el transporte de muestras referidas a Control de Calidad para el Diagnóstico de la Malaria.

- Se evalúan los siguientes aspectos.
- a) Calidad técnica de la preparación de la muestra, de acuerdo a los siguientes criterios: Identificación, cantidad, tamaño y grosor de la muestra.
- b) Calidad de la coloración de la muestra: El fondo de la muestra debe ser transparente y lo más claro posible sin existencia de precipitado. Se deben comprobar sistemáticamente los colores de los elementos, siempre en el mismo orden como sigue: Azul los restos de glóbulos rojos, de rosa intenso a violeta las plaquetas, de azul intenso a violeta los núcleo de leucocitos, azul pálido el citoplasma de los linfocitos y azul el citoplasma de los monocitos.
- c) Grosor: Se mide teniendo como parámetro un promedio de 10 a 20 leucocitos por campo microscópico 100x.
- d) Densidad de parásitos reportada.
- e) Concordancia entre el resultado del evaluado y el evaluador.

5.1.6. Fuentes de error:

- Identificación incorrecta de la muestra
- Deterioro de muestras por manejo inadecuado de las láminas.
- Muestras no representativas en cuanto a su cantidad, tamaño y grosor.

- Formulario LAB-2 con información incorrecta.

5.1.7. Forma de reporte:

Si el control de calidad es concordante:

Se informa mensualmente a los jefes de laboratorio y a los microscopistas participantes el resultado obtenido de las muestras enviadas.

Si en el control de calidad se encuentran discordancias:

- a) Se informa de inmediato al microscopista responsable del error y al supervisor departamental de vectores vía telefónica, para que se corrijan los errores detectados.
- b) Se devuelve la lámina problema al microscopista responsable del error con sus respectivas observaciones.
- c) Se envía un informe mensual con los resultados obtenidos en el control de calidad para los jefes de laboratorio y a los microscopistas participantes.

5.1.8. Responsable: Microscopistas del diagnóstico laboratorial de la Malaria del Laboratorio Central y nivel local.

5.2. Control de Calidad Anual.

5.2.1. Propósito: Evaluar el desempeño de los microscopistas que realizan el diagnóstico de la Malaria por medio de un panel de láminas caracterizadas por el personal de Malaria del Laboratorio Central.

5.2.2. Muestra requerida: Láminas con muestras de diagnóstico laboratorial de *Plasmodium*, caracterizadas por el Laboratorio Central.

5.2.3. Materiales:

- Formulario de respuestas del control de calidad del diagnóstico anual (Anexo 5).
- Tirro.
- Papel craft.
- Marcador de vidrio.

5.2.4. Procedimiento:

- El Laboratorio Central con una periodicidad de una vez al año, envía a los microscopistas del diagnóstico laboratorial de la Malaria, un panel de láminas conteniendo muestras positivas o negativas a *Plasmodium*.
- Las láminas se envían con un código de identificación.
- Cada panel lleva un formulario que el microscopista evaluado llena completamente.
- El evaluado debe observar lo siguiente:
 - a. Presencia o no de *Plasmodium*.
 - b. La especie.

- c. Los estadios.
- d. La densidad parasitaria.
- El microscopista dispone de un plazo máximo de 15 días para enviar su reporte al Laboratorio Central, devolviendo las láminas proporcionadas, tomando en consideración los cuidados que se explican en el “Control de calidad semanal”, en este manual, página No. 7.
- Se evalúan los siguientes aspectos:
 - a. Concordancia entre el resultado del evaluado y el del control de calidad del Laboratorio Central.
 - b. Densidad de parásitos reportada.
 - c. La forma correcta de llenado del formulario de reporte.

5.2.5. Fuentes de error:

- Deterioro de muestras por manejo inadecuado de las láminas.
- Llenado del formulario de forma incorrecta.

5.2.6. Forma de reporte:

- El resultado de la evaluación del control de calidad de cada uno de los participantes, se envía a través de los supervisores de vectores o por medio del Supervisor de Laboratorio Clínico.
- Si el resultado del control de calidad es concordante: se le informa por escrito al participante.
- En aquellos casos que los microscopistas no obtengan el 100% de concordancia, además de informarles por escrito, se les apoya con una nueva capacitación sobre el diagnóstico microscópico de *Plasmodium* y se analizan otras posibles causas del error.

5.2.7. Responsables: Microscopistas del diagnóstico laboratorial de la Malaria del Laboratorio Central y nivel local.

5.3. Evaluación Externa del Desempeño:

5.3.1. Propósito: Evaluar el desempeño de los microscopistas de la sección de Malaria del Laboratorio Central, a través de un panel de láminas enviadas por un organismo internacional especializado.

5.3.2. Muestra requerida: Láminas con muestras sanguíneas negativas o positivas de las cuatro especies de *Plasmodium* enviadas por el organismo internacional.

5.3.3. Materiales:

- Información clínica de cada muestra.
- Formato para el reporte de resultados.
- Papel limpia lentes.
- Aceite de inmersión.

5.3.4. Equipo:

- Microscopio.

5.3.5. Procedimiento:

- Colorear con Giemsa las láminas que contienen muestras sanguíneas, tal como se describe en el procedimiento 6.2.4. de la página 19.
- Observar las muestras coloreadas al microscopio.
- Evaluar la información clínica recibida con cada lámina.
- Comparar los resultados con la información clínica recibida.
- Reportar los resultados en el formato indicado.

- Remitir resultados del diagnóstico por vía electrónica o fax al organismo internacional especializado responsable de la evaluación externa del desempeño en el plazo indicado a partir de la recepción de las muestras.

5.3.6. Fuentes de error:

- Identificación incorrecta de la muestra.
- Deterioro de muestras por manejo inadecuado de las láminas.
- Muestras no representativas en cuanto a su cantidad, tamaño y grosor.
- Formulario con información incorrecta.

5.3.7. Forma de reporte:

Se reportan los resultados obtenidos en la Sección de Malaria del Laboratorio Central en un formato recibido junto con el panel de láminas, el cual contiene los siguientes parámetros:

- Fecha de recepción de láminas.
- Fecha de envío de resultados.
- Código de Laboratorio participante.
- Técnica de tinción empleada.
- Identificación de la lámina.
- Resultado correspondiente en caso positivo especificar la especie y el estadio del *Plasmodium*.
- Comentarios.

El organismo internacional envía el análisis de este control de calidad en forma codificada para que el laboratorio participante se autoevalúe.

5.3.8. Responsables: Microscopistas del diagnóstico laboratorial de la Malaria del Laboratorio Central y organismo internacional evaluador.

6. DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE LA MALARIA.

En el MSPAS se realiza el diagnóstico de la Malaria a través del examen microscópico de la gota gruesa, en el que se observan los diferentes estadios del *Plasmodium*; éste es considerado el estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad, que proporciona información sobre la presencia del parásito y la estimación de la densidad parasitaria, ya que es útil para evaluar la respuesta al tratamiento. El diagnóstico microscópico de la Malaria se ejecuta a través de cuatro procedimientos.

- Toma de muestra (gota gruesa).
- Coloración de la gota gruesa (método de Giemsa).
- Observación microscópica de la muestra.
- Cálculo de la densidad parasitaria.

6.1. Toma de muestra de gota gruesa.

6.1.1. Propósito: Obtener una muestra adecuada que cumpla con los requisitos establecidos como: tamaño, ubicación y grosor, lo cual permite identificar microscópicamente las formas del parásito, brindando un resultado oportuno, confiable y de calidad.

6.1.2. Muestra requerida: Sangre periférica o venosa recién tomada.

6.1.3. Materiales y Reactivos:

- Formulario de registro de identificación LAB-2.
- Lancetas estériles descartables.
- Algodón.
- Papel toalla.
- Alcohol etílico al 70%.
- Jeringas de 3 cc por 1 ½ mm.

- Láminas portaobjetos 3 x 1", esmeriladas.
- Caja de baquelita porta láminas.
- Lápiz grafito.
- Guantes descartables.
- Recipiente para descarte de material corto punzante.

6.1.4. Procedimiento:

- Verificar que las láminas se encuentren limpias, desengrasadas y de preferencia nuevas para que no haya interferencia con la adhesión de la sangre a la superficie de la misma. (Anexo 6)
- Identificar la lámina con lápiz grafito o indeleble, anotando en el esmeril de ésta: el número correlativo y clave del establecimiento o del colaborador voluntario.
- Frotar la yema del dedo del paciente que se punciona, de preferencia en el dedo anular de la mano izquierda o en el caso de los niños menores de 3 años el talón del pie o el lóbulo de la oreja.
- Limpiar con algodón y alcohol al 70%.
- Limpiar con algodón seco y puncionar en forma rápida con la lanceta según Figura 6.1.
- Descartar la primera gota de sangre.
- Hacer una leve presión en el dedo puncionado, en una lámina portaobjeto coloque dos gotas de sangre, una en cada extremo. Utilizando la esquina de otra lámina para extender la sangre de manera uniforme formando un rectángulo aproximado de 1.5 x 1.0 cm. (Figura 6.2 - 6.4)

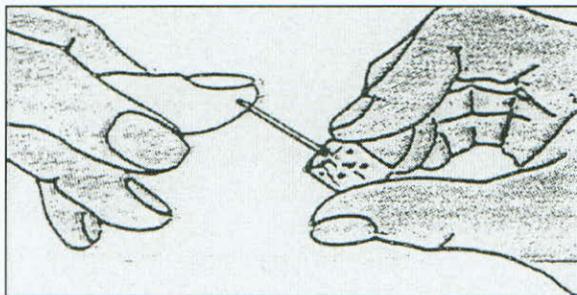


Figura 6.1: Punción para la toma de muestra de gota gruesa

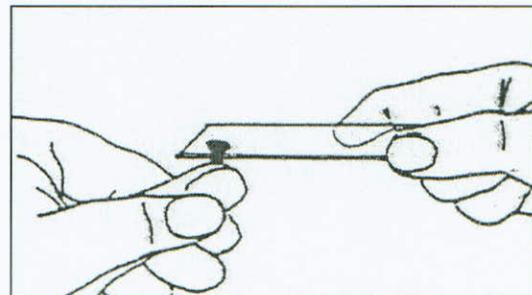


Figura 6.2: Colocación de la gota de sangre en la lámina portaobjeto

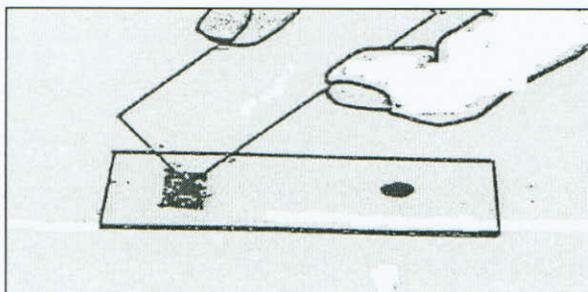
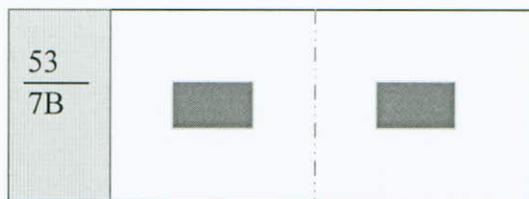


Figura 6.3: Extendido de la sangre usando la esquina de otra lámina.



Identificación: 53 es el # correlativo de la muestra en el establecimiento; 7 el código del Departamento y B corresponde al Hospital de Suchitoto

Figura 6.4: Forma correcta de ubicar la gota gruesa de sangre

- Presionar el área de punción con una torunda de algodón seco para interrumpir el sangrado.
- Dejar secar la gota gruesa por 30 minutos a temperatura ambiente sobre una superficie plana.

6.1.5. Fuentes de error:

- Muestra inadecuada por su tamaño, ubicación y grosor.
- Identificación incorrecta.
- Uso de láminas portaobjetos no desengrasadas previamente.
- Punción inadecuada en el caso que sea dactilar.
- Muestra de sangre diluida: con alcohol, sudor o linfa.
- Falta de uniformidad en el extendido de la gota gruesa.

6.1.6. Responsables: Microscopistas del diagnóstico laboratorial de la Malaria, médicos, enfermeras o auxiliar de enfermería, colaborador voluntario del programa de la Malaria.

6.1.7. Tiempo estimado de la toma de muestra: 10 minutos

6.2. Coloración de la gota gruesa (método de Giemsa).

6.2.1. Propósito: Colorear láminas de muestras con colorante de Giemsa para la identificación de los diferentes estadios del parásito. Esta coloración se basa en destruir o deshemoglobinizar los glóbulos rojos y teñir los leucocitos, plaquetas, parásitos hemáticos y bacterias.

6.2.2. Muestra requerida: Lámina de gota gruesa.

6.2.3. Materiales y Reactivos:

- Bandeja de coloración.
- Láminas con las gotas gruesas (secas).
- Lápiz grafito.
- Colorante Giemsa concentrado.
- Papel filtro.
- Frasco de vidrio color ámbar.
- Frasco de vidrio boca ancha.
- Soporte de láminas para secado.
- Frascos de vidrios para hacer dilución.
- Guantes descartables.
- Papel toalla.
- Embudo.
- Cilindro graduado o pipeta.

6.2.4. Procedimiento:

Preparar la dilución del colorante de Giemsa de la siguiente manera:

- Homogenizar la solución de Giemsa antes de filtrar (Anexo 7).
- Filtrar el colorante de Giemsa a diluir.
- Diluir dos gotas de solución de Giemsa por cada mL de agua destilada y mezclar bien. Se debe preparar sólo la cantidad a utilizar, ya que los colorantes diluidos pierden su acción rápidamente.

Una vez preparada la dilución de colorante de Giemsa:

- Colocar la lámina en bandeja de coloración o en un lugar con superficie plana.
- Cubrir la lámina portaobjeto con el colorante diluido de Giemsa por 10 a 15 minutos, procurando que no se derrame. El tiempo dependerá de acuerdo a la calidad, maduración del colorante y calidad de la muestra.
- Sumergir brevemente 2 veces la lámina portaobjeto en un frasco de boca ancha conteniendo agua destilada o de grifo para eliminar exceso de colorante.
- Dejar secar en una gradilla.
- Verificar que el número correlativo de la muestra y clave de identificación del establecimiento o colaborador voluntario esté intacto.

6.2.5. Fuentes de error:

- Falta de maduración del colorante.
- No homogenizar el colorante antes de filtrar.
- No filtrar el colorante de Giemsa antes de la dilución.
- Dilución inadecuada del colorante.
- No cumplir con los tiempos de coloración establecidos.
- Calidad defectuosa de la lámina portaobjeto.
- Calidad defectuosa del colorante de Giemsa.

6.2.6. Responsable: Microscopistas del diagnóstico laboratorial de la Malaria.

6.2.7. Tiempo estimado de la coloración de gota gruesa: 20 minutos.

6.3. Observación microscópica de la muestra.

6.3.1. Propósito: Identificar el *Plasmodium* y su especie, observando por lo menos 100 campos microscópicos en una gota gruesa. Se deben reconocer las características morfológicas del parásito en sus diferentes estadios de desarrollo: trofozoito, esquizonte y gametocito.

6.3.2. Muestra requerida: Lámina de gota gruesa coloreada con Giemsa.

6.3.3. Materiales y Reactivos:

- Papel lentes.
- Formulario LAB-2.
- Descarte de láminas.
- Aceite de inmersión (índice de refracción n_D^{20} 1.515-1.517 con viscosidad de 100-120 mPas).

6.3.4. Equipo:

- Microscopio binocular con objetivos 4x, 10x, 40x y 100x.

6.3.5. Procedimiento:

- Colocar la lámina sobre la platina del microscopio.
- Verificar la calidad de la coloración observando primero con el objetivo 10x.
- Colocar una gota de aceite de inmersión en la lámina coloreada.
- Enfocar con el objetivo 100x hasta que haga contacto con el aceite de inmersión.
- Observar 100 campos siguiendo la pauta de movimiento recorriendo el campo de abajo hacia arriba y de izquierda a derecha como se indica en la Figura 6.5. cuando esta observación no permita identificar el parásito, se deben observar otros 100 campos o más.
- 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. Ver elementos formes de la sangre en la gota gruesa. (Anexo 8)

- Los parásitos deben observarse con la cromatina de color rojo oscuro y el citoplasma azul púrpura pálido.

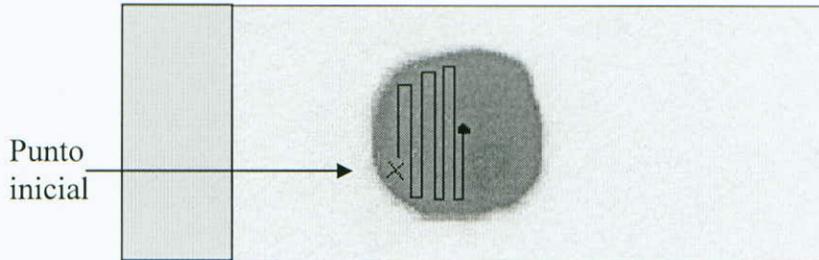


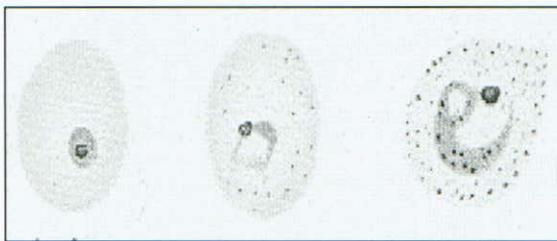
Figura 6.5: Recorrido microscópico para la lectura de Gota gruesa, usando objetivo 100x

En el *Plasmodium* se deben observar tres componentes:

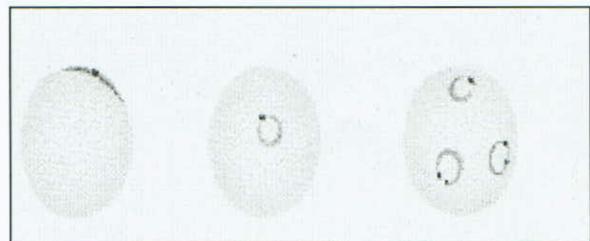
- a) El citoplasma azul.
- b) La cromatina roja o rosada.
- c) El pigmento amarillo a café oscuro a excepción de las formas anulares que carecen de este pigmento.

Trofozoíto:

Parásito en estado de crecimiento, antes de que ocurra la división celular.



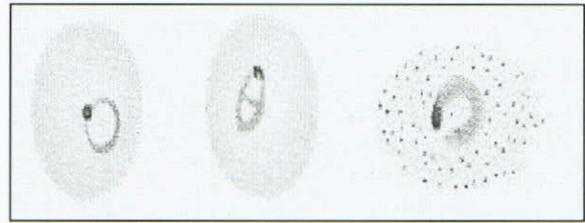
Trofozoíto de *P. vivax* – anillo joven, maduro, trofozoíto



Trofozoíto de *P. falciparum* – forma marginal, anillo, doble anillo



Trofozoíto de *P. malarie* – forma anillo, banda temprana, banda

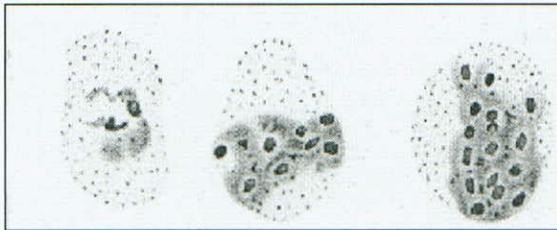


Trofozoíto de *P. ovale* – anillo joven, viejo, forma de cometa

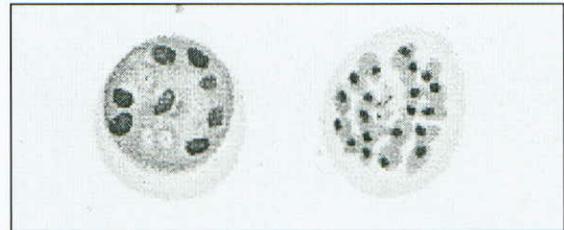
Esquizonte:

En este estadio el parásito empieza a reproducirse, esta reproducción se le denomina asexual por que el parásito no es hembra ni macho pero se reproduce por simple división celular. Hay varias fases en este estadio: desde parásitos con dos fragmentos de cromatina hasta aquéllos con muchos puntos de cromatina y citoplasma definido.

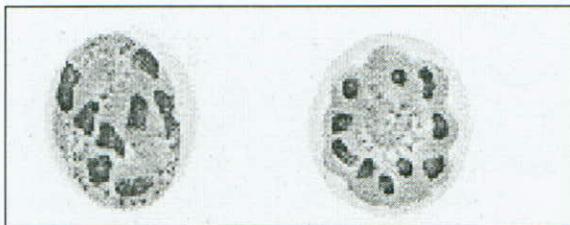
Al proceso de formación de esquizontes se le denomina esquizogonia; en la sangre se le llama **esquizonte sanguíneo** y en el hígado **esquizonte tisular**.



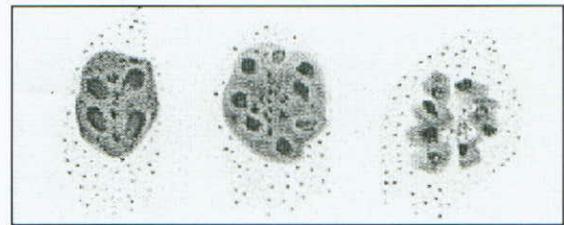
Esquizontes de *P. vivax* – temprano, Esquizonte, maduro



Esquizonte de *P. falciparum* – Esquizonte, maduro



Esquizonte de *P. malarie* – Temprano, maduro



Esquizonte de *P. ovale* – joven, Esquizonte, maduro

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*.

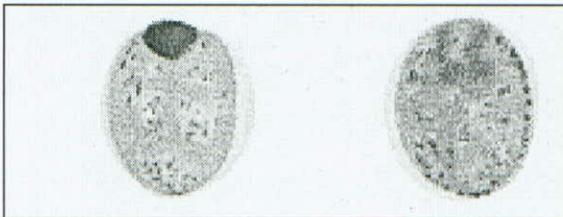
Los gametocitos pueden tener forma redonda o forma de banano o luna creciente, dependiendo de la especie. La forma en que el parásito se colorea, permite identificar si es un gametocito hembra o macho. El pigmento malárico es un producto del metabolismo del parásito y no se colorea, pero tiene su propio color, el cual oscila entre amarillo pálido hasta café oscuro o negro, éste se observa en todos los estadios con excepción del trofozoíto



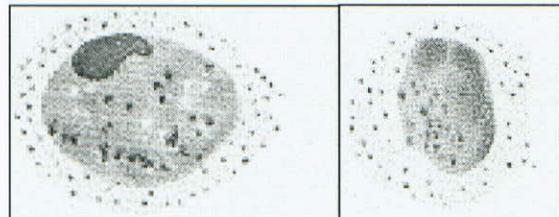
Gametocito de *P. vivax* – temprano, femenino, masculino



Gametocito de *P. falciparum* – femenino, masculino



Gametocito de *P. malariae* - femenino



Gametocito de *P. ovale* – femenino, masculino

6.3.6. Fuentes de error:

- Observar menos de 100 campos microscópicos en la muestra de gota gruesa.
- No aumentar proporcionalmente el número de campos microscópicos examinados, cuando exista un inadecuado grosor y coloración de la muestra.
- No observar 100 campos microscópicos siguiendo la pauta de movimiento recorriendo el campo de abajo hacia arriba y de izquierda a derecha.

- Utilizar aceite de inmersión de diferente índice de refracción y viscosidad al recomendado.

6.3.7. Forma de reporte:

En ausencia del parásito reportar:

No se observa *Plasmodium*.

Al observar el parásito reportar:

Género, especie, estadio y densidad parasitaria del *Plasmodium* (Ver ejemplos en páginas 27 - 29)

6.3.8. Responsable: Microscopistas del diagnóstico laboratorial de la Malaria.

6.3.9. Tiempo estimado de observación de gota gruesa: 5 minutos.

6.4. Densidad parasitaria.

6.4.1. Propósito: Contribuir con el epidemiólogo a calcular la proporción de parasitemias elevadas y por lo tanto a tener conocimiento de una transmisión reciente, así mismo contribuye a evaluar el tratamiento adecuado del paciente.

Este cálculo es importante hacerlo debido a que es más probable que la identificación de la especie sea correcta cuando se efectúa sobre la base de un gran número de parásitos.

6.4.2. Muestra requerida: Lámina de gota gruesa coloreada con Giemsa.

6.4.3. Materiales y Reactivos:

- Papel limpia lentes.
- Formulario LAB-2.
- Descarte de láminas.
- Aceite de inmersión (índice de refracción n_D^{20} 1.515-1.517 con viscosidad de 100-120 mPas).

6.4.4. Equipo:

- Microscopio binocular con objetivos 4x, 10x, 40x y 100x.

6.4.5. Procedimiento:

- Observar al microscopio con el objetivo 100x.
- Establecer la presencia del *Plasmodium*.
- Contar los parásitos encontrados en cada campo.
- Anotar el número de parásitos por campo. (Anexo 12)
- Calcular la densidad parasitaria establecida con el número de parásitos en 100 campos microscópicos observados. (Anexo 12)

6.4.6. Fuentes de error:

- Observar menos de 100 campos microscópicos en la muestra de gota gruesa.

- No aumentar proporcionalmente el número de campos microscópicos examinados, cuando exista un inadecuado grosor y coloración de la muestra.
- No observar 100 campos microscópicos siguiendo la pauta de movimiento recorriendo el campo de abajo hacia arriba y de izquierda a derecha.
- Utilizar aceite de inmersión de diferente índice de refracción y viscosidad al recomendado.

6.4.7. Forma de reporte:

Se reporta el total de *Plasmodium* encontrados en los 100 campos de la forma siguiente:

$$\text{Densidad parasitaria} = \text{Número de } \textit{Plasmodium} / 100$$

A continuación se presentan varios ejemplos de la forma de reportar resultados obtenidos de una gota gruesa:

Para ello se utilizarán las siguientes abreviaturas:

F= Estadios asexuales sanguíneos de *Plasmodium falciparum*.

Fg= Gametocitos de *Plasmodium falciparum*.

V= Diferentes estadios sanguíneos de *Plasmodium vivax*.

Ejemplo 1:

Al observar 100 campos microscópicos de gota gruesa y no encontrar parásitos de *Plasmodium*.

Reportar: No se observa *Plasmodium* en 100 campos microscópicos observados

Ejemplo 2:

Al observar 100 anillos de *Plasmodium falciparum* en los 100 campos microscópicos.

Reportar: Positivo a *Plasmodium falciparum* 100 F/100 campos microscópicos observados.

Ejemplo 3:

Al observar 100 gametocitos de *Plasmodium falciparum* en los 100 campos microscópicos.

Reportar: Positivo a *Plasmodium falciparum* 100 Fg/100 campos microscópicos observados.

Ejemplo 4:

Al observar más de 20 anillos de *Plasmodium falciparum* por campo microscópico.

Reportar: Positivo a *Plasmodium falciparum* incontables F/100 campos microscópicos observados.

Ejemplo 5:

Al observar más de 20 anillos por campo y 50 gametocitos de *Plasmodium falciparum* en 100 campos microscópicos.

Reportar: Positivo a *Plasmodium falciparum* incontables F y 50 Fg/100 campos microscópicos observados.

Ejemplo 6:

Al observar 100 parásitos de diferentes estadios de *Plasmodium vivax* en 100 campos microscópicos.

Reportar: Positivo a *Plasmodium vivax* 100 V/100 campo microscópicos observados.

Ejemplo 7:

Al observar más de 20 parásitos de *Plasmodium vivax* de diferentes estadios por campo microscópico.

Reportar: Positivo a *Plasmodium vivax* incontables V/100 campos microscópicos observados.

Ejemplo 8:

Al observar 100 parásitos de los diferentes estadios de *Plasmodium vivax* y 30 gametocitos de *Plasmodium falciparum* en 100 campos.

Reportar: Positivo a *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* 100 V y 30 Fg/100 campos microscópicos observados

6.4.8. Responsable: Microscopistas del diagnóstico laboratorial de la Malaria.

6.4.9. Tiempo estimado: 5 minutos.

7. REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN.

Este manual será revisado y actualizado al menos cada 5 años por un equipo técnico multidisciplinario y con asesoría técnica, a fin de integrar los conocimientos y experiencias en el área.

8. GLOSARIO DE TÉRMINOS.

AGENTE INFECCIOSO DEL PALUDISMO: Parásito del género *Plasmodium* de las especies *vivax*, *falciparum*, *malariae* y *ovale*

ANILLO: Trofozoíto joven del plasmodio que consta de una vacuola grande rodeada por citoplasma y una masa de cromatina. Ocasionalmente, se observan dos masas de cromatina (esto se llama "fragmentación" de la cromatina y no representa división nuclear).

CARACTERIZAR: Determinar los atributos particulares de una lámina de gota gruesa para control de calidad del diagnóstico de la Malaria.

ESPOROGONIA: Ciclo vital del plasmodio dentro del mosquito (reproducción sexual).

ESQUIZONTE: Forma durante la cual ocurre división asexual.

ESQUIZOGONIA: Ciclo vital del *Plasmodium sp.* dentro del humano (Reproducción asexual)

ESQUIZONTE INMADURO: Estadio de la reproducción asexual del *Plasmodium sp.* Contiene dos o más masas de cromatina; pero sin división del citoplasma.

ESQUIZONTE MADURO: En este estadio del *Plasmodium sp.*, la división del núcleo y citoplasma es completa. Se observan grupos de parásitos individuales llamados 'Merozoítos'. Los gránulos de pigmento están más agrupados.

GAMETOCITO: Célula sexual del *Plasmodium* que se desarrolla dentro del eritrocito y permanece allí hasta que muere. Es el estado infeccioso para el mosquito; cuando se encuentra dentro de éste se convierte en gameto.

GRANULACIÓN: Granulaciones presentes en el citoplasma de los eritrocitos infectados; la granulación de Shüffner es característica de infecciones con *P. vivax* y *P. ovale*.

MACROGAMETOCITO: Célula sexual femenina del *Plasmodium sp.*

MEROZOITO: Es el estadio de división asexual del *Plasmodium sp.* Producido por división asexual (esquizogonia). Consiste de una masa de citoplasma y una única masa de cromatina.

MICROGAMETOCITO: Célula sexual masculina del *Plasmodium sp.*

MICROSCOPISTA DE LA MALARIA: Profesionales en laboratorio clínico y técnicos capacitados en el diagnóstico microscópico de la Malaria del MSPAS.

PAROXISMO: Fase de una enfermedad en que los síntomas se manifiestan en su máxima agudeza.

PIGMENTO: Hematina producida como resultado de la digestión de la hemoglobina por los parásitos del *Plasmodium sp.* Se observan partículas de pigmento en el citoplasma del parásito.

PLASMODIO: Protozooario parásito que produce la enfermedad del Paludismo.

TROFOZOÍTO MADURO: Trofozoíto más grande y avanzado, generalmente ocupando todo el interior del eritrocito. Presenta una única masa de cromatina y gránulos de pigmento.

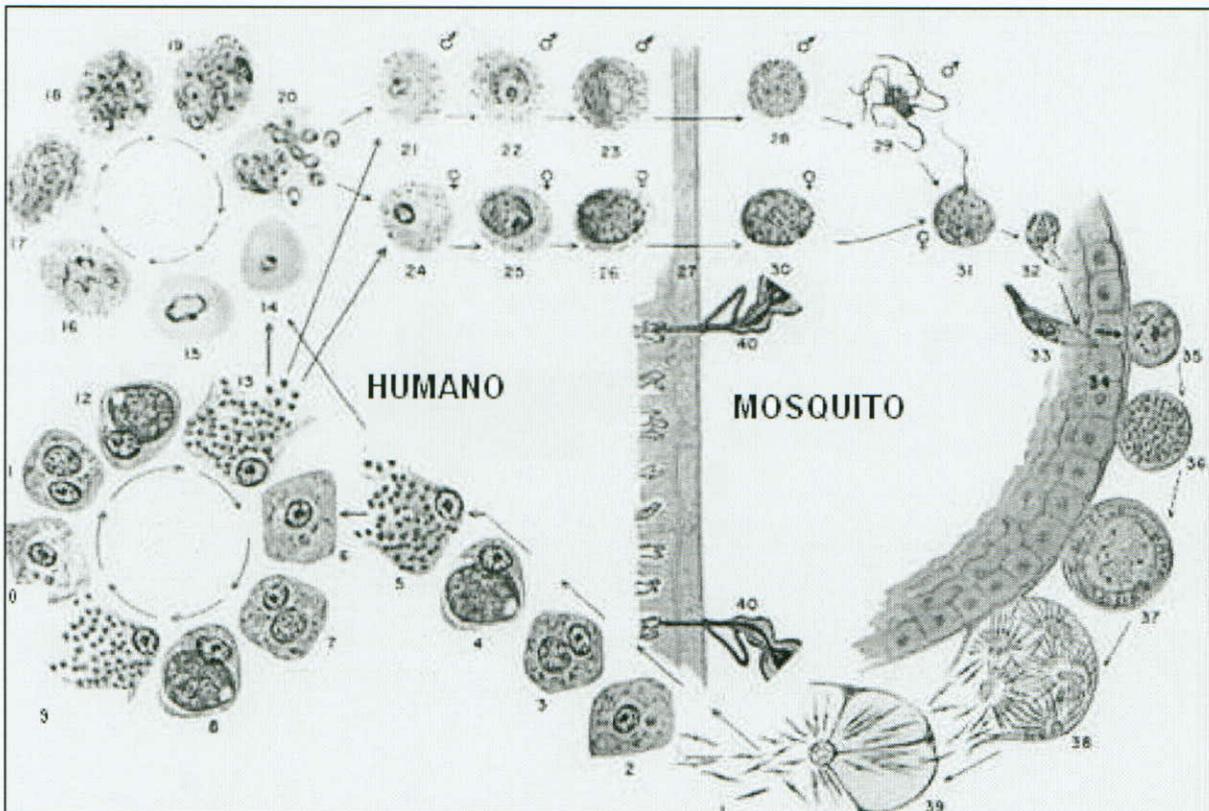
TROFOZOÍTO: Es el estadio más joven del *Plasmodium* (anillo) antes de que ocurra la división celular. Presenta cromatina y citoplasma.

9. ABREVIATURAS.

| | |
|-----------------------------------|---|
| BA | Buscador activo |
| CV | Colaborador voluntario |
| F | Estadios asexuales sanguíneos de <i>Plasmodium falciparum</i> |
| Fg | Gametocitos de <i>Plasmodium falciparum</i> |
| Hd | Hipoclorito disponible |
| MI | Mililitro |
| mPas | Minipascales |
| MSPAS | Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. |
| n_D²⁰ | Índice de Refracción de aceite de inmersión para microscopio |
| °C | Grados centígrados |
| p/p | Peso sobre peso. |
| SMO | Servicio médico oficial |
| Sp | Especie |
| V | Diferentes estadios sanguíneos de <i>Plasmodium vivax</i> |

10. ANEXOS.

Anexo 1: Ciclo biológico del *Plasmodium* en el humano y en el mosquito.



Humano.

Reproducción asexual. (Ciclo esquizogónico)

- 1-5 Fase pre-eritrocítica.
- 6-13 y 27 Fase exo-eritrocítica.
- 14-26 Fase eritrocítica.

Mosquito.

Reproducción sexual.

- 28-40 Ciclo Esporogónico

Anexo 2: Preparación para una solución porcentual de hipoclorito³

Propósito: Desinfectar adecuadamente las superficies de trabajo para disminuir los riesgos de contaminación con materiales biológicos peligrosos.

Para preparar una solución porcentual de hipoclorito, se debe tomar en cuenta, la concentración de Cloro activo indicado en el rótulo de hipoclorito o lejía, que se tiene disponible y utilizar las siguientes formulas:

1) Fórmula para calcular el volumen necesario de hipoclorito disponible (Hd).

$$\text{Volumen Hd} = \frac{\text{Volumen final} \times \% \text{ necesario}}{\% \text{ de Cloro activo de Hd.}}$$

Hd: hipoclorito disponible.

Volumen final: volumen deseado.

2) Cálculo para el volumen de agua que se adiciona:

Volumen de agua a preparar = volumen final – volumen de Hd adicionado.

Ejemplo: Preparar 2000 mL de Hipoclorito al 0.5%, a partir de lejía con el 6% de Cloro activo.

| | |
|-------------------------|---------|
| Volumen | 2000 mL |
| % de Cloro activo de Hd | 6% |
| % de Cloro necesario | 0.5% |

$$\text{Volumen Hd} = \frac{2000 \times 0.5}{6\%} = 166 \text{ mL}$$

166 mL de hipoclorito Hd

³ Ministerio de Salud pública y Asistencia Social Unidad de Laboratorio Central Dr. Max Bloch Manual de Bioseguridad de los Laboratorios Clínicos 2ª Edición 2005. El Salvador, C.A.

Volumen de agua adicionado = $2000 \text{ mL} - 166 \text{ mL} = 1834 \text{ mL}$.

$1834 \text{ mL da agua} + 166 \text{ mL de hipoclorito al } 6\% = 2000 \text{ mL de hipoclorito al } 0.5\%$.

Nota:

- a) El hipoclorito debe ser preparado diariamente.
- b) El hipoclorito de sodio es un oxidante poderoso, motivo por el cual no debe ser utilizado para desinfectar objetos o superficies de metal, lo más recomendable es hacerlo con alcohol etílico al 70% (p/p).⁴

⁴ Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social Unidad de Laboratorio Central Dr. Max Bloch Manual de Bioseguridad de los Laboratorios Clínicos 2ª Edición 2005. El Salvador, C.A.



Anexo 3: Reporte epidemiológico.



Nombre del formato: Lab-2.

Utilización: Notificación de sospecha de diagnóstico de la Malaria (LAB-2).

REPORTE EPIDEMIOLÓGICO LAB-2.

| CV | <input type="radio"/> | Fecha de examen: | | | N° Semana: | |
|-------|-----------------------|------------------|------|------|--------------------------------|-----------|
| SMO | <input type="radio"/> | Departamento: | | | Láminas examinadas: | |
| BA | <input type="radio"/> | Municipio: | | | Casos: | |
| Mes | _____ | Cantón: | | | <i>Plasmodium vivax</i> : | |
| Año | _____ | Caserío: | | | <i>Plasmodium falciparum</i> : | |
| Clave | N° Lámina | Fecha | Edad | Sexo | Código | Resultado |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

CV = Colaborador voluntario, SMO = Servicio Médico Oficial, BA= Buscador activo.

Nombre completo del Microscopista responsable

Sello Institución

INSTRUCTIVO DE LLENADO DE FORMULARIO LAB-2.

Nombre del formato: Reporte Epidemiológico LAB-2.

Propósito: Que los microscopistas del diagnóstico laboratorial de la Malaria y los profesionales de Laboratorio del MSPAS, cuenten con un formato estandarizado (LAB-2) para el registro de los datos.

Responsable del llenado: Todos los profesionales en laboratorio clínico y técnicos que realizan el diagnóstico microscópico de la Malaria e inspectores del programa de la Malaria del MSPAS.

Periodicidad: Semanalmente.

Descripción de llenado de formato

A continuación se describe la forma para el llenado del formato LAB-2.

Marcar con una X el cuadro que corresponde a la fuente de información:

CV: Colaborador voluntario (Col- Vol).

SMO: Servicio médico oficial.

BA: Búsqueda activa.

En las casillas

AÑO Y MES: Anotar el año y el mes que corresponde a la fecha que fue tomada la muestra

FECHA DE EXAMEN: Anotar la fecha en que se realizó el diagnóstico microscópico

DEPARTAMENTO: Se anotará el nombre del departamento de donde proceden las muestras.

MUNICIPIO: Se anotará el nombre completo de éste, de igual forma si proviene de **cantón o caserío**.

Nº SEMANA : Anotar el Nº de la semana epidemiológica que corresponde a la fecha del diagnóstico microscópico de las muestras enviadas a control de calidad.

LÁMINAS EXAMINADAS: Anotar el número total de láminas observadas en el laboratorio.

CASOS: anotar los casos de Malaria encontrados en la semana epidemiológica de este reporte y agregar a continuación en la casilla *vivax* y *falciparum* el número de especies encontradas según corresponda.

CLAVE DEL ESTABLECIMIENTO: Se anotará en esta casilla generalmente 2 caracteres: El primero corresponde al departamento (recordar que son 14 departamentos por lo que les corresponde del 1 al 14.

El segundo carácter identifica al informante, que puede ser un número o una letra. Si es un número corresponde a un colaborador voluntario, si es una letra corresponde a un establecimiento de salud (Unidad de Salud u Hospital).

Nº LÁMINA : Se anotará el número correlativo de la muestra del lugar de procedencia.

FECHA: Se anotará la fecha exacta de la toma muestra indicando día, mes y año.

EDAD: Se anotará en número indicando años y meses.

SEXO :indicar en la casilla donde corresponde si es del sexo femenino con una **F** y masculino con una **M**.

CÓDIGO: Es referente a la dirección donde vive actualmente el paciente, está generalmente compuesto por 4 caracteres: El primero indica el departamento, el segundo el municipio, tercero el cantón y cuarto el caserío. En los casos positivos se deberá anotar el nombre completo del paciente y la dirección exacta al reverso del formulario que permita ubicar con facilidad al paciente enfermo.

RESULTADO: En este espacio se anotará el resultado del examen de gota gruesa.

Si el resultado es negativo a *Plasmodium* debe decir **No se observa Plasmodium**. en 100 campos microscópicos observados. Y si es positivo deberá reportarse el género y la especie del parásito con su respectiva densidad parasitaria.

RESPONSABLE: anotar el nombre completo y la firma de la persona que realizó el diagnóstico.

SELLO Y NOMBRE DE LA INSTITUCIÓN: En este espacio debe anotarse el nombre de la Institución que reporta y su respectivo sello.



Anexo 4: Control de calidad semanal

Nombre del formato: Formulario de resultados del control de calidad semanal

Utilización: Envío de resultados de la evaluación del control de calidad semanal a los microscopistas participantes.

**MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
LABORATORIO CENTRAL “DR. MAX BLOCH”
SECCIÓN DE MALARIA
CONTROL DE CALIDAD SEMANAL**

FECHA: ___/___/___ ESTABLECIMIENTO _____

MUESTRA _____ RESPONSABLE _____

Nº DE MUESTRAS RECIBIDAS _____ Nº DE MUESTRAS VERIFICADAS _____

% DE CONCORDANCIA _____

OBSERVACIONES: _____

NOMBRE Y FIRMA RESPONSABLE NIVEL CENTRAL.

SELLO

Anexo 6: Limpieza y almacenamiento de las láminas.

Propósito: Obtener láminas portaobjetos apropiadas que cumplan con los requisitos establecidos para la toma de muestra de calidad en gota gruesa para el diagnóstico de la Malaria.

Tipo de muestra:

- Láminas portaobjetos 3 x 1", esmeriladas.

Las láminas portaobjetos son suministradas en cajas de 50 o 72. Aunque en la caja se describe como lavadas o pre-limpiadas, las láminas deben ser lavadas adecuadamente, secadas y envueltas.

Material y Reactivos:

- Un recipiente grande de plástico.
- Gasa.
- Detergente de buena calidad en polvo o líquido, aunque es más recomendable el detergente líquido.
- Dos a cuatro retazos de algodón seco, limpio y que no forme pelusa.
- Agua limpia.

Procedimientos:

Láminas nuevas:

- Todas las láminas nuevas deben lavarse con detergente y agua limpia Después de estar en remojo por un periodo de 30-60 minutos.
- Las láminas deben ser lavadas bajo agua corriente o en varios cambios de agua limpia.
- Cada lámina debe ser secada y pulida individualmente con retazo de tela seca, limpia y que no forme pelusa.
- Las láminas limpias y lavadas solamente deben manejarse tocándolas de los bordes para evitar que se deposite sucio o grasa en su superficie.

Láminas usadas:

- Para lavarlas se deben sumergir por uno o dos días en agua con detergente.
- Cuando sea posible se debe utilizar agua caliente. Después debe limpiarse uno por uno con gasa.
- Se deben remover todos los restos de muestras, colorante y aceite de inmersión. **Nota:** No se deben dejar las láminas en detergente por más del tiempo indicado (uno o dos días) porque si el agua se evapora, el detergente se deposita en la superficie de las láminas y es casi imposible de removerlo.
- Después de lavadas, 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.
- Cada lámina debe ser secada y pulida individualmente como se describió anteriormente.
- Las láminas que se clasifiquen como inapropiadas (rayadas, opacas, bordes astillados), deben descartarse.

Almacenamiento de las láminas:

Para almacenar correctamente las láminas se necesita:

- Hojas de papel limpio y delgado de aproximadamente 11x 15cm.
- Cajas de papel limpio y delgado de láminas vacías.
- Bandas elásticas o cinta adhesiva.

Las láminas limpias deben almacenarse en paquetes de 10 láminas envueltas en papel. Cada lámina 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.

Fuentes de error:

Utilizar láminas:

- Opacas.
- Sucias.
- Que tengan rayones en su superficie o bordes astillados.
- Con almacenamiento inadecuado.

Anexo 7: Solución de Giemsa (1000 mL).

La coloración de Giemsa dependerá de varios factores:

- La calidad del reactivo
- El tiempo de coloración, (varía según la maduración del colorante).

Equipo, material y reactivo:

- Balanza.
- Baño de María con termómetro con rango de 55-60° C.
- Reloj marcador de tiempo.
- Marcador indeleble.
- Guantes descartables.
- Espátula.
- Mortero 10 cm. y pistilo.
- Probeta graduada de 500 mL.
- Erlenmeyer 1000 mL.
- 50 perlas de vidrio.
- Frasco ámbar con cierre hermético.
- Papel Whatman N° 1.
- Viñetas.
- Embudo de 10 cm de diámetro.
- Giemsa en polvo certificado 6 g.
- Glicerina pura 500 mL.
- Alcohol metílico puro, absoluto 500 mL.

Procedimiento:

- Mezclar el Giemsa en polvo poco a poco con la glicerina en un mortero.
- Deposite en un erlenmeyer que contenga perlas de vidrio y disolver a baño de María a 55 °C – 60 °C por dos horas.
- Agitar suavemente a intervalos de 30 minutos.

- Con el alcohol metílico se lavan los restos de reactivo que quedaron en el mortero y se depositan en un frasco.
- Dejar que la mezcla de estos reactivos se enfríe para agregarle el alcohol.
- Mezclar y agitar bien, filtrar con papel Whatman N° 1 en un frasco oscuro que contenga cuentas de vidrio y que pueda cerrarse herméticamente.
- Almacenar durante al menos 2 semanas antes de usarlo.
- Mantenerse siempre bien tapado.
- Cuando se prepara una mayor cantidad, se recomienda fraccionar el colorante en varios frascos, rotulados y enumerados correctamente.

Anexo 8: Elementos formes de la sangre.

Es necesario reconocer las diferentes células y componentes encontrados en la sangre, ya que en la gota gruesa se encuentran.

- a) Leucocitos.
- b) Plaquetas o trombocitos.
- c) Restos de glóbulos rojos.

a) Leucocitos

Neutrófilo.

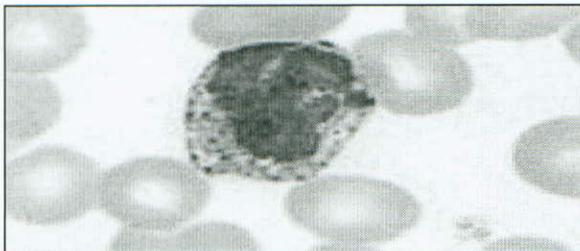
Poseen un núcleo segmentado, tienen gránulos bien definidos en el citoplasma y el núcleo que se colorea de púrpura intenso.



Neutrófilo.

Basófilo.

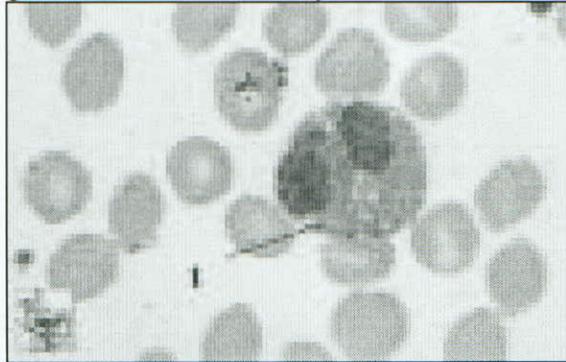
Tienen un núcleo bilobulado con gránulos superpuestos que se tiñen fuertemente de negro púrpura.



Basófilo.

Eosinófilos.

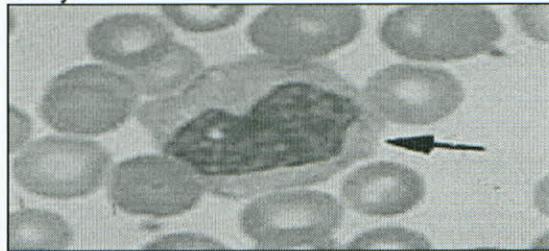
Este posee un núcleo segmentado no más de dos a tres lóbulos y su citoplasma está lleno por completo de gránulos color anaranjado.



Eosinófilos.

Monocito.

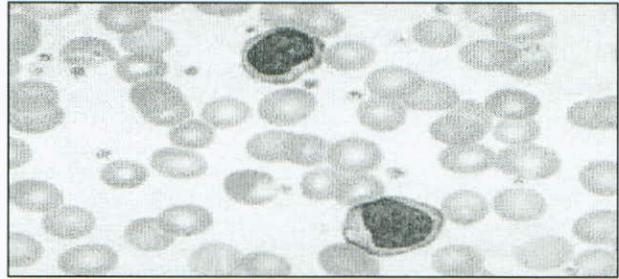
Célula de mayor tamaño en sangre periférica (con un promedio de 18 μ m), posee un núcleo con forma de riñón o frijol y el citoplasma es bastante delicado y a veces puede contener en poca cantidad gránulos de color rosado o rojo.



Monocito.

Linfocitos.

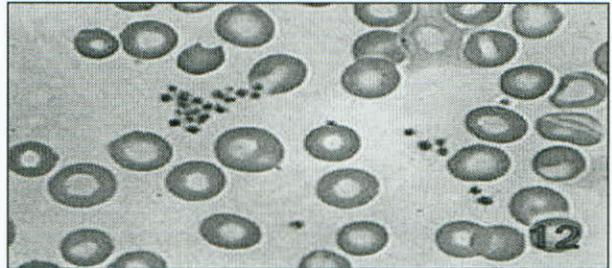
Tiene una variación de tamaño, todo depende de la cantidad de citoplasma presente, su núcleo tienen más o menos el tamaño de un eritrocito y su cromatina se condensa y se tiñe de color púrpura intenso, rodeado por un escaso citoplasma teñido de color azul cielo.



Linfocitos.

b) Plaquetas.

Son pequeños cuerpos de formas irregulares, color rojo y no poseen núcleo, se estiman 100.000 plaquetas por μL de sangre, con frecuencia aparecen en grupos de 5-10.



Plaquetas en frotis de sangre periférica.

c) Restos de glóbulos rojos.

Los restos de glóbulos rojos se originan por la deshemoglobinización causada por el colorante de Giemsa para que los *Plasmodium* que están dentro de ellos sean liberados.



Restos de glóbulos rojos en gota gruesa.

Anexo 9: Comparación de las especies de *Plasmodium*.⁵

| Especie Estadio | <i>Vivax</i> | <i>Falciparum</i> | <i>malariae</i> | <i>Ovale</i> |
|-------------------------------|--|---|---|---|
| Trofozoito en forma de anillo | Citoplasma grande con seudópodos ocasionales; con punto de cromatina. | Citoplasma delicado; 1-2 puntos pequeños de cromatina; ocasionalmente se observan formas marginales. | Citoplasma grueso; cromatina grande. | Citoplasma grueso; cromatina grande. |
| Trofozoíto | Citoplasma ameboideo grande; cromatina grande; pigmento fino café amarillo. | Muy raramente se observan en circulación porque están cito adheridos o secuestrados en la microvasculatura; citoplasma compacto; pigmento oscuro. | Citoplasma compacto; cromatina gruesa; pigmento café oscuro. Ocasionalmente formas en banda. | Compacto con cromatina gruesa; pigmento café oscuro. |
| Esquizonte | Grande, puede llenar todo el eritrocito; esquizonte maduro con 12-14 merozoitos; pigmento café-amarillo convergente. | Muy raramente se observan en circulación porque están cito adheridos o secuestrado en la microvasculatura; en el maduro 8-24 merozoitos pequeños, pigmento oscuro agrupado en masa. | Esquizonte maduro con 6-12 merozoitos con núcleos grandes alrededor de una masa de pigmento café oscuro, ocasionalmente en formas de margarita. | Esquizonte maduro con 6-14 merozoitos con núcleos grandes alrededor de una masa de pigmento café oscuro. |
| Gametocito | Redondo a oval; compacto; cromatina difusa (microgametocito) o compacta y excéntrica (macrogametocito) pigmento café disperso. | Forma de luna creciente o salchicha; cromatina difusa (microgametocito) o en una sola masa (macrogametocito). Masa de pigmento oscuro. | Redondo a oval, compacto; cromatina difusa (microgametocito) o excéntrica y compacta (macrogametocito). Pigmento café disperso. | Redondo a oval; compacto, cromatina difusa (microgame-tocito) o compacta y excéntrica (macrogametocito) pigmento café disperso. |

⁵ (Fuente: Comparación de las especies de *Plasmodium sp.* que parasitan a los seres humanos. División de Enfermedades Parasitarias, CDC, Atlanta, GA, Estados Unidos de América. Sitio Web: <http://www.cdc.gov>)

Anexo 10: Características de las diferentes especies de *Plasmodium* en la gota gruesa.⁶

Plasmodium vivax

1. Trofozoitos pequeños
2. Esquizontes 2 divisiones de cromatina
3. Esquizonte maduro
4. Microgametocito
5. Plaquetas
6. Núcleo de neutrofilo
7. Eosinofilo
8. Plaqueta adherida a restos de eritrocitos jóvenes

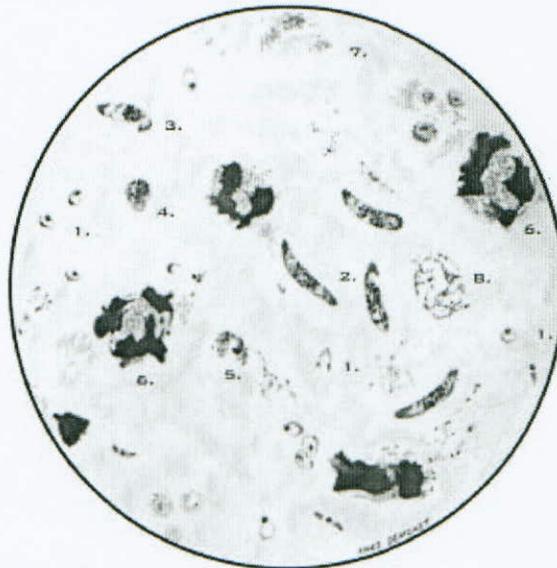


Cortesía de Centres for Disease Control and Prevention (CDC).

Plasmodium vivax. Observación de parásitos en muestra de gota gruesa.

Plasmodium falciparum

1. Trofozoitos pequeños
2. Gametocitos normales
3. Gametocitos ligeramente distorsionados
4. Gametocito con fondo superior redondeado
5. Gametocito desintegrado
6. Núcleos leucocitos
7. Plaquetas
8. Restos celulares de eritrocitos jóvenes



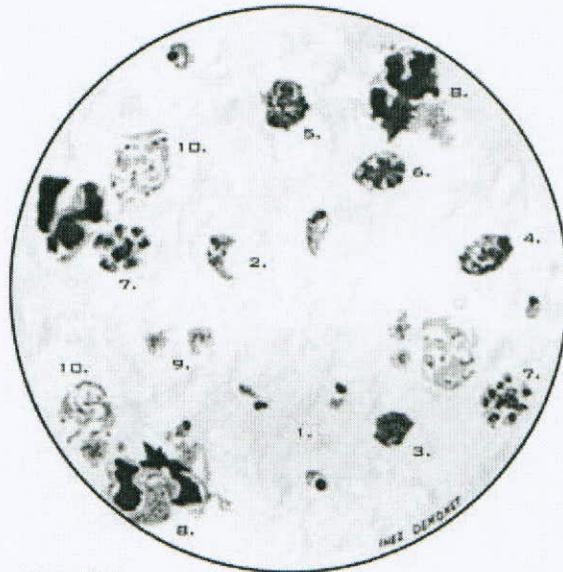
Cortesía de Centres for Disease Control and Prevention (CDC).

Plasmodium falciparum. Observación de parásitos en muestra de gota gruesa.

⁶ (Fuente: *Plasmodium spp.* Estadios sanguíneos, gota gruesa. División de Enfermedades Parasitarias, CDC, Atlanta, GA, Estados Unidos de América. Sitio Web: <http://www.cdc.gov>).

Plasmodium malariae

1. Trofozoitos pequeños
2. Trofozoitos desarrollados
3. Trofozoitos maduros
- 4, 5, 6. Esquizontes inmaduros con número variado de división de cromatina
7. Esquizonte maduro
8. Núcleos de leucocitos
9. Plaquetas
10. Restos celulares de eritrocitos jóvenes

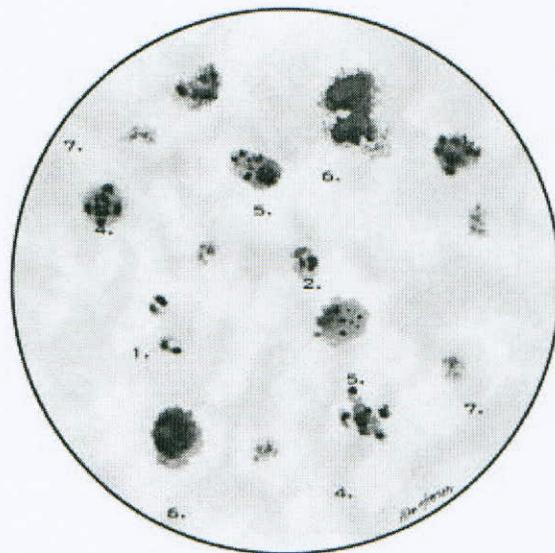


Cortesía de Centres for Disease Control and Prevention (CDC).

Plasmodium malariae. Observación de parásitos en muestra de gota gruesa.

Plasmodium ovale

1. Trofozoitos pequeños
2. Trofozoitos desarrollados
3. Trofozoitos maduros
4. Esquizontes
5. Gametocitos
6. Núcleos de leucocitos
7. Plaquetas

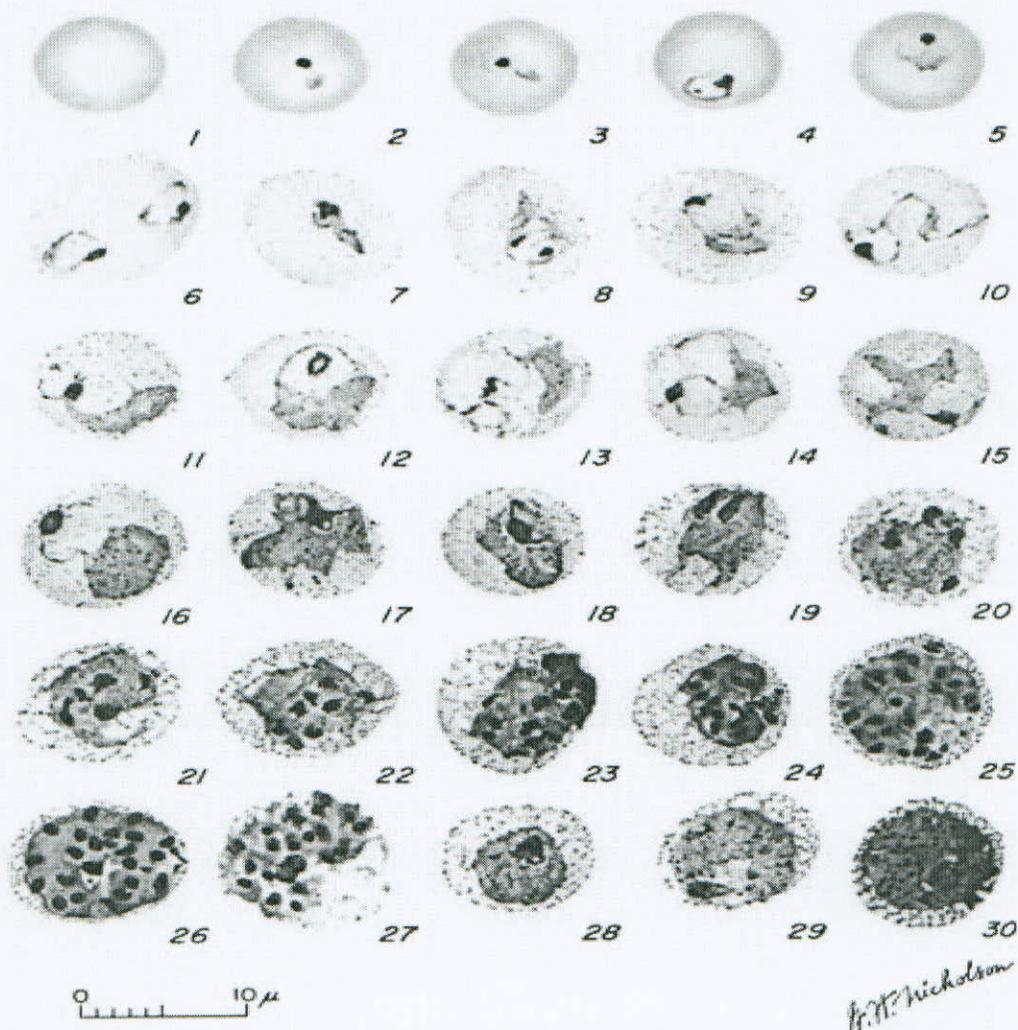


Cortesía de Centres for Disease Control and Prevention (CDC).

Plasmodium ovale. Observación de parásitos en muestra de gota gruesa.

Anexo 11: Características morfológicas de las diferentes especies de *Plasmodium* en el extendido fino.⁷

Plasmodium vivax



1. Eritrocito normal
2-6. Trofozoitos jóvenes (en estadio forma de anillo)
7-18. Trofozoitos

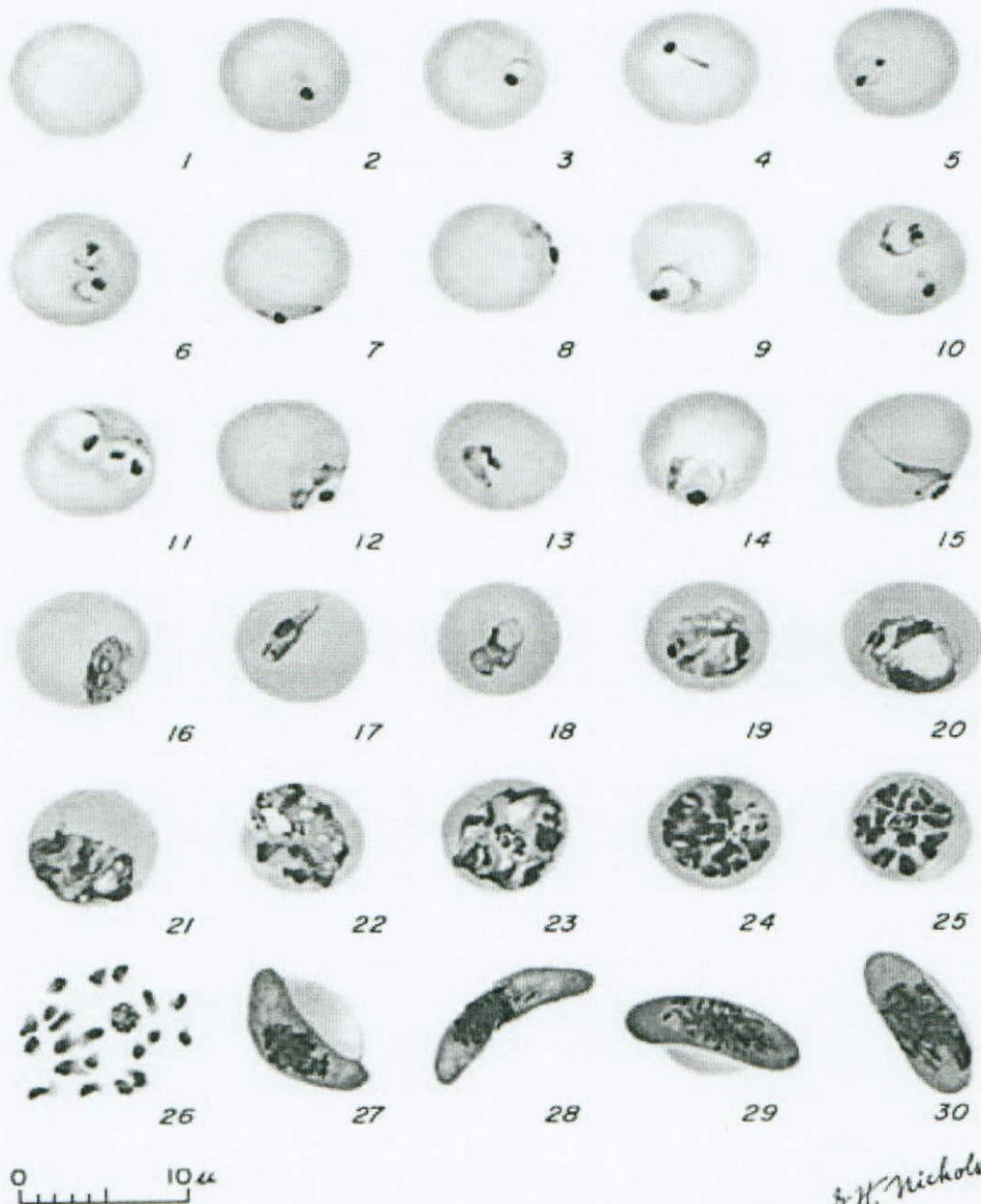
19-27. Esquizontes
28-29. Macrogametocito (femenino)
30. Microgametocito (masculino)

Cortesía de Centres for Disease Control and Prevention (CDC).

***Plasmodium vivax*. Observación de parásitos en muestra de frotis o extendido.**

⁷ (Fuente: *Plasmodium spp.* Estadios sanguíneos, extendido fino. División de Enfermedades Parasitarias, CDC, Atlanta, GA, Estados Unidos de América. Sitio Web: <http://www.cdc.gov>).

Plasmodium falciparum

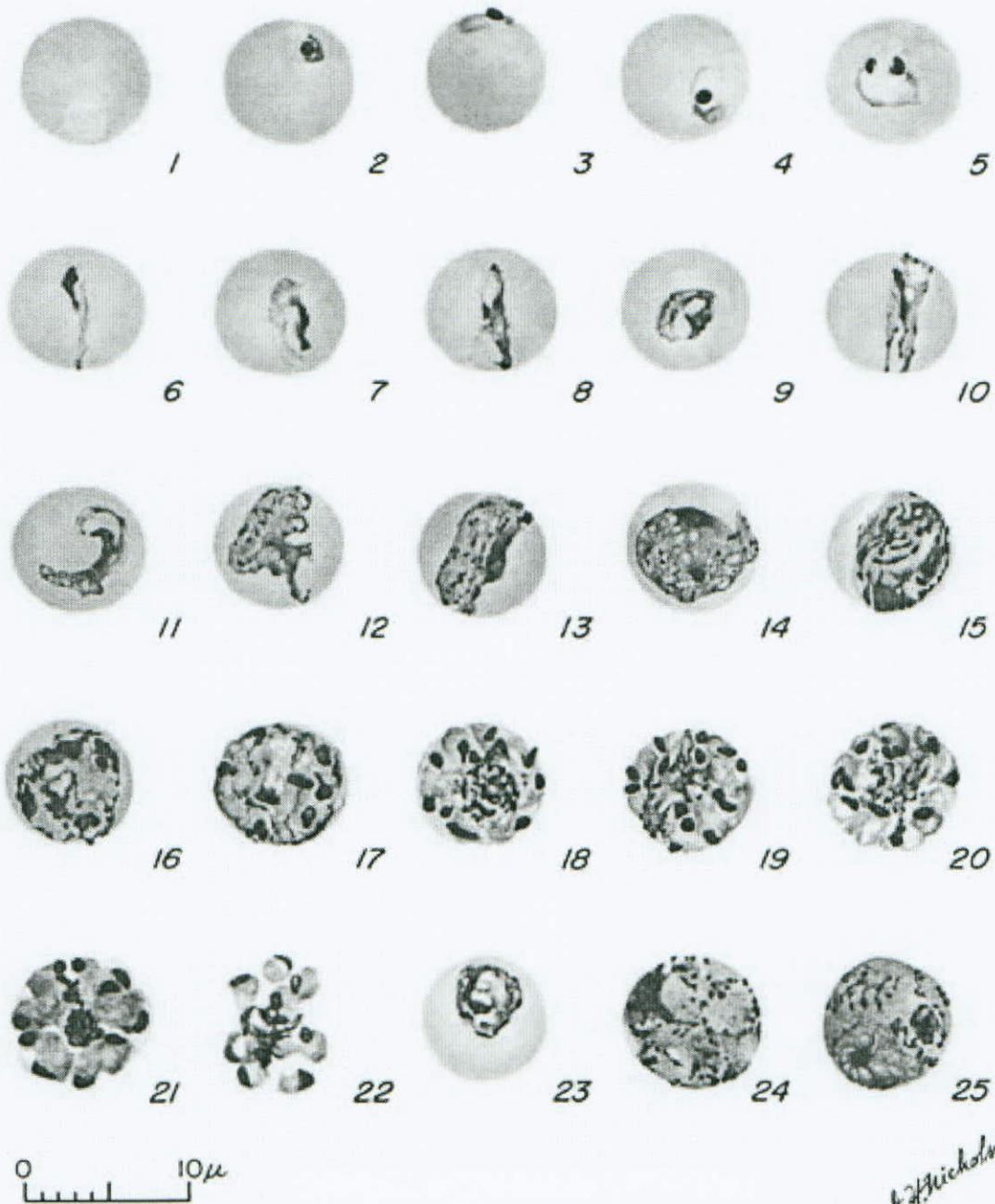


- 1. Eritrocito normal
- 2-18. Trofozoitos (entre éstos [2-10] corresponden a trofozoitos jóvenes)
- 19-26. Esquizontes ([26] un esquizonte roto)
- 27-28. Macrogametocito maduro (femenino)
- 29-30. Microgametocito (masculino)

Cortesía de Centres for Disease Control and Prevention (CDC).

***Plasmodium falciparum*. Observación de parásitos en muestra de frotis o extendido.**

Plasmodium malariae

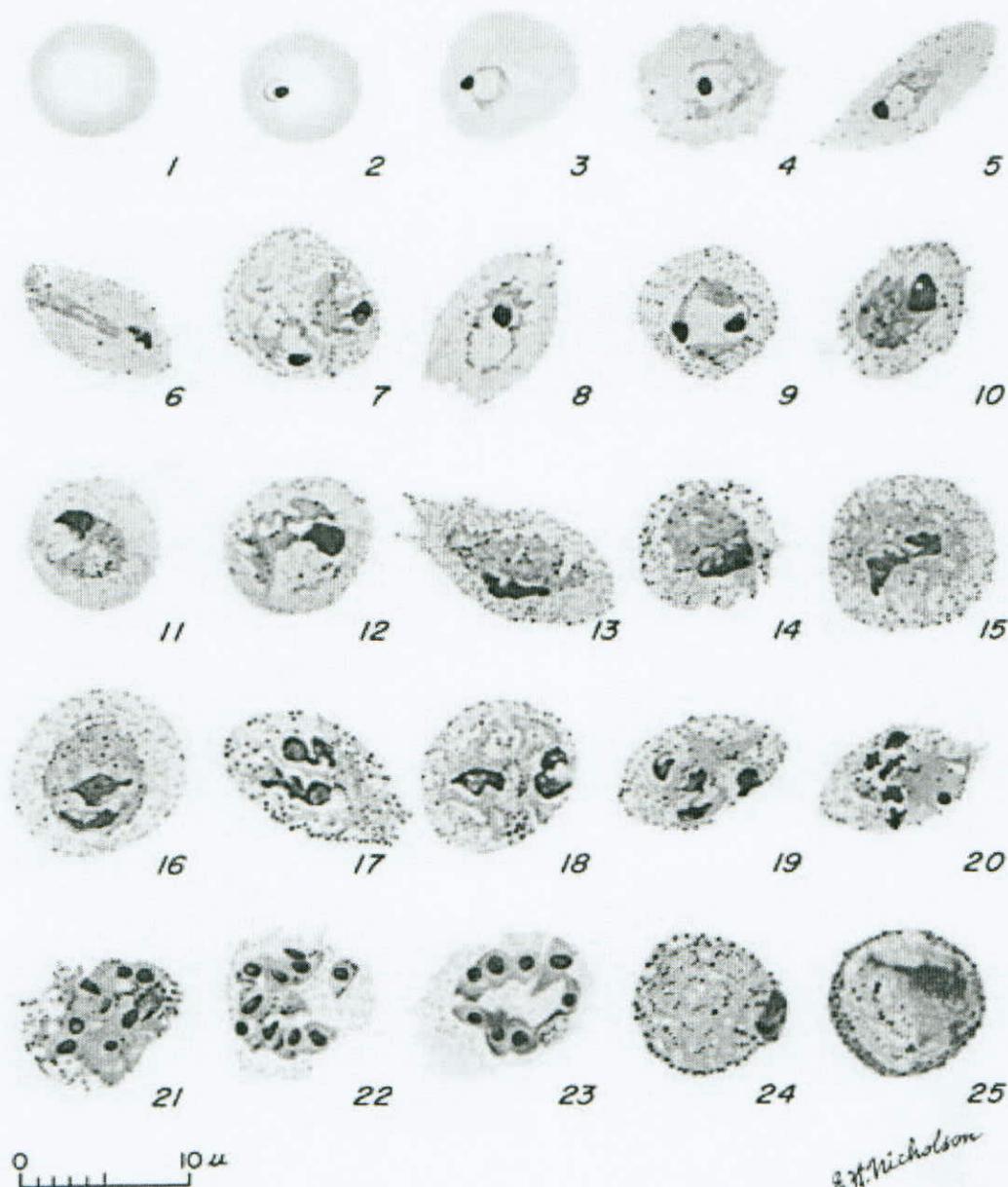


- | | |
|--|---------------------------------|
| 1. Eritrocito normal | 23. Gametocitos en desarrollo |
| 2-5. Trofozoitos jóvenes (forma de anillo) | 24. Macrogametocito (femenino) |
| 6-13. Trofozoitos | 25. Microgametocito (masculino) |
| 14-22. Esquizontes | |

Cortesía de Centres for Disease Control and Prevention (CDC).

***Plasmodium malariae*. Observación de parásitos en muestra de frotis o extendido.**

Plasmodium ovale



- 1. Eritrocito normal
- 2-5. Trofozoitos jóvenes (forma de anillo)
- 6-15. Trofozoitos

- 16-23. Esquizontes
- 24. Macrogametocito (femenino)
- 25. Microgametocito (masculino)

Cortesía de Centres for Disease Control and Prevention (CDC).

***Plasmodium ovale*. Observación de parásitos en muestra de frotis o extendido.**

Anexo 12: Protocolo para la observación microscópica de la gota gruesa.

Instrucciones:

Anotar en cada cuadro el número de parásitos observados por campo microscópico,

La tabla posee 100 casillas.

1. Comience a llenar la tabla de izquierda a derecha a partir del número 1.
2. Anotar el número de parásitos observados en cada campo en la casilla correspondiente, de manera que el campo 100 se anote en la casilla de la fila 10 y columna 10.
- 3 Al final de cada fila escriba el sub-total de parásitos y luego sume los sub-total.
4. Reportar la especie de *Plasmodium* y el total de parásitos encontrados en los 100 campos que corresponderá a la densidad parasitaria.

ESTABLECIMIENTO: _____

No. DE MUESTRA: _____

MICROSCOPISTA: _____

FECHA: ___/___/___

| | | C O L U M N A S | | | | | | | | | | |
|-----------------------|----|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | SUB-TOTAL |
| F I L A S | 1 | | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | | |
| | 5 | | | | | | | | | | | |
| | 6 | | | | | | | | | | | |
| | 7 | | | | | | | | | | | |
| | 8 | | | | | | | | | | | |
| | 9 | | | | | | | | | | | |
| | 10 | | | | | | | | | | | |
| TOTAL | | | | | | | | | | | | |

RESULTADO: _____

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Alger Jackeline, Matute Maria Luisa y otros. Manual de procedimientos operativos estándar para el Diagnóstico Microscópico de la Malaria, Honduras, 2006.
2. Diggs, L. W., Sturm Dorothy y otros. Morfología de las células de la sangre humana en frotis de sangre periférica y médula ósea teñidos con colorante de Wright. Escuela de Medicina de la Universidad de Tennessee, Sección de Hematología y Hospitales de la Ciudad de Memphis, Tennessee. Pág. 6-8, 10 y 15.
3. Kaminsky RG. Manual de Parasitología. Métodos para laboratorios de atención primaria de salud. Honduras. 2ª Edición, año 2003.
4. Ministerio de Salud de Costa Rica, Normas técnicas para el control de la Malaria. 1997. Páginas 4 y 5.
5. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Manual de Bioseguridad. Laboratorio Central: "Dr. Max Bloch". 2º Edición, El Salvador, año 2005. Págs. 9-79.
6. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Manual de Procedimientos de Hematología. para los Laboratorios Clínicos. El Salvador, año 2002. Págs. 46-48.
7. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Laboratorio Central "Dr. Max Bloch", Manual de Toma, Manejo y Envío de Muestras, 1ª Edición, El Salvador, año 2006.
8. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Unidad de Vigilancia de Enfermedades Vectorizadas, datos estadísticos sobre la epidemiología de la Malaria, El Salvador año 2007.

9. Organización Mundial de la Salud. Medios auxiliares para el Diagnóstico de Paludismo Humano. Secretaría para la coordinación del adiestramiento antipalúdico en Asia y el Pacífico. 1ª. Edición, Págs. 2-25.
10. Organización Mundial de la Salud. Medios Auxiliares para el diagnóstico de las infecciones palúdicas. 2ª edición, Ginebra, año 2000.
11. Organización Mundial de la Salud / Organización Panamericana de la Salud, Diagnóstico de la Malaria. Programa de Enfermedades Transmisibles, Publicación Científica No 512, Washington, DC, 20037, EUA., año 1988. Págs.: 41-42, 85-86, 136-137, 139.
12. Organización Mundial de la Salud / Organización Panamericana de la Salud, La Salud en las Américas. Publicación Científica y técnica N° 587 Washington, DC 20037, EUA año 2002 Págs. 250-251.
13. Organización Mundial de la Salud / Organización Panamericana de la Salud, Manual para el control de las enfermedades transmisibles. Benenson, Abram S. Publicación Científica. Décimo Sexta Edición. Washington, DC. Año 1997. Pág. 350-351.
14. Organización Panamericana de la Salud. Diagnóstico de la Malaria, Publicación Científica N° 512, Washington, DC año 1988. Pág. 1-143.
15. Programa Regional de Acción y Demostración de Alternativa Sostenible para el Control de Vectores de la Malaria sin uso del DDT en México y América Central. Guía para la Implementación y Demostración de Alternativas Sostenibles de Control Integrado de la Malaria en México y América Central. 1ª Edición, México año 2004. Pág. 83-84, 29-30, 130-131 y 173.
16. Raphael Lynch, Spare Mellor, Inwood. Métodos de Laboratorio. 2ª edición. Editorial Interamericana. México D.F. Año 1988. Vol. 2. Págs. 1063-1066.
17. Reactivos productos químicos 2002 (MERK) Pág. 1, Alemania.

18. www.cdc.gov. División de Enfermedades Parasitarias, *Plasmodium spp.* Estadíos sanguíneos, extendido fino. CDC, Atlanta, GA, Estados Unidos de América.

19. [www.seimc.org/control/revi_ para/malaria.htm](http://www.seimc.org/control/revi_para/malaria.htm).

