



MINISTERIO
DE SALUD

Lineamientos técnicos para el diagnóstico microscópico de malaria

San Salvador, El Salvador 2020



MINISTERIO
DE SALUD

Lineamientos técnicos para el diagnóstico microscópico de malaria

San Salvador, El Salvador 2020

2020 Ministerio de Salud



Está permitida la reproducción parcial o total de esta obra por cualquier medio o formato, siempre que se cite la fuente y que no sea para la venta u otro fin de carácter comercial. Debe dar crédito de manera adecuada. Puede hacerlo en cualquier formato razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen apoyo de la licencia.

La documentación oficial del Ministerio de Salud, puede Consultarse en el Centro Virtual de Documentación Regulatoria en: <http://asp.salud.gob.sv/regulacion/default.asp>

Edición

Ilustraciones o imágenes

Impresión

Ministerio de Salud
Calle Arce No. 827, San Salvador. Teléfono: 2591 7000
Página oficial: <http://www.salud.gob.sv>

Autoridades

Dr. Francisco José Alabí Montoya
Ministro de Salud *ad honorem*

Dr. Carlos Gabriel Alvarenga Cardoza
Viceministro de Salud

Dra. Karla Marina Díaz de Naves
Viceministra de Operaciones en Salud

Índice

I. Introducción	8
II. Objetivos	9
III. Ámbito de aplicación	9
IV. Contenido técnico	9
5.1. La malaria	9
5.2. Ciclo biológico.....	9
5.3. Criterios de bioseguridad para el personal de laboratorio	11
5.4. Diagnóstico microscópico de la malaria	14
5.5. Densidad parasitaria	36
5.6. Informe de resultados e interpretación	40
5.7 Limpieza y almacenamiento de los portaobjetos para el diagnóstico microscópico de malaria.....	41
5.8. Aseguramiento de la calidad	42
5.8.1 Control de calidad indirecto.....	43
5.8.2 Control de calidad directo.....	45
5.8.3. Evaluación Nacional de competencias.....	47
5.8.4. Supervisión.....	48
5.9.5. Entrenamientos	51
V. Disposiciones finales	55
VI. Vigencia	55
VII. Glosario	56
VIII. Siglas y abreviaturas	57
IX. Bibliografía	57
X. Anexos	59

Equipo técnico

Ing. José Eduardo Romero	Unidad de Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Vectores
Dr. Kelvin Francisco Alfaro Salguero	
Lic. Carlos Enrique Estupinian	
Licda. Mónica Barahona	Departamento de Laboratorio Nacional de Salud Pública
Licda. Ruth Vásquez	
Licda. Tania Alas	
Licda. Lidia Argueta	
Licda. Marta Alicia Hernández	Dirección de Regulación y Legislación en Salud
Dr. Carlos Roberto Torres	
Ing. René Cruz González	
Lic. Ernesto Villalobos	

Comité consultivo

Licda. Ana Cecilia Díaz	Directora UCSF Metalíó
Licda. Delmy Guadalupe Guerra	Jefe de Laboratorio Hospital Nacional Nueva Guadalupe
Licda. María Victoria Martínez de Mejía	Jefe de Laboratorio Clínico UCSF, Dr. Carlos Díaz del Pinal
Licda. Karla Elizabeth Jiménez Estrada	Jefe de Laboratorio Clínico USCF, San Rafael, Santa Ana.
Lic. Elmer Eduardo Mondragón Rodríguez	Colaborador técnico de laboratorio, Dirección Regional de Salud Oriental
Licda. Ema Alfaro	Colaborador técnico, laboratorio Clínico, Dirección Regional de Salud Occidental
Licda. Herminia Vásquez de López	Colaborador técnico laboratorio Clínico, Dirección Regional de Salud Paracentral
Licda. Keny Ambar Cubías de Hernández	Colaborador técnico, laboratorio Clínico. UCSF Taquillo
Lic. Manuel García	Colaborador técnico, laboratorio Nacional de Referencia.
Lic. Rodrigo Salmerón	Colaborador técnico de Salud, ISSS
Licda. Sonia Maribel Chicas Martínez	Colaborador técnico laboratorio Clínico, UCSF San Simón
Licda. Ana Gloria Martínez	Colaborador técnico laboratorio Clínico, UCSF Santiago Nonualco



MINISTERIO
DE SALUD

Ministerio de Salud

Acuerdo n° 977

EL ÓRGANO EJECUTIVO EN EL RAMO DE SALUD

CONSIDERANDOS:

- I. Que el Código de Salud en los artículos 40, 41 numeral 4 y 43, y el Reglamento Interno del Órgano Ejecutivo en su artículo 42 numeral 2, establecen la facultad del Titular de esta Cartera de Estado de: organizar, reglamentar y coordinar el funcionamiento y atribuciones de todos los servicios técnicos y administrativos de sus dependencias, así como de dictar las normas pertinentes para la ejecución de las actividades relacionadas con la salud.
- II. Que el mismo Código de Salud, en sus artículos 79, 129 y 130 establece que el Ministerio de Salud, debe dictar medidas para proteger a la población contra insectos, roedores, perros u otros animales que puedan transmitir enfermedades al ser humano, siendo tales medidas acciones de interés público, de carácter permanente, y para lo cual todas las instituciones públicas o privadas deben prestarle colaboración.
- III. Que siendo la malaria una enfermedad potencialmente mortal, causada por parásitos que se transmiten al ser humano por la picadura de mosquitos hembra infectados del género *Anopheles*, y constituye un grave problema de salud pública mundial, sobre todo en los países pobres de las regiones tropicales; debe hacerse una abordaje para la detección precoz de la enfermedad, el control vectorial, la promoción de la salud, la vigilancia epidemiológica, entomológica y de laboratorio; así como el manejo y tratamiento de los casos por lo que se vuelve indispensable dictar lineamientos técnicos para el diagnóstico microscópico de la malaria, aplicable a todo el Sistema Nacional Integrado de Salud, por parte del Ministerio de Salud, como ente rector de dicho Sistema.

POR TANTO, en uso de las facultades legales, ACUERDA emitir los siguientes:

Lineamientos técnicos para el diagnóstico microscópico de malaria

I. Introducción

El Salvador, habiendo logrado una drástica reducción de la morbilidad y mortalidad por malaria, ha considerado el compromiso de sumar esfuerzos intersectoriales con el fin de prevenir el restablecimiento de la transmisión autóctona de la enfermedad, reconociendo que ésta no respeta las fronteras nacionales.

El Plan Estratégico para la prevención del restablecimiento de la transmisión autóctona de la malaria en El Salvador 2020-2025, ha considerado estrategias como la detección precoz de la enfermedad, control vectorial, promoción de la salud, vigilancia epidemiológica, entomológica y de laboratorio; así como el manejo y tratamiento de los casos; lo que representa el compromiso de todas las entidades nacionales en colaboración y coordinación para alcanzar la meta de eliminar la transmisión autóctona de la malaria, esfuerzo que requiere de un compromiso compartido y la participación consciente y voluntaria de las comunidades.

En el marco del Plan Estratégico para la prevención del restablecimiento de la transmisión autóctona de la malaria, el Ministerio de Salud (MINSAL) junto con la Sección de Parasitología del Departamento de Laboratorio Nacional de Salud Pública (DLNSP) realizaron un proceso de revisión y validación de material formativo para profesionales de laboratorio a nivel nacional, con el fin de continuar el esfuerzo de la prevención del restablecimiento de malaria en el país, el material será utilizado por los profesionales de laboratorio de los diferentes establecimientos de salud.

El contenido de los presentes lineamiento expone la definición de la malaria, así como una descripción de su ciclo biológico y un diagrama sobre el ciclo de la transmisión de la enfermedad.

En los presentes lineamientos se destacan las disposiciones de bioseguridad que los profesionales deben seguir en el laboratorio, para protección personal. Así mismo se brinda una detallada descripción de la toma de muestras, la limpieza de los portaobjetos y errores que deben prevenirse al recolectar muestras, además, se enuncian los materiales y procedimientos de tinción, observación microscópica del parásito y los diferentes estadios, densidad parasitaria, forma correcta de conteo y reporte.

Además, se describen los procedimientos de evaluación de la calidad para asegurar la precisión de los resultados. Seguido de un glosario, abreviaturas y siglas y una serie de anexos útiles para toma y lectura de muestras de sangre para diagnóstico de malaria.

II. Objetivos

General

Estandarizar la metodología utilizada internacionalmente para la detección de la malaria (*Plasmodium*) en el país.

Específicos

1. Establecer los criterios de bioseguridad que debe cumplir el personal de laboratorio para la buena manipulación de las muestras sanguíneas.
2. Establecer los procedimientos para el diagnóstico microscópico de malaria.
3. Determinar los criterios técnicos para el mejoramiento continuo a través de los controles de calidad internos y externos.

III. Ámbito de aplicación

Están sujetos al cumplimiento de los presentes lineamientos técnicos, todo el personal técnico de laboratorios que realiza actividades para la detección de malaria (*plasmodium*) de los diferentes niveles de atención del Sistema Nacional Integrado de Salud.

IV. Contenido técnico

5.1. La malaria

Malaria o paludismo es 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 5.1) infectada, pica al humano e inocular 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*.

5.2. Ciclo biológico

Un mosquito hembra, infectado con *Plasmodium*, 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.

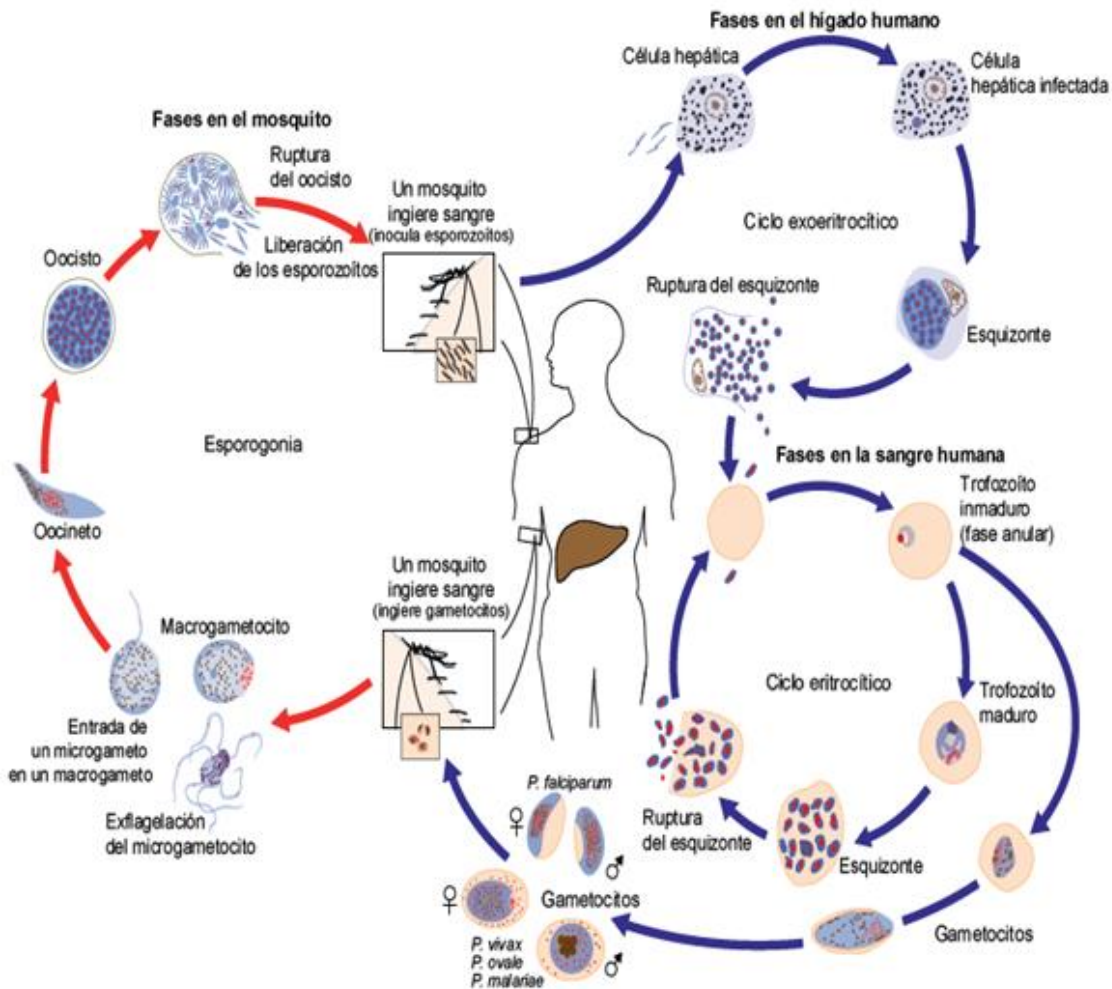
Algunos de estos esporozoítos permanecen en las células del hígado como formas durmientes llamadas hipnozoítos, las que al reactivarse pueden dar lugar a las recaídas, desarrollando una nueva esquizogonia exo-eritrocítica, dando lugar a la repetición del ciclo anterior. Las especies de *Plasmodium* que 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 estos 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 (macrogametocitos), (fase sexual).

Figura 5.1 Ciclo de transmisión de la malaria



Fuente: Tomada de www.mcdinternational.org (OPS- OMS, 2017).

Cada macrogametocito fecundado da origen a un huevo o cigoto, este adquiere movimiento (ooquinet), y se enquista en la pared del intestino del mosquito (ooquiste), estos se dividen formando el esporoquiste, el cual contiene unas formas móviles llamadas esporozoítos las que se alojan en las glándulas salivales del mosquito, que al alimentarse, las inocula y producen infección en el humano.

5.3. Criterios de bioseguridad para el personal de laboratorio

Para garantizar la calidad integral y con el propósito de unificar criterios comparables y reproducibles en todos los laboratorios clínicos del país se emiten estas medidas de bioseguridad para ser aplicadas en la práctica profesional.

El jefe de laboratorio es responsable de velar por el cumplimiento de las medidas de bioseguridad que aseguren la protección del personal, pero todo el personal es responsable no sólo de su propia seguridad sino también de la de sus compañeros de trabajo.

De todas las medidas de bioseguridad que pueden aplicarse, la más importante es realizar minuciosamente cada procedimiento, pues ninguna medida, ni siquiera un excelente equipo sustituyen el orden y cuidado con el que deben ejecutarse los procedimientos.

5.3.1. Cuidados generales

Todos los laboratorios deben contar con medidas preventivas como:

- Preparar planes que vayan destinados a enfrentar los accidentes que se presenten y estos deben colocarse en lugares visibles a todo el personal.

- Poseer un botiquín de emergencia en el laboratorio que contenga como mínimo lo siguiente:
 - Gasa,
 - Vendas,
 - Esparadrapo,
 - Alcohol,
 - Algodón,
 - Analgésicos,
 - Agua destilada estéril,
 - Agua oxigenada,
 - Crema hidratante y
 - Jabón líquido.

Este debe revisarse frecuentemente para renovar su contenido, de no ser posible contar con un botiquín, el personal debe ser atendido en el área de emergencia del establecimiento.

- Cerca del conmutador, teléfono de la secretaria y jefatura, debe colocarse en forma clara, los siguientes números de contactos:
 - Director de la institución,
 - Jefe de laboratorio
 - Administración nacional de acueductos y alcantarillados (ANDA)
 - Distribuidor de electricidad,
 - Cuerpo de bomberos,
 - Paramédicos,
 - Policía Nacional Civil (PNC)
 - Hospital de la localidad,
 - Servicios de ambulancia,
 - Instituto Salvadoreño del Seguro Social (ISSS)

Todas las áreas de trabajo del laboratorio deben tener acceso restringido.

Cuando se elabore el presupuesto anual de laboratorio por parte de la jefatura debe incluirse una asignación que respalde la capacitación del personal, equipo de bioseguridad y las compras de los insumos necesarios para aplicar las medidas de bioseguridad.

Cada una de las jefaturas de laboratorio debe asegurarse que el personal esté capacitado para la ejecución de actividades y cuidados de bioseguridad lo cual es decisivo para la prevención de accidentes y evaluar periódicamente su conocimiento y aplicación.

5.3.2. Cuidados durante la manipulación de la muestra.

El personal de laboratorio durante la manipulación de las muestras debe evitar las siguientes acciones:

- Consumir alimentos y bebidas
- Fumar
- Maquillarse
- Tener materiales de lectura de otros temas ajenos a los servicios de laboratorio, en las mesas y áreas de trabajo.
- Evitar el contacto de las manos con la boca, ojos, nariz, cara y cabello durante el desarrollo de su trabajo técnico.
- Evitar el uso de prendas como anillos, pulseras u otras que puedan contribuir a su contaminación.

Es importante que al finalizar la jornada de trabajo el personal deje el área de trabajo limpia y ordenada, no debe olvidar revisar las llaves de gas, grifo, conexiones eléctricas de los equipos, así como guardar los materiales que requieran refrigeración y almacenamiento, tomando en cuenta las instrucciones del fabricante.

5.3.3. Cuidado personal

El personal del laboratorio debe presentarse a su trabajo limpio y ordenado a realizar sus actividades técnicas, además del equipo de protección personal, debe usar zapatos cómodos y cerrados, el cabello no debe llevarse sobre la cara.

5.3.4. Lavado de manos

El lavado de las manos, debe realizarse cuantas veces sea necesario con abundante agua y jabón, muy especialmente cuando se ha tenido contacto con sustancias potencialmente infecciosas, aunque se utilicen guantes. (Ver Procedimiento de lavado de manos en el Manual de Procedimientos de Bioseguridad para los Laboratorios Clínicos). El personal de laboratorio debe usar sus uñas recortadas.

5.3.5. Vacunas

Es de suma importancia cumplir y renovar los esquemas de inmunización conforme a riesgos potenciales que puedan afectar a cada miembro del personal, se debe llevar registro de las vacunas recibidas por el personal, el cual estará disponible para cuando lo solicite la autoridad respectiva, la aplicación de la vacuna de hepatitis B, siempre que esté disponible para la institución, debe ser administrada para los trabajadores con riesgo de infección y a aquellos que están en contacto con sangre y líquidos corporales.

5.3.6. Equipo de protección personal (EPP) y colectivo

El equipo de protección personal (EPP) se elige de acuerdo a la actividad a realizar, el cual constituye elementos básicos para desempeñar las diferentes actividades técnicas y por lo tanto deben estar disponibles obligatoriamente para todo el personal.

El equipo básico consta de:

Gabacha

Gafas o protectores faciales

Guantes

Mascarilla

Cuando se manipulen sustancias de alto riesgo, se puede agregar al EPP otros elementos como:

Gorro,

Doble guante

Delantal u otros según actividad a desarrollar.

5.3.6.1 Gabacha

Utilizar para el trabajo técnico de laboratorio, la gabacha cerrada y limpia, de color blanco confeccionada con tela de tejido resistente, manga larga, que cubra hasta la rodilla y de ser posible con puño comprimido, el técnico del laboratorio no debe salir del área de trabajo con el equipo de bioseguridad.

Cuando el técnico de laboratorio realice lavado de material debe utilizar un delantal impermeable sobre la gabacha o uniforme.

La gabacha debe ser de uso personal, y al finalizar la jornada esta se debe en las instalaciones donde trabaja.

5.3.6.2 Mascarilla

Utilizar siempre que se realicen procedimientos con riesgo de producción de aerosoles o salpicaduras, manipulación de material con sospecha de contaminación con microorganismos que se transmiten por vía aérea o cuando se realice limpieza de derrame con material infeccioso.

5.3.6.3 Gafas protectoras o protectores faciales

Utilizar siempre que se hagan procedimientos con exposición a salpicaduras o impactos. Las gafas protectoras deben ser de material rígido y deben cubrir completamente el área de los ojos.

Los anteojos de uso personal no sustituyen los lentes de protección.

5.3.6.4 Guantes

Usar guantes obligatoriamente en los siguientes casos:

- Siempre que se manipule material biológico.
- Siempre que se hagan labores técnicas dentro del laboratorio.
- Cuando se tomen muestras a pacientes.
- Cuando se entre en contacto con sangre, fluidos corporales y sustancias peligrosas.
- Siempre que se vea al microscopio muestras con montaje al fresco.

Los guantes deben cambiarse por otros nuevos siempre que se rompan, o perforen. Los guantes de látex deben ser de uso clínico, ya que al someterse al proceso de lavado y desinfección se deterioran y no pueden ser reutilizados.

Los guantes deben quitarse cuando se transcriban datos o se digiten en los aparatos automatizados, al responder el teléfono y abrir puertas, pues estos representan una fuente de contaminación para cualquier superficie.

Los guantes deben ser descartados en los depósitos que contienen desechos bioinfecciosos.

5.3.7. Equipo de protección colectivo

Los equipos de protección colectivo son:

- Los sistemas de seguridad para incendios (extintores y baldes con arena) los extintores deben ser recargados según su fecha de caducidad
- Duchas de emergencia para la descontaminación por químicos irritantes
- Sistema de agua para lavarse los ojos en caso de accidente
- Botiquines deben estar en lugares accesibles al personal.

5.3.8. Accidentes de laboratorio

El personal de laboratorio debe estar capacitado en los aspectos de bioseguridad, que impliquen accidentes de trabajo.

Todos los accidentes ocurridos deben ser comunicados al jefe inmediato y en caso de sospecha de contaminación con VIH consultar la guía para el sistema de información de profilaxis post exposición al VIH. (Ver Anexo 1).

5.4. Diagnóstico microscópico de la malaria

El diagnóstico de la malaria se realiza considerando las manifestaciones clínicas de una persona que reside en áreas de receptibilidad y vulnerabilidad, además la confirmación del laboratorio que demuestre la presencia del parásito, en la gota gruesa y frotis, en los que se observan las diferentes especies del Plasmodium en sus estadios.

La gota gruesa es considerada el estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad a nivel mundial.

El éxito de un buen diagnóstico en gota gruesa depende de:

- Toma de muestra
- Preparación del colorante
- Coloración (método de Giemsa)
- Identificación microscópica de los parásitos.

5.4.1. Preparación de las extensiones sanguíneas

La muestra debe ser sangre periférica o venosa recién tomada, igualmente debe ser obtenida antes que el paciente reciba tratamiento antimalárico, la mejor muestra es sangre sin anticoagulante, pero es aceptada realizar la toma de la gota con anticoagulante.

Antes de la toma de muestra se debe verificar que se tengan todos los materiales a utilizar, láminas portaobjeto completamente limpias e identificadas, libros de registro y guantes protectores.

5.4.2. Tipos de extensiones sanguíneas

5.4.2.1 Extensión de gota gruesa

Para detectar los Plasmodium se utilizan siempre las extensiones de gota gruesa, que tienen muchas capas de glóbulos rojos (eritrocitos o hematíes) y blancos (leucocitos). Durante la tinción, la hemoglobina de los glóbulos rojos se disuelve (deshemoglobinización), de modo que se puedan examinar rápida y fácilmente grandes cantidades de sangre. Cuando están presentes, los Plasmodium están más concentrados que en las extensiones de frotis y son más fáciles de ver e identificar. (OMS, 2014)

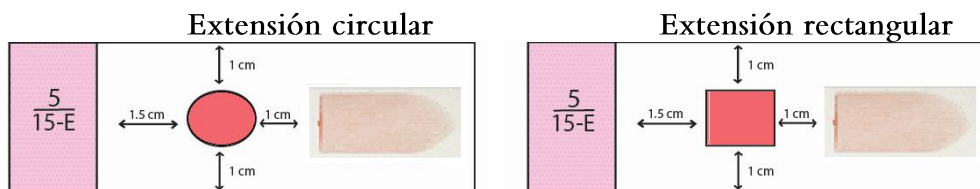
La gota gruesa debe cumplir con los requisitos en tamaño, ubicación, grosor y extensión.

- Tamaño de lámina portaobjeto: 2.5cm. x 7.5cm.
- Tamaño de gota gruesa: 1.0 cm.
- Distancia de la parte esmerilada a la gota: 1.5 cm.
- Distancia entre gota y frotis 1 cm.
- Parte esmerilada: identificación de la muestra.
- Su extensión puede ser circular o rectangular.

5.4.2.2. La extensión de frotis

La extensión de frotis permite poder confirmar la especie de los Plasmodium, cuando eso no se consiga en la gota gruesa. Para buscar parásitos, la extensión de frotis solo se utiliza en situaciones excepcionales. Una extensión de frotis bien preparada consiste en una única capa de glóbulos rojos y blancos extendidos en lámina portaobjetos.

Figura 5.3 Patrón de toma de muestra de gota y frotis



Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

5.4.3. Preparación de toma de muestra de gota gruesa y frotis

Materiales necesarios:

- Formulario de registro de identificación LAB-2 (Ver Anexo 5)
- Guantes protectores
- Lancetas estériles descartables
- Algodón (torundas)
- Alcohol al 70%
- Láminas portaobjetos 3 x 1", esmeriladas previa asepsia
- Contenedor de objetos corto punzantes
- Bandeja de portaobjetos
- Gasas estériles o curitas
- Lápiz grafito
- Lapicero

5.4.4. Procedimiento de toma de muestra de gota gruesa y frotis

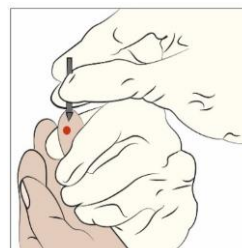
Antes de la toma de muestra, asegurarse de tener todos los materiales a utilizar. Las láminas portaobjeto deben estar completamente limpias. Anotar en el libro de registro e identificar láminas portaobjeto y ponerse guantes protectores.

Figura 5.4. Procedimiento de toma de muestra de gota gruesa y frotis

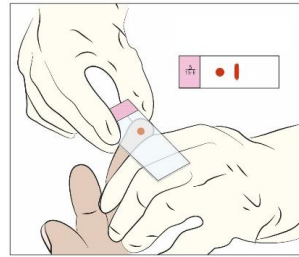
1. Sostener la mano del paciente, con la palma hacia arriba seleccionar el dedo anular de preferencia, limpiar con algodón con alcohol frote la yema del dedo para eliminar la suciedad o grasa que pueda tener, seque el dedo con algodón seco frotando el dedo para estimular la circulación sanguínea.



2. Con una lanceta estéril realizar punción con un rápido movimiento de rotación puncione la yema del dedo, descartar la primera gota limpiando con un algodón seco, cuidando no dejar hebras de algodón.



- Mantener presión suave en dedo y depositar dos o tres gotas de sangre en láminas portaobjeto dejando una distancia de la parte esmerilada a la primera gota, poner gota de sangre para realizar extendido de gota gruesa y extendido para frotis guardando espacios de más o menos un cm de distancia, la gota para el frotis debe ser de menor tamaño.



- Limpiar con algodón seco la sangre que queda en el dedo.

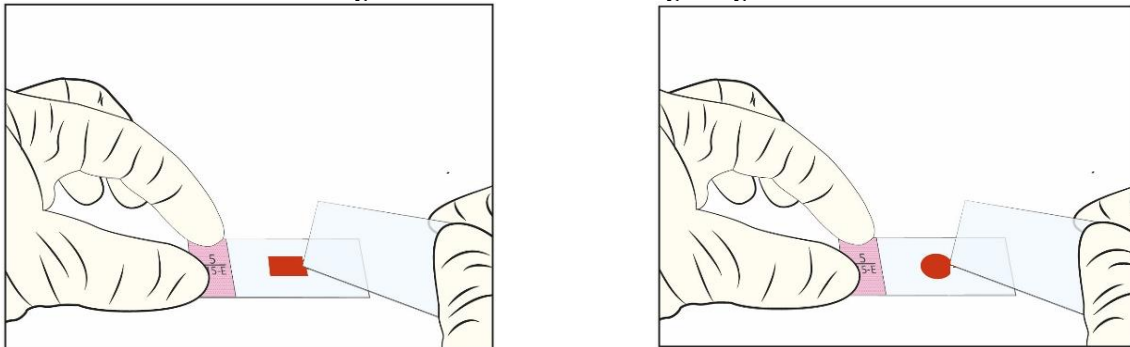


5.4.5. Extendido de gota gruesa

Sostener los portaobjetos, utilizar una esquina de otra lámina para adherir la gota de sangre y extenderla hasta lograr una extensión gruesa y uniforme, no remover demasiado la sangre, realizar de tres a seis movimientos rápidos con la esquina de la lámina de tal forma que quede una extensión uniforme.

Se puede hacer una extensión circular o rectangular. (La extensión de la gota debe tener aproximadamente un centímetro de diámetro). dejar secar, proteger del polvo, moscas, luz solar y calor extremo.

Figura 5.5 Extendido de gota gruesa

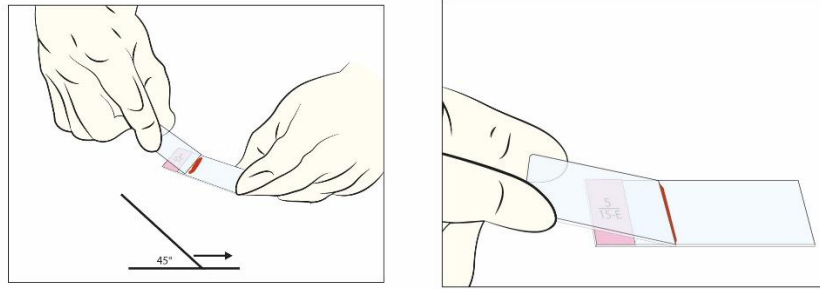


Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

5.4.5. Extendido de frotis:

Poner en el portaobjetos que tiene la sangre en una superficie plana y firme, y tocar la gota de sangre pequeña con el otro portaobjetos limpio haciendo que la gota se extienda a lo largo del portaobjeto extensor, deslice con firmeza el portaobjeto, con un ángulo aproximado de 45° haciendo que la sangre se extienda a lo largo de la lámina portaobjeto.

Figura 5.6 Extendido de frotis



Extensión de gota gruesa y frotis



Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

5.4.6. Cuidados de las muestras

Cuando los extendidos estén completamente secos y no se van a procesar en el mismo momento, se deben guardar en cajas portaláminas o en un lugar libre de polvo.

Si se van a enviar para realizar diagnóstico, de preferencia, poner en cajas portaláminas, si no embalar de tal forma que no tenga contacto con papel.

Para su envío, la lámina debe estar debidamente identificada en la parte esmerilada de la lámina, adjuntar boleta de registro con los datos correspondientes y enviarla enseguida al laboratorio.

5.4.7. Errores frecuentes en la preparación de las extensiones sanguíneas

Los errores que se observan frecuentemente en las extensiones sanguíneas son: la identificación, el extendido de la muestra o la tinción; cualquiera de ellos puede afectar el resultado para el paciente.

5.4.7.1. Extensiones sanguíneas mal situadas

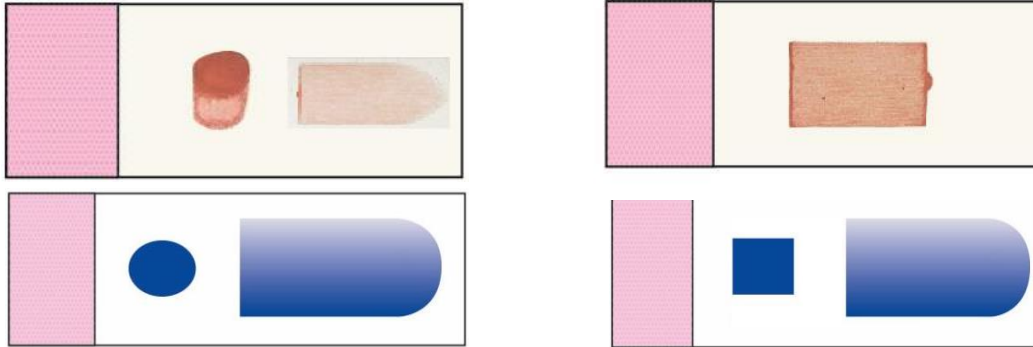
Si las extensiones no están situadas correctamente en el portaobjetos, su examen puede resultar imposible, algunas partes de la gota gruesa pueden desprenderse al rozar con los filos de la cubeta de tinción o la gradilla de secado, cuando la extensión gruesa está mal situada será difícil examinarla con el objetivo de inmersión.



Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

5.4.7.2. Demasiada sangre

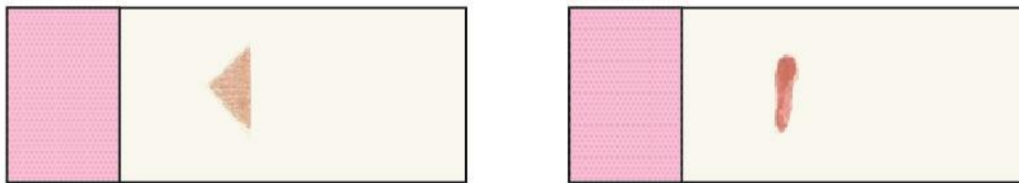
Las extensiones gruesas teñidas que contengan demasiada sangre tendrán un fondo muy azul. Habrá demasiados glóbulos blancos por campo, lo cual puede dificultar la observación de los parásitos, en los frotis demasiado gruesos los glóbulos rojos estarán apilados, imposibilitando la visualización de los parásitos.



Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

5.4.7.3 Extensiones con poca sangre.

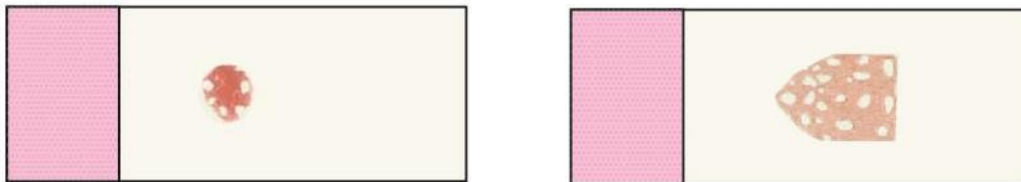
Cuando hay poca sangre en la extensión, no hay glóbulos blancos suficientes en el campo de la gota gruesa o no hay sangre suficiente para un examen habitual. El frotis con poca sangre no suele ser utilizable para diagnosticar la especie.



Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

5.4.7.4. Portaobjetos grasientos

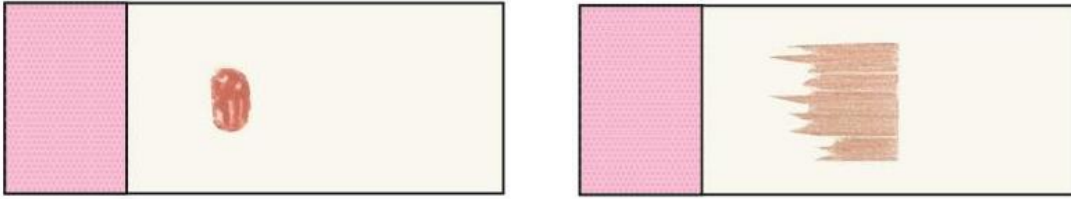
Las extensiones sanguíneas hechas sobre portaobjetos grasientos se extenderán irregularmente, y la gota gruesa se desprenderá parcialmente durante la tinción, en el examen de las gotas gruesas y frotis la distribución de la sangre se observará de forma irregular.



Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

5.4.7.5. Portaobjetos astillado

Cuando el portaobjetos está astillado, la gota gruesa y frotis son irregulares, estriados y con muchas “colas”.



Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

5.4.8. Coloración de gota gruesa y frotis

5.4.8.1. Coloración de Giemsa

La tinción de Giemsa es una tinción de Romanowsky de base alcohólica, el colorante de Giemsa es una mezcla de Eosina, que tiñe de rojo o rosa la cromatina del parásito y las sombras punteadas y el azul de metileno que tiñe de azul el citoplasma del parásito.

Los núcleos de los glóbulos blancos se tiñen de azul que puede llegar a ser casi negro, dependiendo del tipo de glóbulo blanco.

5.4.8.2. Solución amortiguadora

Antes de teñir las extensiones, preparar la solución amortiguadora que se utilizará para diluir el colorante, este debe ser preparado diariamente, ya que los plasmodia se ven claramente con el microscopio en extensiones sanguíneas teñidas adecuadamente.

El uso de la solución amortiguadora con el pH correcto contribuye a la obtención de una buena tinción.

Recomendación para solución Buffer:

- La solución debe tener un pH adecuado (7.2)

5.4.8.3. Recomendaciones para una buena coloración de gota gruesa

- Mantener el frasco stock bien tapado para evitar la evaporación del colorante y su oxidación por la humedad elevada.
- Guardar en un frasco de vidrio oscuro, alejado de la luz solar directa.
- Para coloraciones de rutina, pasar pequeñas cantidades de colorante en un frasco bien cerrado de aproximadamente 25 ml, a fin de reducir la contaminación de la solución.
- No añadir agua a la solución Stock; incluso una cantidad mínima producirá un deterioro del colorante que lo volverá progresivamente ineficaz.
- No agitar el frasco de colorante antes de utilizarlo, la agitación volvería a suspender los precipitados, que se asentarían en las extensiones durante la tinción y ocultarían detalles importantes durante el examen microscópico.
- No regresar el colorante no utilizado al frasco donde se guarda la solución madre ni al frasco destinado al uso diario, una vez que sale del frasco, el colorante debe usarse rápidamente.

Materiales

1. Colorante de Giemsa puro
2. Metanol
3. Tubos de ensayo
4. Buffer con pH de 7,2
5. Pipeta con bulbo
6. Bandeja para tinción
7. Gradilla para secado de las extensiones
8. Un cronómetro.

Las gotas gruesas tienen que secarse totalmente antes de teñirlas, evitar el sobrecalentamiento de la preparación porque puede producir una «fijación por el calor» que impida que se tiña bien.

5.4.8.4. Método coloración de extensiones gota gruesa y frotis

Hay dos métodos de tinción con el colorante de Giemsa: el rápido (al 10%) y el lento (al 3%). El método rápido se utiliza en los ambulatorios y laboratorios con mucho trabajo donde una parte esencial de la atención al paciente consiste en la realización rápida del diagnóstico. El método lento se utiliza para teñir un mayor número de preparaciones, como las recolectadas durante los estudios transversales o epidemiológicos y las investigaciones sobre el terreno.

Método rápido (al 10%)

Es el más utilizado para teñir entre 1 y 15 preparaciones de una vez. Se utiliza en laboratorios donde se necesita un resultado rápido para determinar si el paciente tiene o no paludismo. El método es eficiente, pero requiere más colorante. La necesidad de un resultado rápido justifica el costo adicional.

Materiales:

- Colorante de Giemsa. (previamente filtrado)
- Metanol
- Papel filtro
- Tubos de ensayo de 5 ml
- Agua destilada o desionizada tamponada con pH de 7,2
- Pipeta Pasteur con perilla de goma, pipetas graduadas
- Una bandeja de plástico curva para la tinción
- Un soporte de secado de las extensiones
- Un cronómetro

Las extensiones gruesas tienen que secarse totalmente antes de teñirlas.

El método:

1. Fije el frotis por inmersión en metanol absoluto por 2 segundos, evite el contacto del metanol con la extensión gruesa; el metanol y sus vapores la fijarían rápidamente y no se teñiría bien.
2. En un tubo de ensayo o un envase pequeño, prepare una solución de Giemsa al 10% en solución amortiguadora, mezclando dos gotas de colorante de Giemsa (sacadas de la solución madre con una pipeta de Pasteur) para un ml de solución amortiguadora, (o también a 9 ml de solución amortiguadora añada un ml de colorante de giemsa). Para cubrir un portaobjetos se necesitan aproximadamente 3 ml de colorante.
3. Según lo que esté utilizando (bandeja, placa o gradilla de tinción), coloque los portaobjetos que vaya a teñir boca abajo en la bandeja de tinción curva.
4. Vierta el colorante poco a poco en la bandeja de tinción hasta que cubra todos los portaobjetos
5. Tiña las extensiones por tiempo estandarizado puede ser de 15 a 20 minutos. La experiencia que vaya adquiriendo con el colorante que utilice le ayudará a decidir exactamente cuánto tiempo necesita para una buena tinción.
6. Retire las láminas de la bandeja de coloración cóncava y lave por inmersión en buffer fosfato pH 7.2. El colorante se desecha en un recipiente para desechos de colorante de Giemsa.
7. Coloque los portaobjetos en el soporte de secado, con la extensión hacia abajo, para que se sequen. Tenga cuidado para que las extensiones gruesas no rocen con los bordes del soporte de secado.

Método lento (al 3%)

Es menos apropiado cuando se necesita un resultado rápido, pero es excelente para teñir un gran número de preparaciones (20 o más), e ideal para teñir las extensiones sanguíneas de encuestas o trabajos de investigación o de lotes de preparaciones para fines didácticos. El mejor rendimiento se obtiene dejando secar las preparaciones toda una noche. El método es económico porque se utiliza mucho menos colorante (un 3% en vez de un 10%).

Accesorios y sustancias necesarios:

- Colorante de Giemsa (previamente filtrado)

- Metanol¹
- Una bandeja de plástico curva para tinción para 20 portaobjetos;
- Solución amortiguadora con un pH de 7,2.
- Una probeta graduada de 100–500 ml.
- Una probeta graduada de 10–25 ml.
- Pipetas graduadas
- Un frasco cuya capacidad dependerá de la cantidad de colorante que se vaya a preparar.
- Un cronómetro
- Un soporte de secado de las extensiones.

Metodología:

1. Fije las extensiones finas o frotis sumergiéndolas en metanol durante unos segundos, evite el contacto del metanol con la extensión gruesa; el metanol y sus vapores la fijarían rápidamente y no se teñiría bien.
2. Coloque los portaobjetos secuencialmente en una cubeta de tinción, asegurándose de que las extensiones gruesas miran todas hacia uno de los extremos de la cubeta.
3. Prepare una solución de Giemsa al 3% añadiendo 3 ml de la solución madre del colorante a 97 ml de solución amortiguadora con un pH de 7,2 (o múltiplos de esos volúmenes).
4. Vierta el colorante en la cubeta. No lo vierta directamente en las extensiones gruesas, pues podrían desprenderse del portaobjetos.
5. Mantenga el proceso de tinción durante 45 a 60 min.; la experiencia le enseñará cuál es la duración correcta.
6. Retire las láminas de la bandeja de coloración cóncava y lave por inmersión en buffer fosfato pH 7.2 El colorante se desecha en un recipiente para desechos de colorante de Giemsa
7. Retire cuidadosamente las preparaciones, una por una, y colóquelas con la extensión hacia abajo en el soporte de secado. Tenga cuidado para que las extensiones gruesas no rocen con los bordes de la gradilla.

Durante la tinción de Giemsa (al 3% o al 10%) la superficie se cubre de una capa de color verde metalizado. Durante el lavado evite que se adhiera a las extensiones sanguíneas pues puede dificultar el examen.

5.4.9. Fuentes de error

- Falta de maduración del colorante.
- No filtrar el colorante de Giemsa antes de la dilución.
- Dilución no adecuada del colorante.
- No cumplir con los tiempos de coloración establecidos.
- Calidad defectuosa de la lámina portaobjeto.
- Calidad defectuosa del colorante de Giemsa.
- Utilizar colorantes vencidos.
- No utilizar buffer con pH indicado.

5.4.10. Observación microscópica

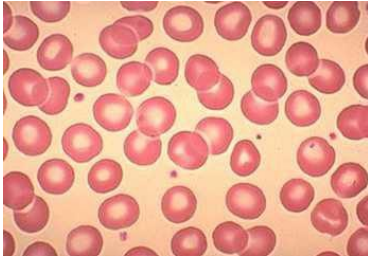
En la gota gruesa el fondo debe observarse limpio, exento de residuos y los parásitos deben encontrarse en forma libre. Los núcleos de los leucocitos o glóbulos blancos deben aparecer teñidos de un color púrpura oscuro intenso y los parásitos deben verse con la cromatina de color rojo oscuro y el citoplasma 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. 5.7). El pigmento malárico se tiñe color pardo-amarillo Para detalles sobre cuidados y mantenimiento del microscopio, consultar el Anexo 4.

5.4.11. Elementos formes de la sangre

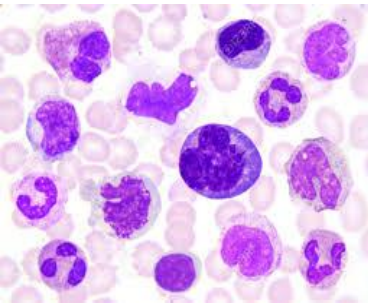
El aspecto normal de los diversos componentes de la sangre es siempre ligeramente diferente en las extensiones gruesas y frotis y es importante poder reconocerlos.

¹ El metanol (alcohol metílico) es muy tóxico e inflamable; su ingestión, aún en pequeñas cantidades, puede causar ceguera, e incluso la muerte. Mientras no se esté utilizando debe guardarse en un armario bajo llave.

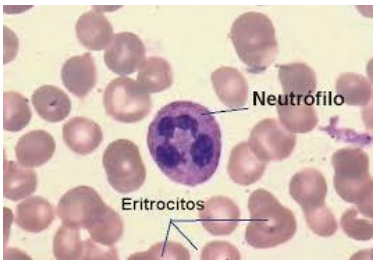
Figura 5.8 Elementos formes de la sangre



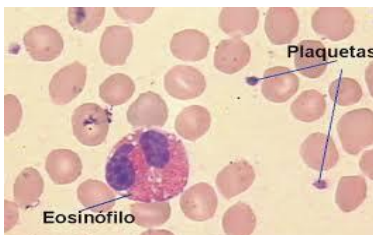
Eritrocitos o glóbulos rojos: Los glóbulos rojos tienen una forma de disco bicóncavo, es la célula más común que se encuentra en el frotis, hay cerca de 5,000,000 de glóbulos rojos por cada microlitro de sangre, con una buena coloración de Giemsa, los glóbulos rojos, que miden aproximadamente 7.5 μm 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.



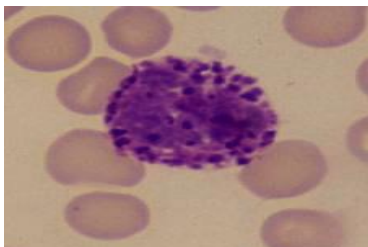
Leucocitos o glóbulos blancos: El número total de leucocitos por microlitro de sangre oscila entre 6,000 y 8,000 células. Existen diferentes tipos de leucocitos los cuales se colorean de manera diferenciada, en el extendido fino se les puede reconocer el núcleo, el citoplasma y la membrana celular, cada leucocito contiene un núcleo rodeado por citoplasma, algunos tienen núcleo multilobulado y algunas veces el citoplasma es de apariencia granular.



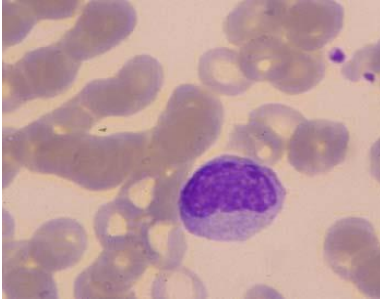
Neutrófilo: Poseen un núcleo segmentado, tienen gránulos bien definidos en el citoplasma y el núcleo que se colorea de púrpura intenso.



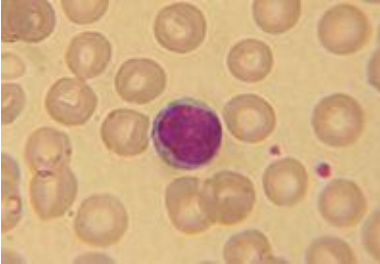
Eosinófilo: Este posee un núcleo segmentado no más de dos a tres lóbulos y su citoplasma está lleno por completo de gránulos color anaranjado.



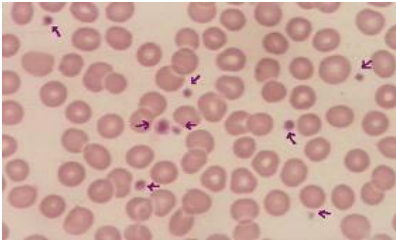
Basófilo: Tienen un núcleo bilobulado con gránulos superpuestos que se tiñen de negro púrpura.



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.



Linfocito: Tiene una variación de tamaño, todo depende de la cantidad de citoplasma presente, su núcleo tiene 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 tenido de color azul cielo.



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

Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

5.4.12. Elementos formes de la sangre en la gota gruesa

Cuando examinamos una gota gruesa con un objetivo de inmersión observamos los siguientes elementos sanguíneos:

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

5.4.13. Elementos formes de la sangre en un frotis

Al examinar un frotis con objetivo de inmersión observamos los siguientes elementos sanguíneos.

- II. Eritrocitos o glóbulos rojos
- III. Leucocitos o glóbulos blancos
- IV. Plaquetas

5.4.14. Características morfológicas de *Plasmodium* spp.

Los *Plasmodium* pasan por una serie de fases de desarrollo en las que su forma sufre grandes cambios. Sin embargo, los colores de los que se tiñen las diferentes partes del parásito son siempre los mismos en las diferentes fases.

Los parásitos de *Plasmodium* se colorean con Giemsa (gota gruesa y frotis) de una manera característica, en su desarrollo, el parásito pasa por una serie de estadios:

Cromatina: Es parte del núcleo del parásito generalmente redonda y se colorea de rojo intenso.

Citoplasma: Se colorea de azul puede variar según las especies y es a veces una característica diferencial, se observa desde una forma de anillo hasta una forma totalmente irregular.

Pigmento: Es un subproducto granular del crecimiento del parásito, no capta el colorante, pero su color varía de marrón dorado a negro, el color y el tamaño de los gránulos de pigmento varían según la especie, y el color suele ser característico.

Punteado: «Manchas», «puntos» y «hendiduras» son descripciones del efecto del parásito en la célula huésped, y son puestas en destaque por una buena tinción. La forma mejor conocida y más fácil de demostrar es el «punteado de Schüffner», una masa de puntos rosa que parecen llenar algunos glóbulos rojos parasitados por *P. vivax*. En las infecciones por *P. ovale*, el punteado casi malva que puede llegar a dificultar la visualización del parásito mismo recibe el nombre de «puntos de James», aunque la mayoría de los autores siguen llamándole «punteado de Schüffner», otros puntos o hendiduras, como las «hendiduras de Maurer» que se observan en las extensiones finas en algunas células parasitadas por *P. falciparum*, son más difíciles de demostrar.

5.4.15. Estadios de los *Plasmodium*

a) Trofozoíto

Es la fase que más se ve, también se le llama fase de anillo, aunque el «anillo» puede aparecer incompleto en las extensiones gruesas. El trofozoíto en el interior de la célula huésped puede ser pequeño o muy grande, generalmente hay una mancha de cromatina; cuando se trata de *P. falciparum* es frecuente que haya dos. El citoplasma adopta diferentes formas: desde un fino anillo bien definido hasta formas irregulares o extrañas, a veces llamadas «ameboideas», a medida que el parásito crece aparece el pigmento, que no se tiñe pero tiene un color que va del marrón dorado al marrón oscuro o incluso negro.

b) 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 aquellos con muchos puntos de cromatina y citoplasma definido.

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

c) 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 macrogametocito o macho microgametocito.

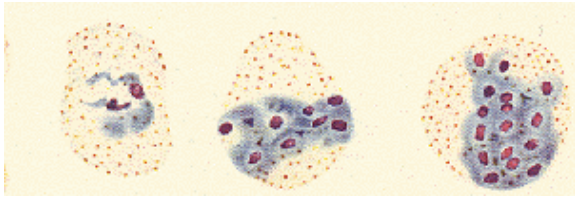
Figura 5.9: Estadios de los *Plasmodium*



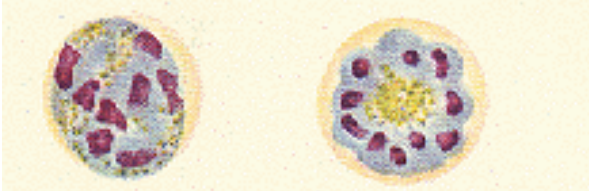
Trofozoíto de *P. vivax* – anillo joven, maduro, trofozoíto

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

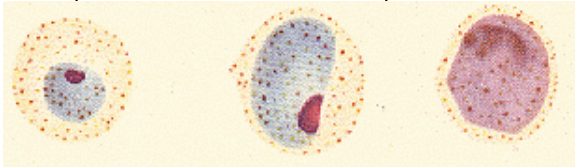
Trofozoíto de *P. malariae* – Forma anillo, banda temprana, banda



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



Esquizonte de *P. malariae* – Temprano, maduro

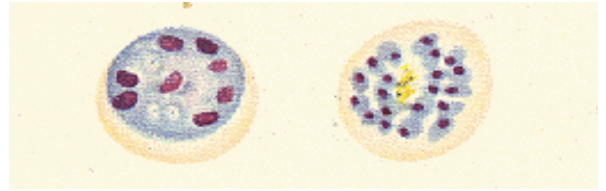


Gametocito de *P. vivax* – temprano, femenino, masculino

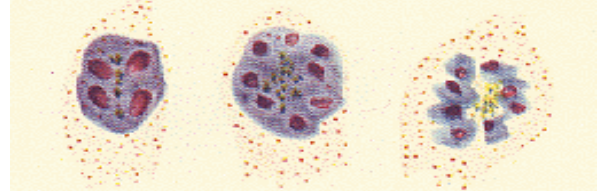


Gametocito de *P. malariae* – masculino, femenino.

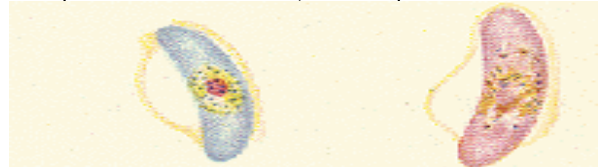
Trofozoíto de *P. ovale* – Anillo joven, viejo, forma de cometa



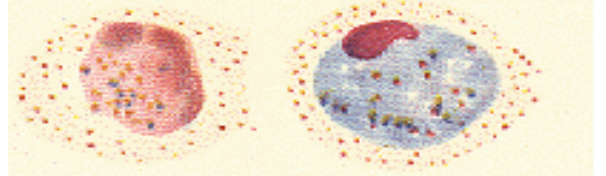
Esquizonte de *P. falciparum* – Esquizonte, maduro



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



Gametocito de *P. falciparum* – femenino, masculino



Gametocito de *P. ovale* – femenino, masculino

Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

5.4.16. Especies causantes de malaria

Hay cuatro especies de *Plasmodium* que infectan al humano en forma natural

Para identificar las cuatro especies de *Plasmodium* que parasitan a los seres humanos, 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).

Plasmodium falciparum es la especie más frecuente en las zonas tropicales y es la causante de la mayoría de los casos graves y mortales de paludismo.

Plasmodium vivax es la especie más frecuente en las zonas más frías de los trópicos. Son los *Plasmodium* humanos más grandes y son una importante causa de absentismo laboral y escolar.

Plasmodium malariae es la especie menos frecuente, pero está presente en la mayor parte de la zona tropical.

Plasmodium ovale se considera una especie rara. Es relativamente frecuente en África occidental y otras partes del continente africano, y se han descrito casos aislados en países tan distantes entre sí como China, Filipinas, Papua Nueva Guinea, Sudán o Tailandia. Debido a sus semejanzas morfológicas, los microscopistas con escasa experiencia confunden a veces *P. ovale* con *P. vivax*.

Tabla 5.1 Comparación de las características morfológicas de los parásitos *Plasmodium* spp.

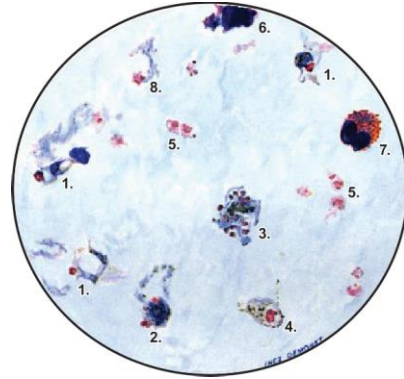
Parásito	Estadio	Morfología del eritrocito	Morfología del parásito
<i>P. vivax</i>	Anillo	Normal - 1/4 de veces más grande; redondo; ocasionalmente punteado de Schüffner fino. Infección múltiple del eritrocito no es infrecuente.	Citoplasma grande con pseudópodos ocasionales; punto grande de cromatina.
	Trofozoíto	Agrandado de 1 1/2 a 2 veces, puede estar distorsionado. Punteado de Schüffner fino.	Citoplasma ameboso grande; cromatina grande; pigmento finocafé - amarillo.
	Esquizonte	Agrandado de 1 1/2 a 2 veces, puede estar distorsionado. Punteado de Schüffner fino.	Grande, puede llenar todo el eritrocito; esquizonte maduro con 12-24 merozoítos; pigmento café-amarillo convergente.
	Gametocito	Agrandado de 1 1/2 a 2 veces, puede estar distorsionado. Punteado de Schüffner fino.	Redondo a oval; compacto; puede casi llenar el eritrocito; cromatina difusa (Microgametocito) o compacta y excéntrica (Macrogametocito). Pigmento café disperso.
<i>P. falciparum</i>	Anillo	Normal; infección múltiple puede encontrarse más comúnmente que en las otras especies.	Citoplasma delicado; 1-2 puntos pequeños de cromatina; ocasionalmente se observan formas marginales.
	Trofozoíto*	Normal; raramente, fisuras de Maurer (según las condiciones de la coloración)	Muy raramente se observan en circulación; citoplasma compacto; pigmento oscuro.
	Esquizonte*	Normal; raramente, fisuras de Maurer (según las condiciones de la coloración)	Muy raramente se observan en circulación. En el maduro 12-30 merozoítos pequeños, pigmento oscuro agrupado en una masa.
	Gametocito	Distorsionado por el parásito	Forma de luna creciente o salchicha; cromatina difusa (Microgametocito) o con cromatina más compacta en Macrogametocito). Pigmento en barras de pigmento oscuro.
<i>P. malariae</i>	Anillo	Normal a 3/4 de su tamaño.	Citoplasma grueso; cromatina grande.
	Trofozoíto	Normal a 3/4 de su tamaño, ocasionalmente punteado de Ziemman (según coloración).	Citoplasma compacto; cromatina grande; pigmento grueso, café oscuro. Ocasionalmente formas en banda.
	Esquizonte	Normal a 3/4 de su tamaño, ocasionalmente punteado de Ziemman (según coloración).	Gametocito maduro con 6-12 merozoítos con núcleos grandes alrededor de una masa de pigmento café oscuro, ocasionalmente formas en "margarita".
	Gametocito	Normal a 3/4 de su tamaño, ocasionalmente punteado de Ziemman (según coloración).	Redondo a oval; compacto; casi llena el eritrocito, cromatina difusa (Microgametocitos) o compacta y excéntrica (Macrogametocito). Pigmento café disperso.
<i>P. ovale</i>	Anillo	Normal - 1/4 veces más grande; redondo a ovalado; ocasionalmente punteado de Schuffner; ocasionalmente fimbriado; infección múltiple del eritrocito no es infrecuente.	Citoplasma grueso; cromatina grande
	Trofozoíto*	Normal - 1/4 veces más grande; redondo a ovalado; algunos fimbriados; punteado de Schuffner.	Compacto con cromatina gruesa; pigmento café oscuro.

Fuente: División de Enfermedades Parasitarias CDC Atlanta

Figura 5.10 Características de las diferentes especies de *Plasmodium* en la gota gruesa

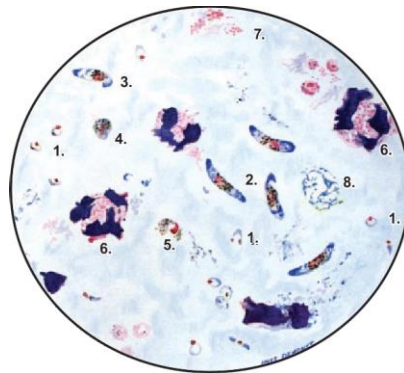
A. *Plasmodium vivax*

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



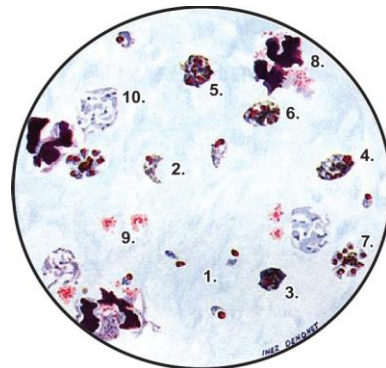
B. *Plasmodium falciparum*

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



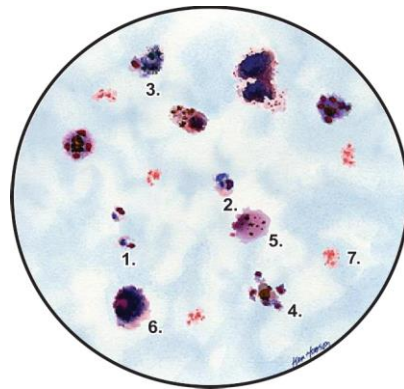
C. *Plasmodium malariae*

1. Trofozoito anular o anillo
2. Trofozoito inmaduro
3. Trofozoito maduro
- 4,5,6. Esquizontes con diferentes números de fragmentos de cromatina
7. Esquizonte maduro
8. Leucocito polimorfonuclear
9. Plaqueta
10. Resto de glóbulo rojo joven



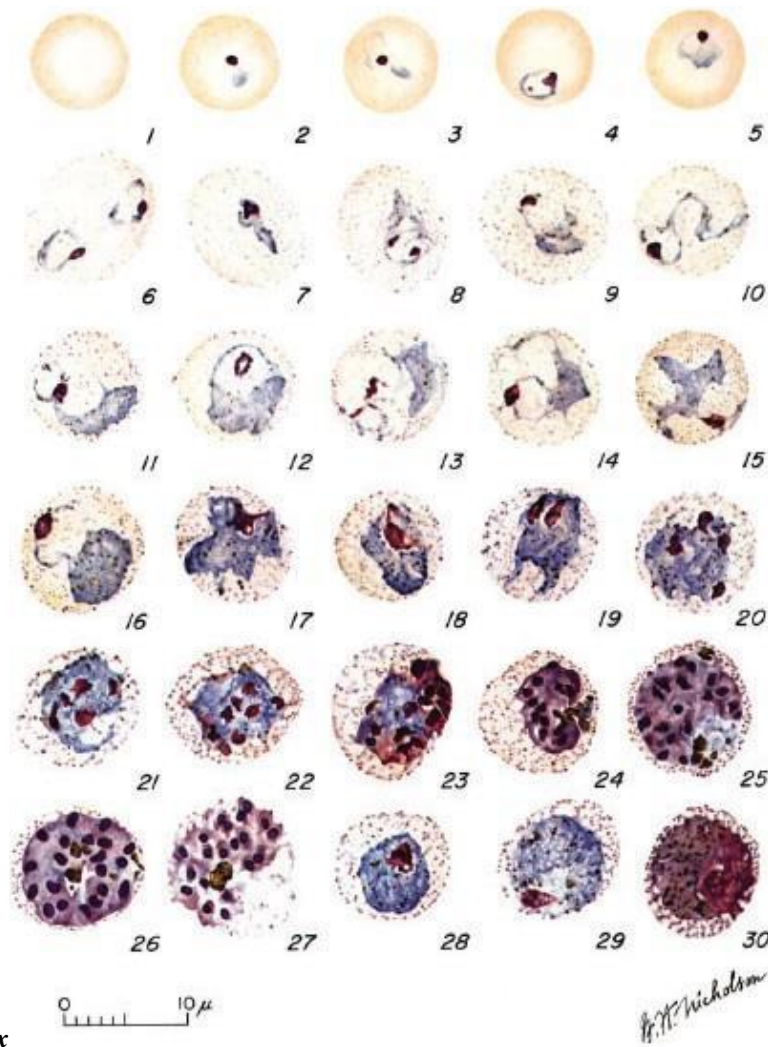
D. *Plasmodium ovale*

1. Trofozoito anular o anillo
2. Trofozoito inmaduro
3. Trofozoito maduro
4. Esquizonte
5. Gametocito
6. Leucocito polimorfonuclear
7. Plaqueta



Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

Figura 5.11 Características de las diferentes especies de *Plasmodium* en frotis.

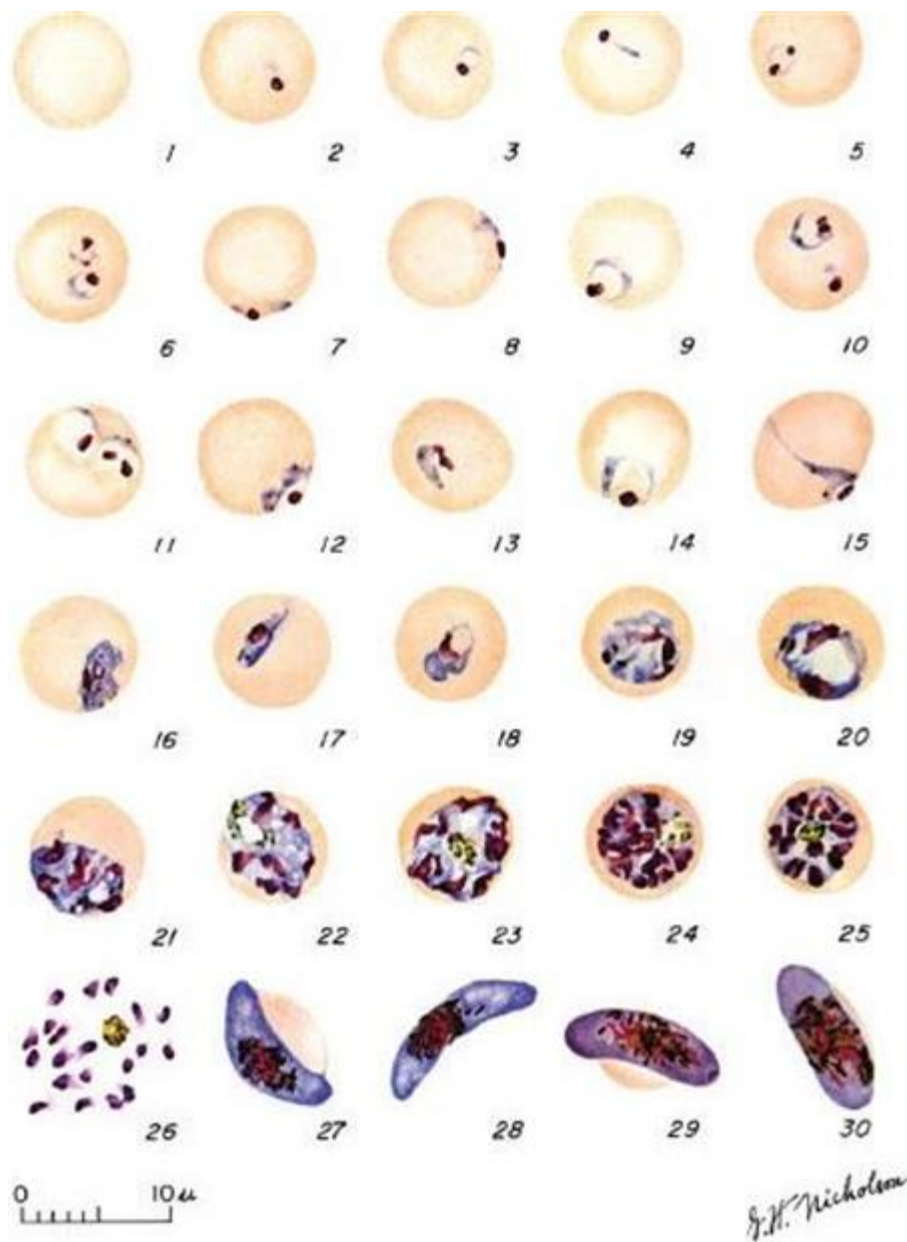


Plasmodium vivax

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

Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

Plasmodium falciparum



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

Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

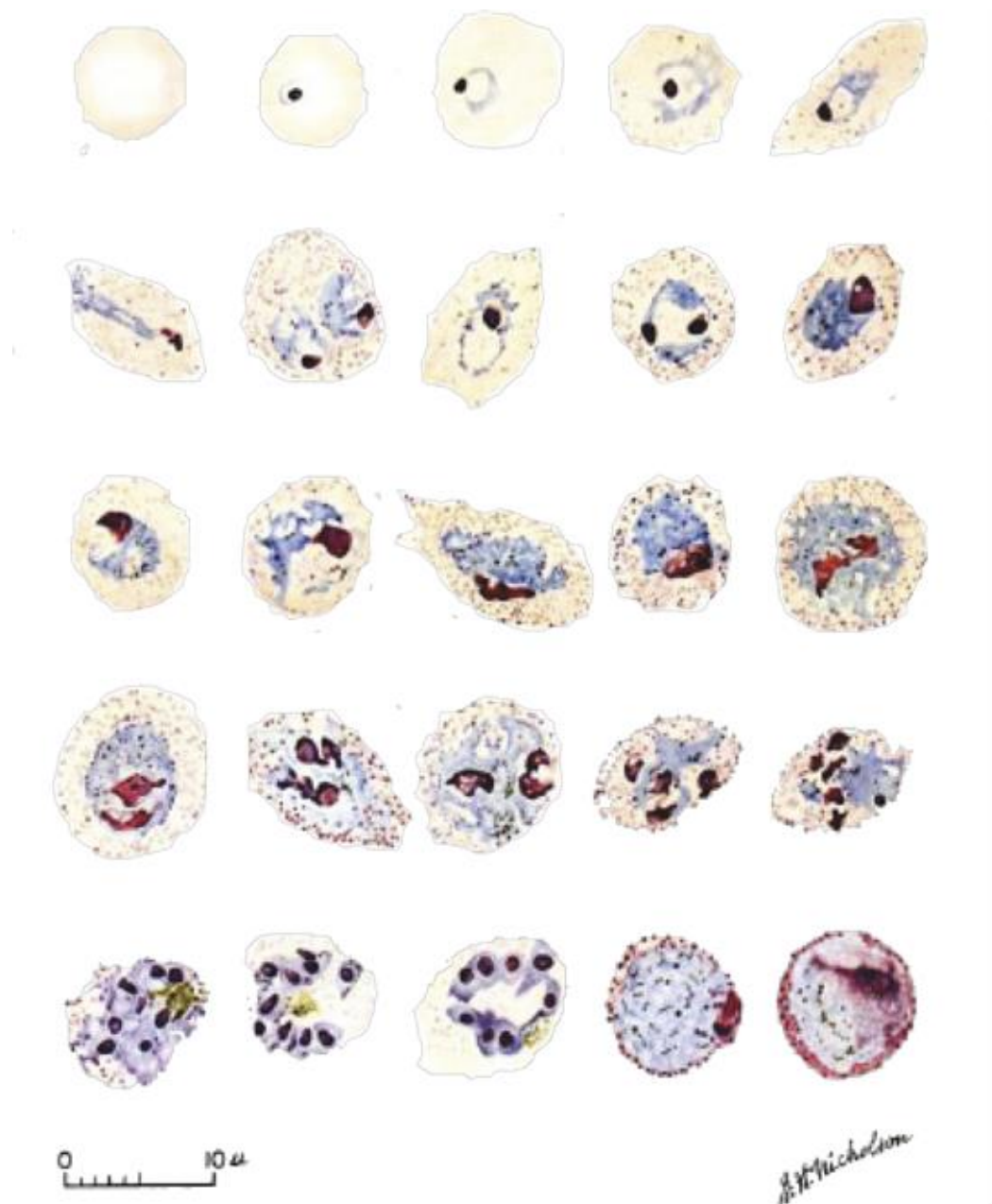
Plasmodium malariae



- 1. Glóbulo rojo normal
- 2-5. Trofozoíto en forma anular o anillos
- 6-13. Trofozoíto
- 4-22. Esquizonte
- 23. Gametocito en desarrollo
- 24. Gametocito maduro (Macrogametocito o hembra)
- 25. Gametocito maduro (Microgametocito o macho)

Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

Plasmodium ovale



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

Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

Figura 5.12 Artefactos que se pueden encontrar en la observación microscópica de muestras de sangre

ELEMENTOS DE LA SANGRE



Bacterias



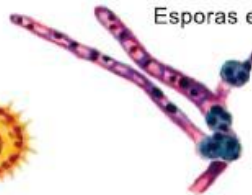
Esporas



Células vegetales



Esporas e hifas



Misceláneas



Partículas de polvo



Cristales de colorante de Giemsa



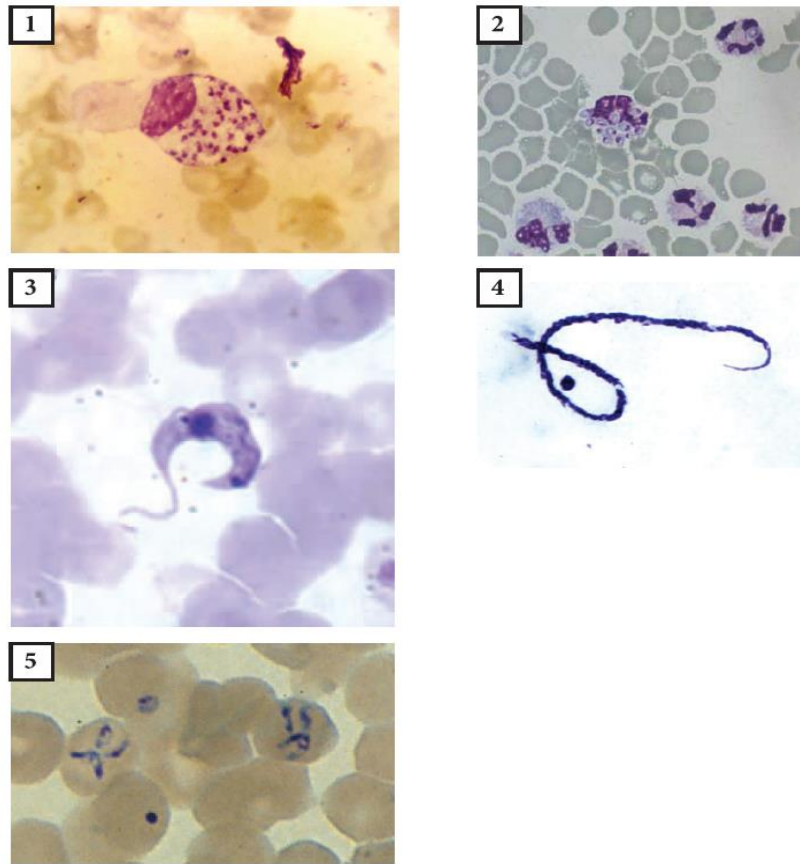
Rayones en forma de espinoza de pescado sobre la lámina porta-objetos



"Huecos" cristalinos en porta-objetos viejos

Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

Figura 5.13: 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)



Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

5.4.17. Examen de las extensiones sanguíneas

El diagnóstico microscópico de la malaria se inicia observando la gota gruesa porque ésta es 20-30 veces más sensible.

Para observar el equivalente de 100 campos de gota gruesa (objetivo de inmersión), tendríamos que observar de 2000 a 3000 campos en el extendido del 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:

- a) La gota gruesa es inadecuada o no se cuenta con una gota gruesa
- b) Es necesario confirmar la especie de *Plasmodium*
- c) En parasitemias muy altas en gota gruesa (más de 100 parásitos por campo) el frotis se utiliza para realizar la densidad parasitaria de manera más precisa.

5.4.17.1 Técnica de examen microscópico 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. La microscopía basada en la tinción de Giemsa es extremadamente sensible y el examinador experimentado puede detectar *Plasmodium* cuando su densidad es de tan solo 5 a 10 por microlitro de sangre.

Equipo:

- Microscopio con objetivos de 10x, 40x y 100x.

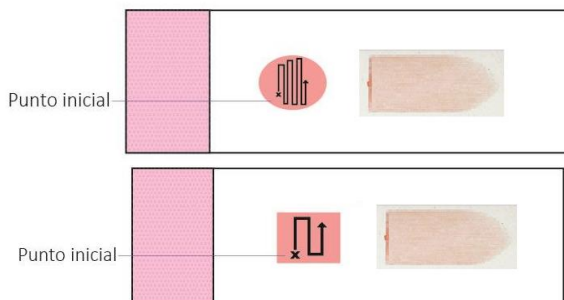
Reactivos:

- Aceite de inmersión
- Contó metros
- Calculadora
- Formularios de registro
- Bolígrafo
- Papel limpia lente
- Papel toalla
- Cajas portaláminas
- Láminas con muestras coloreadas.

Procedimiento:

1. Colocar en la platina la preparación a examinar, enfocar la extensión gruesa con el objetivo 10x y 40 x de tal manera que se observe la muestra a analizar haga una exploración en busca de otros parásitos o detritos.
2. Girar el revólver hasta colocar el objetivo de inmersión, colocar una gota de aceite de inmersión sobre la extensión seleccionada de la gota gruesa.
3. Utilizando el ajuste fino, enfocar los elementos celulares y confirmar que esa parte de la extensión es aceptable para un examen rutinario: 15 a 20 glóbulos blancos por campo de gota gruesa proporcionarán un grosor satisfactorio de la extensión. Las gotas gruesas con menos glóbulos blancos por campo necesitarán un examen más extenso.
4. Comenzando por la marca X que aparece en el diagrama siguiente, examinar cuidadosamente la extensión, campo por campo, pasando de un campo al contiguo, como se muestra en el diagrama. Para que el examen sea eficiente, enfocar y reenfocar continuamente con el ajuste fino durante el examen de cada campo.

Figura 5.14 Lectura de gota gruesa, con objetivo de 100 X



Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

5. Examinar toda la muestra sistemáticamente en busca de parásitos presentes.
6. Si no hay parásitos en toda la muestra examinada se considerará negativa.
7. Si la muestra es positiva y se ha identificado la especie, determinar la densidad parasitaria.

8. Terminar el examen registrando los resultados que se hayan obtenido en el formulario (o formularios) apropiados.
9. Eliminar completamente el aceite de inmersión de la preparación, limpiando de forma suave la muestra y guarde la preparación en una caja portaláminas.
10. Limpiar suavemente el objetivo de inmersión.

5.4.17.2. Técnica de examen microscópico de frotis

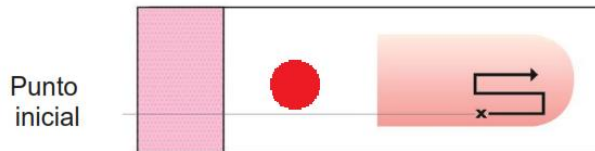
Los frotis no se examinan de forma sistemática para establecer el diagnóstico en un paciente, el examen del frotis se recomienda cuando la extensión gruesa es demasiado pequeña, se perdió la muestra en la coloración y no es examinable, cuando la confirmación de la especie en la gota gruesa resulta difícil o no es segura. El frotis se observa en el borde distal (cola) debido a que es allí donde las células:

- a) Están distribuidas de manera más uniforme.
- b) Se encuentran en una sola capa.
- c) Presentan una distorsión mínima.

Procedimiento:

1. Colocar la lámina con muestra coloreada sobre la platina del microscopio con el objetivo 10x y enfocar la muestra a examinar.
2. Girar el revólver y colocar el objetivo de inmersión (100X) en dirección a la X marcada en el diagrama abajo.
3. Colocar una gota de aceite de inmersión
4. Hacer girar el objetivo 100 X hasta hacer contacto con el aceite.
5. Examinar la extensión siguiendo el movimiento que se muestra en el diagrama: primero desplazarse a lo largo del borde de la extensión, después moverla un campo hacia adentro, repetir el movimiento lateral y así sucesivamente, se debe observar siguiendo la pauta de movimiento indicada en figura.

Figura 5.15 Lectura de frotis, con objetivo de 100 X



Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

5.5. Densidad parasitaria

La determinación de la densidad parasitaria es útil para evaluar la severidad de la infección malarica en los programas de control del paludismo. En los estudios de eficacia del tratamiento antiparasitario (estudios in vivo o ensayos clínicos, es necesario monitorear la densidad parasitaria en forma cuantitativa (parásitos /ul de sangre) durante el tratamiento. Si el tratamiento es eficaz, la densidad parasitaria disminuirá progresivamente.

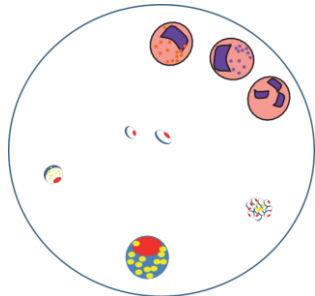
Si bien son las formas asexuadas las que ocasionan la clínica en el paciente, cuando se determina la parasitemia en muestras de *P. falciparum* bastará con reportar la densidad parasitaria de los estadios asexuados, mientras que en las otras especies se suman tanto las formas sexuadas como asexuadas debido a la dificultad de diferenciar con precisión una forma de otras y por otra parte. en estas especies los estadios asexuados son sensible a los esquizontocidas sanguíneos. La parasitemia se determina en la gota gruesa frente a los leucocitos, mientras que en el frotis se hace frente a los glóbulos rojos, en los dos casos se reporta como parásitos/ul de sangre. En los dos cálculos se utiliza los parámetros hemáticos del paciente, pero de no contar con ellos es posible utilizar las constantes recomendadas. Estos cálculos se efectúan una vez se tenga certeza del diagnóstico de la lámina examinada.

Para la determinación de la densidad parasitaria se utilizan los métodos de conteo por leucocitos en gota gruesa o conteo de parásitos por glóbulos rojos en el frotis.

5.5.1 Método para la determinación de parásitos por microlitro de sangre en gota gruesa.
Se registra el conteo de formas asexuadas para *P. falciparum* y del total de las formas para *P. vivax*, solo ingresar al conteo los parásitos que están dentro del campo microscópico y los glóbulos blancos bien definidos

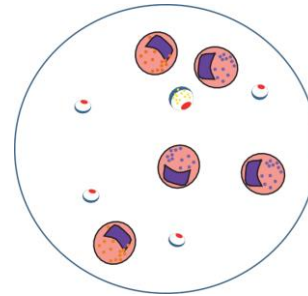
Figura 5.16 Ejemplo conteo de la gota gruesa

Campos microscópico N° 1



Campo 1
Formas parasitarias 5
Leucocitos 3

Campo microscópico N° 2



Campo 2
Formas parasitarias 5
Leucocitos 5

Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

Se cuenta las formas parasitarias (asexuadas para *P. falciparum* y todas las formas para las otras especies) frente al número de leucocitos. Cuando se termina el conteo se aplica la fórmula general la misma fórmula que sirve para hacer los controles de los pacientes en los días de seguimiento del tratamiento. En la fórmula se usa la constante 6.000 leucocitos / μ l de sangre

Se calcula en base a la siguiente fórmula:

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

N° de parásitos = Número de parásitos contados

N° de leucocitos = Número de leucocitos contados

μ l = microlitro

- Se debe tener el conteo de glóbulos rojos y blancos.
- En el caso de no contar estos datos se asumen concentraciones constantes 5,000,000 / μ l sangre y 6,000 leucocitos/ μ l sangre
- El conteo de leucocitos y parásitos se realiza simultáneamente y realizando el recuento en desplazamiento a los campos adyacentes donde podrán encontrarse campos que solo tengan leucocitos o parásitos, que también deben contarse.

Densidad parasitaria método cuantitativo en gota gruesa conteo por leucocitos.

1.-Conteo por leucocitos, GG, se realiza un conteo de parásitos y leucocitos de forma simultánea.

- 0 parásitos → contar hasta 500 campos
- 1-99 parásitos → contar hasta 500 leucocitos
- 100 a más parásitos → contar hasta 200 leucocitos

Cuando al contar 500 parásitos y aun no se han alcanzado los 200 leucocitos se detiene el recuento tomando en cuenta la cantidad de leucocitos presentes y se aplica la fórmula general para estimar la densidad parasitaria

Ejemplos:

Ejemplo para *Plasmodium vivax*:

- Pv (77 EAS + 30 ESS) = 107 parásitos / 201 leucocitos
Aplicando la fórmula para densidad parasitaria en gota gruesa:

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

Densidad parasitaria = 3 194 parásitos/ μ l de sangre

- Pv (470 EAS + 45 ESS) = 515 parásitos/56 leucocitos

Aplicando la fórmula para densidad parasitaria:

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

Densidad parasitaria = 55 179 parásitos/ μ l de sangre

- Pv 4 EAS= 4 parásitos/510 leucocitos

Aplicando la fórmula para densidad parasitaria:

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

Densidad parasitaria = 47 parásitos/ μ l de sangre

Ejemplo para *Plasmodium falciparum*:

- Pf 3 EAS = 3 parásitos/ 510 Leucocitos con presencia de ESS

Aplicando la fórmula para densidad parasitaria:

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

Densidad parasitaria = 35 parásitos/ μ l de sangre
Presencia de ESS

- Pf 567 EAS= 567 parásitos/ 58 leucocitos

Aplicando la fórmula para densidad parasitaria:

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

Densidad parasitaria = 58 655 parásitos/ μ l de sangre

- Pf 45 EAS = 45 parásitos / 201 leucocitos con presencia de ESS

Aplicando la fórmula para densidad parasitaria:

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

N° de leucocitos

Densidad parasitaria = 1 343 parásitos/μl de sangre

Ejemplo de Infecciones mixtas

- Inf. Mixta: Pv 10 EAS y Pf 178 EAS /503 leucocitos

Aplicando la fórmula para densidad parasitaria para cada una de las especies:

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

Densidad parasitaria para *P. vivax* = 119 parásitos/μl de sangre

Densidad parasitaria para *P. falciparum* = 2 123 parásitos/μl de sangre

Para reportar una muestra como negativa, se deben observar al menos 500 campos.

5.5.2. Método para la determinación de parásitos por microlitro de sangre frotis.

Para determinar la densidad parasitaria en el frotis primero se debe calcular el número de campos a observar, haga un promedio de glóbulos rojos en tres campos con distribución de células y a partir de ese dato se calcula el número de campos que se deben observar para contar 10 000 glóbulos rojos.

$$\text{Campos a observar} = \frac{10,000 \text{ glóbulos rojos}}{\text{Promedio de 3 campos}}$$

Ejemplo: Campo 1:350 GR, Campo 2:380 GR, Campo 3:410 GR Promedio 380 GR

$$\text{Campos a observar} = \frac{10\,000 \text{ glóbulos rojos}}{380 \text{ glóbulos rojos}} = 26 \text{ campos}$$

Una vez contabilizados el total de campos y el total de eritrocitos parasitado, esta fórmula supone que cada glóbulo parasitado representa a un parásito indistintamente que tenga más de una forma. Se aplica la fórmula:

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{\# \text{ parásitos} \times 5\,000\,000 \text{ de glóbulos rojos}/\mu\text{l de sangre}}{10,000 \text{ glóbulos rojos}}$$

Se ha determinado una cifra media para aplicar a la fórmula. Se utiliza como # de glóbulos rojos /μl: 5 000 000

$$\text{Parásitos / } \mu\text{l} = \frac{\# \text{ parásitos} \times \# \text{ de glóbulos rojos}/\mu\text{l de sangre}}{10,000 \text{ glóbulos rojos}}$$

El valor obtenido se reporta como parásitos/μl de sangre.

Si en la multiplicación da un número con decimales se aproxima al entero más próximo cuando el decimal es \geq de 5.

Posteriormente, si es requerido obtener el porcentaje de glóbulos rojos parasitados, se aplica otra regla de tres, conociendo el número de glóbulos rojos parasitados en 10,000 glóbulos rojos se calcula su equivalencia en 100 glóbulos. De esta forma se obtiene el resultado en porcentaje.

$$\text{Porcentaje de glóbulos rojos parasitados} = \frac{\text{número de glóbulos rojos parasitados}}{10\,000 \text{ glóbulos rojos}} \times 100$$

5.6. Informe de resultados e interpretación

La malaria no se descarta con un resultado negativo de un extendido de sangre (gota gruesa y frotis). Cuando se está examinando un paciente individual de quien se posee evidencia clínica y epidemiológica de malaria, es necesario tomar dos muestras adicionales cada 24 horas si la primera gota gruesa es negativa.

Las muestras adicionales se deben tomar durante o inmediatamente después de la fiebre, esta recomendación aplica para *P. falciparum* en cuya infección solo circulan los estadios más jóvenes (anillos), después de la ruptura del esquizonte (asociada a la fiebre) y los gametocitos, el resultado de la observación microscópica se debe reportar en el informe de análisis respectivo y no debe ser escrito sobre la lámina para no alterar el control de calidad.

5.6.1 Abreviaturas a utilizar en el reporte de identificación y abreviaturas del parásito.

Para el reporte de la identificación de las especies de *Plasmodium* se puede utilizar los siguientes ejemplos:

- Pv. Plasmodium vivax
- Pf: Plasmodium falciparum
- Infección mixta de P vivax y P. falciparum: VF
- EAS: Formas asexuadas
- ESS: Formas sexuales

5.6.2 Resultado negativo: es cuando la observación de 500 campos en gota gruesa no se ha identificado la presencia de parásitos, en el informe de análisis se escribe así:

No se observaron formas parasitarias de *Plasmodium spp.* en 500 campos.

5.6.3 Resultado positivo: es cuando se observa una gota gruesa o un frotis en donde se evidencia la presencia de uno o varios parásitos de *Plasmodium spp.*, se debe de informar mediante el sistema cuantitativo que incluye la identificación del parásito (género y especies) y la determinación de la densidad parasitaria.

En caso de monoinfección:

- *P. vivax*:
Datos obtenidos del conteo de parásitos en gota gruesa (antes de aplicar la fórmula).
Pv (125 EAS+10 ESS)= 135 parásitos/203 leucocitos, aplicando la fórmula de recuento por leucocitos reportamos:

Reportar: Positivo para *P. vivax*

Recuento: 3,990 parásitos/μl de sangre

- *P. falciparum*:
Datos obtenidos de la observación de la gota gruesa: Pf (700 EAS) = 700 parásitos/50 leucocitos y presencia de ESS.

Reportar: Positivo para *P. falciparum*

Recuento: 84,000 parásitos/μl de sangre con presencia de estadios sexuales.

- En caso de Infección mixta:
Datos obtenidos de la observación de la gota gruesa: *P. falciparum* (520 EAS) = 520 parásitos/70 leucocitos, *P. vivax* (30 EAS+1 ESS) = 31 parásitos/70 leucocitos
Reportar: Positivo para infección mixta
Recuento: se observan *P. falciparum* 44,571 parásitos/μl de sangre de *P. falciparum* y 2,657parásitos/μl de sangre de *P. vivax*.

Nota: si el cálculo realizado se obtiene un número con decimales se aproxima al entero más próximo cuando es ≥ 5 .

Tabla 5.2. Interpretación de la densidad parasitaria.

Densidad	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>	
	/100 Leucocitos	por μ l sangre	/100Leucocitos	por μ l sangre
Baja	< 10	< 800	< 10	< 800
Moderada	10 – 50	800-4000	10-30	800-2400
Alta	> 50	> 4000	> 30	> 2400

Fuente: Fox E and GT Strickland, The interrelationship of plasmodium falciparum and P. vivax in the Punjab. Transactions of the royal society of torpical medicine and hygiene (1989;83:471)

5.7 Limpieza y almacenamiento de los portaobjetos para el diagnóstico microscópico de malaria

Los portaobjetos utilizados en la microscopía suelen suministrarse en cajas de 50 o 72, la etiqueta puede decir «lavados» o «limpios».

Para el diagnóstico microscópico de malaria se prefieren los portaobjetos de vidrio de calidad «superior», con una banda mate para etiquetarlos, un portaobjeto de calidad «superior» hace que los portaobjetos no se vuelvan opacos en las condiciones existentes en los climas tropicales. Los portaobjetos de peor calidad son más baratos, pero se deterioran rápidamente en climas húmedos y calientes; el lavado no elimina las manchas opacas, y los portaobjetos se vuelven inutilizables para un examen microscópico preciso. Los portaobjetos deben lavarse, secarse y envolverse adecuadamente, este proceso debe realizarse en todo establecimiento en el que se utilicen láminas portaobjetos.

Los portaobjetos que no estén bien limpios reducirán la calidad de las extensiones sanguíneas, de la tinción, así como el examen microscópico y diagnóstico, esto supone un riesgo para los pacientes. Para evitarlo, se debe asegurar que los portaobjetos se hayan seleccionado, limpiado, envuelto y guardado adecuadamente.

5.7.1 Lavado y preparación de los portaobjetos nuevos

A continuación, se presenta la lista de materiales y la descripción de la forma de lavar y preparar los portaobjetos nuevos que se utilizarán en la realización de las extensiones sanguíneas.

Materiales:

- Láminas portaobjetos nuevos
- Recipiente de tamaño mediano;
- Detergente líquido o en polvo; (detergente neutro extra liquido o detergente en polvo a un porcentaje del 3%).
- Paños limpios o esponja suave;
- Paños de algodón limpios que no dejen pelusas.
- Alcohol al 70 % o 90 %.
- Frascos de boca ancha con tapa de rosca para poner el alcohol y los portaobjetos;
- Fuente de agua limpia.
- Cajas portaláminas
- Rollo de tirro
- Bolsa de desecante

Procedimiento:

1. Separar los portaobjetos nuevos unos de otros e introdúzcalos en la solución de detergente preparada previamente, durante 4 a 8 horas (toda la noche para mayor comodidad)

2. Después, limpiarlos por ambos lados frotando ambas superficies con el trapo o la esponja sujetos entre el pulgar y el índice.
3. Enjuagar los portaobjetos uno por uno en agua limpia para eliminar el detergente.
4. Eliminar el agua de los portaobjetos antes de ponerlos en el frasco con alcohol taparlos bien. Mantener alejado de la luz solar directa.
5. Se puede dejar los portaobjetos en alcohol por un 24 a 48 horas tiempo , si se necesitan inmediatamente, sacar los portaobjetos y secar muy bien con un paño de algodón limpio que no deje pelusas.
6. El portaobjeto está listo para ser usado. (OMS, 2014, pág. 16)
7. Guardar los portaobjetos limpios en cajas portalámina, en sus cajas de fábrica o formando paquetes con papel bond, identificando contenido y fecha de limpieza.
8. Bolsa de desecante

5.7.2 Lavado y preparación de los portaobjetos reciclados

A continuación, se presenta la lista de materiales y la descripción de la forma de lavar y preparar los portaobjetos introducir los portaobjetos en alcohol por 24 a 48 horas antes de secar tos reciclados que se utilizarán en la realización de las extensiones sanguíneas.

Materiales:

- Portaobjetos reciclados;
- Recipientes de plástico de tamaño mediano;
- Un buen detergente líquido o en polvo; (detergente neutro extra liquido o detergente en polvo a un porcentaje del 3 %).
- Paños de lavar o esponja suave;
- Paños de algodón limpios y que no dejen pelusas
- Frascos de boca ancha con tapa de rosca para poner el alcohol y los portaobjetos;
- Fuente de agua limpia.
- Hojas de papel limpio cortadas en rectángulos
- Cajas de portaobjetos vacías, como las de los portaobjetos nuevos;
- Rollo de tirro.
- Bolsa de desecante

Procedimiento:

1. Poner los portaobjetos en la solución de detergente durante 6 a 8 horas (toda la noche para mayor comodidad), (detergente neutro extra liquido o detergente en polvo a un porcentaje del 3 %).
2. Después, limpiar uno por uno del mismo modo que en el paso 2 descrito con anterioridad, hasta eliminar todos los restos de sangre y aceite de inmersión. Puede ser necesario más de un lavado, dependiendo del estado de los portaobjetos; de ahí la necesidad de dos recipientes.
3. Cuando los portaobjetos estén limpios, enjuagarlos en agua limpia para eliminar todos los restos de detergente.
4. Introducir los portaobjetos en alcohol por 24 a 48 horas antes de secar
5. Secar los portaobjetos uno a uno con el paño de algodón. Eliminar las láminas no aptas para extensiones.
6. Guardarlos en cajas portaláminas, si no se tiene, envolver los portaobjetos secos, en paquetes de 10, con trozos de papel en cada portaobjeto, sujetar los paquetes con tirro y colocarlos en cajas de cartón.
7. Con fines de control de la calidad, etiquetar cada caja con la fecha de limpieza. Estos paquetes de láminas duran aproximadamente ocho semanas.

5.8. Aseguramiento de la calidad

Son las actividades que realiza constantemente el Departamento de Laboratorio Nacional de Salud Pública para vigilar las operaciones y resultados, si son exactos y precisos para emitir el resultado. La estructura de la red de aseguramiento de la calidad es desconcentrada y la componen el laboratorio nacional de referencia y los referentes intermedios. Hay 5 referentes regionales intermedios (cada uno formado por un microscopista y un supervisor de la red de laboratorios clínicos) y un sexto referente del seguro social.

El sistema de aseguramiento de la calidad del diagnóstico se compone de la evaluación de competencias (certificación de microscopistas) y de la evaluación a través de dos actividades, el control de calidad directo y el

control de calidad indirecto. Adicionalmente, se cuenta con la supervisión de los referentes nacionales e intermedios, quienes realizan la actividad en los escenarios correspondientes. Finalmente, los referentes tienen la responsabilidad de capacitar a su red, dependiendo de su área de injerencia y su establecimiento de salud al cual pertenecen, con acompañamiento inicial del LNNSP.

A nivel nacional se evalúa el desempeño a través del Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) por el laboratorio supranacional de Honduras y sus competencias a través de la evaluación externa de competencias para el diagnóstico microscópico de malaria (NCAMM) por sus siglas en Inglés.

5.8.1 Control de calidad indirecto

Este control de calidad se basa en la revisión de las láminas de diagnóstico, por lo tanto el nivel superior realiza el control de calidad indirecto (CCI) al nivel intermedio conformado por los microscopistas referentes del nivel regional y los referentes del ISSS.

Los referentes del nivel intermedio están encargados de realizar el CCI a su red local.

5.8.1.1 Procedimiento de láminas diagnosticadas y revisadas

En el control de calidad indirecto los profesionales o microscopistas que realizan diagnóstico de malaria deben enviar a control de calidad a su laboratorio referente y envían el 10% de muestras diagnosticadas como negativas y el 100% de muestras positivas en forma semanal.

El envío semanal de láminas al laboratorio referente se realiza cada viernes y los primeros dos días de inicio de semana de acuerdo a semana epidemiológica

Las muestras con diagnóstico positivo se deben enviar el 100% a control de calidad al DLNSP en las primeras 24 horas de haber emitido su diagnóstico gota gruesa, frotis, acompañado con boleta Lab-2 con información completa: diagnóstico, género, especie, estadíos, recuento parasitario; adjuntando datos del paciente: nombre, edad, sexo, dirección, fecha de toma de muestra y resultado del análisis

5.8.1.2 Requisito del envío de láminas a control de calidad

- a) Láminas bien identificadas: clave del establecimiento, códigos, No.
- b) La muestra tiene que ser significativa.
- c) La lámina debe estar coloreada adecuadamente y sin restos de aceite de inmersión.
- d) Proteger la lámina para su transporte.
- e) Adjuntar las láminas con el formulario del Reporte Epidemiológico y registro de respuestas del control de calidad Indirecto que se encuentra en el POE del CCI.
- f) Identificar el paquete de láminas. (Ver Figura 5.17).

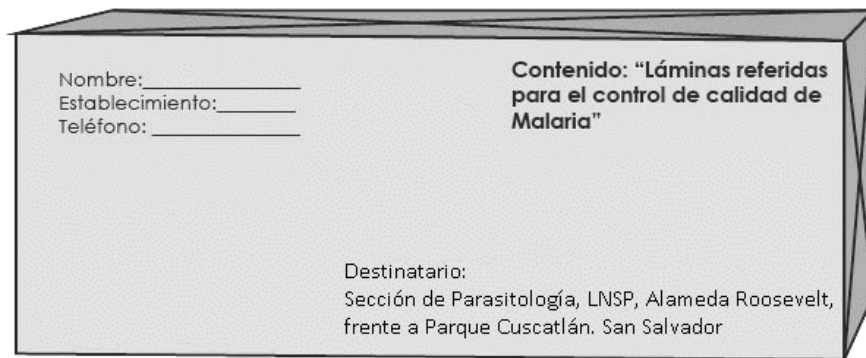
Remitente: Se identifica con nombre del establecimiento de donde proceden las muestras y teléfono de contacto y nombre del responsable del envío.

Destinatario: Sección de Malaria, Laboratorio Nacional de Salud Pública, Alameda Roosevelt, Frente a parque Cuscatlán, San Salvador.

Cuando el destinatario es otro de los laboratorios referentes llevará el nombre del establecimiento de salud, la dirección y ciudad

Contenido: Láminas referidas para el control de calidad de la malaria.

Figura 5.17 Ejemplo de paquete de láminas para el transporte de muestras referidas a control de calidad para el diagnóstico de la malaria



Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL

Parámetros de evaluación del control de calidad

1. Calidad técnica de la muestra en la lámina, de acuerdo a los siguientes criterios: identificación, cantidad, tamaño, grosor y ubicación.
2. Calidad de la coloración: deshemoglobinización, tonalidad y elementos sanguíneos.
3. Forma de reporte.
4. Concordancia entre el resultado del evaluado y el evaluador.
5. Se determina el puntaje acumulado del diagnóstico del participante
6. Se calcula el porcentaje de calidad técnica

5.8.1.3 Fuentes de error en la calidad técnica de la muestra

- Muestra con identificación incorrecta.
- Deterioro de muestras por manejo inadecuado de las láminas.
- Muestras no representativas en cuanto a cantidad, tamaño y grosor.
- Células sanguíneas sin su color característico.
- Formulario LAB-2 con información incorrecta o datos incompletos.
- Láminas sin muestra.
- Buffer con pH no ajustado.
- Dilución incorrecta.
- Tiempos no normalizados de coloración.

5.8.1.4 Informe de resultados del control de calidad indirecto

Si en el control de calidad se encuentran discordancias:

- a) Se informa de inmediato al profesional responsable del error.
- b) Se solicita la asistencia del profesional al DLNSP para verificar y corregir.
Si los resultados son concordantes en el reporte:
- c) El informe de resultados en físico es mensual.

- d) El informe de indicadores complementarios se emite a final de año, los cálculos se realizan con el total de muestras observadas en el año. La forma de realizar los cálculos de estos indicadores se encuentra en el POE de la actividad.

5.8.1.5. Indicadores del CCI

- Puntaje acumulado:
Se realiza cada vez que se hace el CCI. Los valores de referencia del puntaje acumulado se observan en la tabla 5.3.

Tabla 5.3. Valores de referencia del puntaje acumulado del CCI

Interpretación	Puntaje	Acción
Excelente	≥ 90	Felicitaciones equipo. Desempeño ejemplar. Se continua con el CCI
Muy bueno	80 - < 90	Felicitaciones equipo. Muy buen desempeño. Se continua con el CCI
Bueno	70- < 80	Buen desempeño del equipo. Se requiere mejora. Reentrenamiento para identificar debilidades. Verificar las competencias del equipo de trabajo. Verificar el microscopio. Verificar la calidad de reactivos.
Pobre	< 70	Desempeño pobre. Se informa al equipo del desempeño pobre. Acciones inmediatas de mejora. Requiere supervisión en el sitio de trabajo. Revisión de las competencias del equipo. Considerar entrenamiento en el sitio de trabajo para identificar debilidades. Verificar calidad del microscopio. Verificar calidad de reactivos. Seguimiento institucional de acciones correctivas

Fuente: World Health Organization, 2016.

El porcentaje de calidad técnica. Se calcula cada vez que se realice el CCI, como también sucede con el porcentaje de calidad técnica que tiene como parámetros de referencia los valores de la tabla 5.4.

Tabla 5.4. Valor e interpretación de la calidad técnica

% Calidad técnica	Valor	Intervención
Satisfactorio	80-100%	Se continúa con CCI
Insatisfactorio	<80%	CCI con acción de automejora y seguimiento en la supervisión.

Fuente: World Health Organization, 2016.

5.8.2 Control de calidad directo

Esta evaluación se realiza en todos los niveles de la red de laboratorios con una frecuencia de una vez al año, se evalúa la capacidad del desempeño del diagnóstico de los profesionales y microscopistas por medio de un panel de 10 láminas analizadas y clasificadas por el personal de la sección de Parasitología del DLNSP o proporcionadas por la Organización Panamericana de Salud.

5.8.2.1 Procedimiento

- El DLNSP con una periodicidad de una vez al año, envía a los microscopistas referentes del nivel intermedio, un panel de láminas conteniendo muestras positivas o negativas a Plasmodium para realizar su control de calidad directo y otros paneles con los que evalúa la red local encargada de realizar el diagnóstico microscópico de malaria.
- Las láminas se envían con un código de identificación.
- Cada panel lleva un formulario donde el profesional evaluado emite sus resultados.
- El evaluado realiza y reporta de acuerdo a sus conocimientos:
 - a) Presencia o no de Plasmodium
 - b) Género, especie
 - c) Estadíos
 - d) Densidad parasitaria
- El microscopista lo primero que debe hacer es responder su CCD y enviar el resultado al DLNSP de acuerdo con el tiempo de respuesta otorgado
- Posteriormente, el microscopista referente de acuerdo con el cronograma y previa convocatoria empieza a recibir grupos de integrantes de la red local para que realicen el CCD.
- A los participantes se les comunica el tiempo asignado para la evaluación el cual siempre debe ser cómodo para realizar la actividad. La evaluación se debe realizar en perfecto silencio a los participantes no se les debe permitir la comunicación.
- El participante llena el informe de resultados del CCD y entrega al microscopista referente.
- El DLNSP recibe y evalúa los resultados con estimación del puntaje acumulado de cada participante.
- El DLNSP elabora los informes de retroalimentación de cada participante con la información obtenida. Este informe debe especificar: fecha en la que se hizo la evaluación, los resultados del referente o panel problema, resultados y análisis individuales donde se indica el código, los resultados informados por el participante y los resultados del puntaje acumulado indicando su interpretación y acción, al final del informe se proporciona un número de teléfono y correo electrónico de contacto y la persona y cargo con la que se pueden contactar en caso de tener inquietudes.
- Cuando el DLNSP tiene el total de resultados de todas las regiones, elabora el informe grupal que debe pasar a la sección de calidad del DLNSP y dar a conocer a la red de laboratorios cuando se reúnan en los entrenamientos. El informe grupal debe tener el siguiente contenido: Introducción, objetivo general, objetivos específicos, características del panel, parámetros evaluados, escala de calificación, valores de referencia, interpretación, acciones a tomar, resultados: se indica la fecha en la que se hizo la evaluación, los resultados del panel problema, resultados grupales se muestran a través del código asignado a cada establecimiento de salud, donde es posible conocer el puntaje acumulado. Los resultados grupales se pueden mostrar en tablas y gráficas, análisis descriptivo, conclusiones técnicas: se describe la mayor fortaleza y debilidad en el grupo y se estimula a la revisión de las láminas discordantes por cada participante.

5.8.2.2 Informe de resultados

El resultado del CCD de cada uno de los participantes se envía a través del microscopista referente de cada región.

Los resultados se evalúan con el puntaje acumulado que se presenta en la tabla 5.5:

Tabla 5.5. Puntaje acumulado para el CCD

Interpretación	Puntaje	Acción
Excelente	≥ 90	Felicitaciones equipo. Desempeño ejemplar. Se continua con el CCD
Muy bueno	80 - < 90	Felicitaciones equipo. Muy buen desempeño. Se continua con el CCD
Bueno	70- < 80	Buen desempeño del equipo. Se requiere mejora. Reentrenamiento para identificar debilidades. Verificar las competencias del equipo de trabajo. Verificar el microscopio. Verificar la calidad de reactivos.
Pobre	< 70	Desempeño pobre. Se informa al equipo del desempeño pobre. Acciones inmediatas de mejora. Requiere supervisión en el sitio de trabajo. Revisión de las competencias del equipo. Considerar entrenamiento en el sitio de trabajo para identificar debilidades. Verificar calidad del microscopio. Verificar calidad de reactivos. Seguimiento institucional de acciones correctivas

5.8.3. Evaluación nacional de competencias.

Esta evaluación la realiza el DLNSP a los referentes de malaria regionales del país, con una frecuencia de ejecución de cada 3 años, donde se evalúa las competencias del diagnóstico microscópico de malaria certificando a los microscopistas.

La evaluación se realiza con 3 sets de láminas que salen de 2 paneles de láminas uno de 42 muestras y otro de 14 láminas. Dicho material es proporcionado por la Organización Panamericana de la Salud para garantizar que las características de las láminas sean cumplidas.

5.8.3.1. Procedimiento.

- Cada 3 años son convocados los referentes del diagnóstico microscópico de malaria al DLNSP para evaluar sus competencias.
- La evaluación tiene un componente teórico que es evaluado con un pre test y un pos test de 25 preguntas cada uno
- Adicionalmente, se realiza un pre test práctico de 18 muestras y la evaluación nacional de competencias donde los participantes se evalúan con el panel de 42 láminas y el de 14 muestras. Por otra parte, se evalúa la preparación de gotas gruesas y extendidos finos.
- En el desarrollo de la certificación se da al participante contenido teórico y prácticas de laboratorio de acuerdo con un cronograma, mientras que la segunda semana es la evaluación propiamente dicha, donde las láminas usadas para la evaluación tienen un tiempo de lectura de 10 minutos.

Se determinan las concordancias de resultados (positividad/negatividad), especie y recuento parasitario y dependiendo de los resultados se hace una clasificación de las competencias de los participantes en A, B, C y D. Los participantes que obtienen los niveles A y B se considera que aprobaron la evaluación. En la siguiente tabla se muestra los niveles de competencias

Nivel de competencia	Detección parasitaria (%)	Identificación de especie (%)	Recuento parasitario dentro del 25% del recuento real (%)	Preparación de gotas gruesas y extendidos finos
A	90-100	90-100	50-100	90-100
B	80-89	80-89	40-49	80-89
C	70-79	70-79	30-39	70-79
D	0-69	0-69	0-29	0-69

- Los participantes que obtienen nivel C y D se les entrega un certificado de asistencia.
- Los certificados de clasificación deben decir explícitamente el nivel de competencia obtenido por el participante y la fecha en que fue evaluado.
- Los facilitadores encargados de coordinar la evaluación deben ser nivel 1 que corresponde al máximo nivel otorgado internacionalmente por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), Centro Colaborador de la OMS/OPS.
- La evaluación se realiza en extremas condiciones de orden y silencio para garantizar la credibilidad de la evaluación.

5.8.3.2. Duración

Cuando se desarrollan certificaciones de competencias la duración es de 10 días hábiles, los cinco primeros días se utilizan para capacitar y estandarizar conceptos y los cinco últimos días son para realizar la evaluación nacional de competencias.

Cuando se realiza la recertificación la duración es de 5 días hábiles.

5.8.4. Supervisión

Tiene por objetivo verificar “in situ” los requerimientos para realizar el diagnóstico de malaria en los laboratorios y puestos de diagnóstico, se corrobora el cumplimiento de lineamientos nacionales relacionada con el diagnóstico de malaria y las actividades para el aseguramiento de la calidad.

Para realizar la supervisión se requiere:

- Supervisores capacitados para evaluar todos los parámetros de interés.
- Instrumentos de supervisión estandarizados.
- Contar con material de apoyo de la supervisión como puede ser: POEs, manuales, ilustraciones de morfología, plantillas para elaborar la gota gruesa y el extendido, láminas portaobjetos positivas con formas parasitarias de Plasmodium spp.
- Reunión finales e informe de retroalimentación con acciones de mejora.
- Seguimiento de indicadores y acciones de mejora.
- Supervisión de seguimiento.
- Financiamiento para realizar las visitas.
- Reunión anual de supervisores organizada por el DLNSP para el análisis integral de la actividad.

La supervisión es una actividad que debe realizarse por lo menos una vez al año a los laboratorios del nivel local y a los referentes del nivel intermedio o subnacional

Las responsabilidades de esta actividad en el país están divididas entre los siguientes actores así:

- Laboratorio Nacional de Salud Pública (DLNSP): supervisa a los referentes de control de calidad regionales, Sanidad Militar y a los referentes intermedios del ISSS.

- Red Nacional de laboratorios clínicos del Ministerio de Salud: supervisa a los referentes regionales de Laboratorio Clínico (LC) de la red de Salud pública.
- Nivel intermedio o subnacional: conformado por los referentes regionales de Laboratorio Clínico Ministerio de Salud, Coordinador institucional del laboratorio clínico (Instituto Salvadoreño del Seguro Social- ISSS) y quienes realizan supervisión a su respectiva red de laboratorio clínico en el nivel local y a su microscopista o par técnico del nivel intermedio.

Indicadores de supervisión

Se cuenta los siguientes indicadores:

- Porcentaje de supervisores entrenados en diagnóstico de malaria y actividades de aseguramiento de la calidad:

$$= \frac{\text{\# supervisores entrenados en los últimos 12 meses /año}}{\text{\# total de supervisores/año}} \times 100$$

Valor del indicador: 100%

Fuente de información: DLNSP y Coordinación de Redes de Laboratorios Clínicos del Ministerio de Salud.

- Porcentaje de responsables del diagnóstico en los establecimientos de salud entrenados en los últimos 12 meses

$$= \frac{\text{\# de responsables del diagnóstico de malaria entrenados en los últimos 12 meses}}{\text{\# de responsables del diagnóstico de malaria}} \times 100$$

Valor del indicador: 100%

- Porcentaje de establecimientos de salud con entrenamiento “in situ” durante la supervisión:

$$= \frac{\text{\# establecimientos de salud con entrenamiento "in situ" durante supervisión /año}}{\text{\# establecimientos supervisados /año}} \times 100$$

Valor del indicador: no hay un valor establecido, puede cambiar con las circunstancias.

Fuente de información: Coordinación de Redes de Laboratorios Clínicos del Ministerio de Salud, Referentes regionales de laboratorios clínicos públicos (MINSAL), Coordinador institucional del laboratorio clínico del ISSS, responsable encargado del laboratorio clínico de Sanidad Militar y DLNSP.

- Cobertura de la supervisión al nivel intermedios:

$$= \frac{\text{\# referentes intermedios con una supervisión /año}}{\text{\# de referentes intermedios a supervisar/año}} \times 100$$

Valor del indicador: cobertura de la actividad 100%

Fuente de información: Coordinación de Redes de Laboratorios Clínicos del Ministerio de Salud, Coordinador institucional del laboratorio clínico del ISSS y responsable encargado del laboratorio clínico de Sanidad Militar y DLNSP.

- Cobertura de la supervisión a los laboratorios y puestos con diagnóstico microscópico:

$$= \frac{\# \text{ de laboratorios y puestos con diagnóstico microscópico con 1 supervisión / año}}{\# \text{ de laboratorios y puestos a supervisar / año}} \times 100$$

Valor del indicador: cobertura de la actividad mínimo 90%

Fuente de información: Coordinación de Redes de Laboratorios Clínicos del Ministerio de Salud , Referentes regionales de LC, Coordinador institucional del laboratorio clínico del ISSS y responsable encargado del laboratorio clínico de Sanidad Militar y DLNSP.

- Cumplimiento de actividades de aseguramiento de la calidad por parte de supervisores del nivel intermedio:

Cumplimiento Control de calidad indirecto (CCI):

$$= \frac{\# \text{ establecimientos de salud con CCI / año}}{\# \text{ establecimientos programados para CCI / año}} \times 100$$

Valor del indicador: cumplimiento la actividad 100%

Fuente de información: Coordinación de Redes de Laboratorios Clínicos del Ministerio de Salud, Referentes regionales de LC, Coordinador institucional del laboratorio clínico del ISSS y responsable encargado del laboratorio clínico de Sanidad Militar y DLNSP.

Cumplimiento Control de calidad directo (CCD):

$$= \frac{\# \text{ establecimientos de salud con CCD / año}}{\# \text{ establecimientos programados para CCD / año}} \times 100$$

Valor del indicador: cumplimiento de la actividad mínimo 90%

Fuente de información: Coordinación de Redes de Laboratorios Clínicos del Ministerio de Salud , Referentes regionales de LC, Coordinador institucional del laboratorio clínico del ISSS y responsable encargado del laboratorio clínico de Sanidad Militar y DLNSP.

Cumplimiento entrenamientos:

$$= \frac{\# \text{ establecimientos de salud con entrenamiento / año}}{\# \text{ establecimientos programados para entrenamiento / año}} \times 100$$

Valor del indicador: cumplimiento de la actividad mínimo el 90 %

Fuente de información: Coordinación de Redes de Laboratorios Clínicos del Ministerio de Salud Referentes regionales de LC, Coordinador institucional del laboratorio clínico del ISSS y responsable encargado del laboratorio clínico de Sanidad Militar y DLNSP.

- Porcentaje de establecimientos de salud con lineamientos diagnóstico microscópico de malaria actualizado:

$$= \frac{\# \text{ establecimientos de salud con lineamientos de diagnóstico microscópico actualizado / año}}{\# \text{ total de establecimientos de salud con diagnóstico microscópico / año}} \times 100$$

Valor del indicador: cumplimiento 90 %

Fuente de información: Coordinación de Redes de Laboratorios Clínicos del Ministerio de Salud Referentes regionales de LC, Coordinador institucional del laboratorio clínico del ISSS y responsable encargado del laboratorio clínico de Sanidad Militar y DLNSP.

- Porcentaje de establecimientos de salud con POES técnicos actualizados:

$$\frac{\text{\# establecimientos de salud con POEs de diagnóstico microscópico actualizado /año}}{\text{\# total de establecimientos de salud con diagnóstico microscópico /año}} \times 100$$

Para este indicador se debe cumplir con los siguientes 5 contenidos:

- Toma de muestra
- Lectura de la muestra de gota gruesa y extendido
- Coloración de Giemsa
- Estimación de la densidad parasitaria
- Reporte

Valor del indicador: cumplimiento mínimo 90 %

Fuente de información: Coordinación de Redes de Laboratorios Clínicos del Ministerio de Salud, Referentes regionales de LC, Coordinador institucional del laboratorio clínico del ISSS y responsable encargado del laboratorio clínico de Sanidad Militar y DLNSP.

- Porcentaje de establecimientos de salud con reactivos para el diagnóstico de malaria:

$$\frac{\text{\# establecimientos de salud con reactivos para el diagnóstico microscópico de malaria /año}}{\text{\# total de establecimientos de salud con diagnóstico microscópico /año}} \times 100$$

En el indicador se debe chequear la existencia de:

- Colorante madre de Giemsa
- Buffer fosfato pH: 7,2
- Metanol absoluto

Valor del indicador: cumplimiento mínimo 90 %

Fuente de información: Coordinación de Redes de Laboratorios Clínicos del Ministerio de Salud , Referentes regionales de LC, Coordinador institucional del laboratorio clínico del ISSS y responsable encargado del laboratorio clínico de Sanidad Militar y DLNSP.

- Porcentaje de establecimientos de salud con microscopio adecuado para el diagnóstico de malaria:

$$\frac{\text{\# establecimientos de salud con microscopio adecuado para diagnóstico microscópico /año}}{\text{\# total de establecimientos de salud con diagnóstico microscópico /año}} \times 100$$

Fuente de información: Coordinación de Redes de Laboratorios Clínicos del Ministerio de Salud, Referentes regionales de LC, Coordinador institucional del laboratorio clínico del ISSS y responsable encargado del laboratorio clínico de Sanidad Militar y DLNSP.

5.9.5. Entrenamientos

La actividad de entrenamiento incluye las capacitaciones al personal nuevo que va a conformar la red de diagnóstico de malaria, los reentrenamientos y actualizaciones. La actividad se debe realizar preferiblemente anualmente y máximo con dos años de diferencia para dar la oportunidad a los microscopistas de hacer revisión de un número mayor de láminas que el utilizado en las otras actividades y ser evaluados en sus competencias.

Para la evaluación se utiliza un panel de 24 láminas. Ver tabla 5.6.

Tabla 5.6. Panel de 24 láminas para evaluación en capacitaciones

Tipo de láminas	Especificaciones	Especies y parasitemias
Negativa	10 láminas	
Positiva	14 láminas	10 láminas positivas para <i>P. falciparum</i> con una densidad mínima de 5 parásitos en 100 campos (30 parásitos/ μl de sangre) si se considera que un campo ideal mínimo tiene 10 leucocitos.
		1 lámina positiva para <i>P. vivax</i> o <i>P. ovale</i> con una densidad mínima de >100 000 parásitos/μl, debido a que las parasitemias alcanzadas por estas especies no llegan a estos niveles, esta lámina puede ser sustituida por una con una parasitemia por el orden de ≥20.000 parásitos/μl para esta especie.
		1 lámina positiva para <i>P. vivax</i> o <i>P. ovale</i> con una densidad mínima de 100-200 parásitos/μl.
		1 lámina positiva para infección mixta por <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> .

Indicadores de la actividad

Para evaluar al personal entrenado se calculan las siguientes concordancias:

- Concordancia de resultado
- Concordancia de especie
- Concordancia de estadio
- Concordancia del recuento parasitario

Para el cálculo de los indicadores se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Concordancia} = \frac{\text{Puntaje obtenido}}{\text{Puntaje ideal}} \times 100$$

- Como indicadores complementarios se puede determinar el índice kappa
- Se debe expedir un certificado de aprobación cuando el participante alcanza el valor establecido como satisfactorio, de no cumplirlo se entrega un certificado de asistencia. Se indica la fecha de la capacitación, intensidad horaria y debe ir firmado por las autoridades de salud.
- Indicar la frecuencia anual de la actividad tanto para capacitaciones como para reentrenamientos.
- Especificar temática y habilidades a desarrollar en los participantes.
- Incluir evaluación teórica con el objetivo de fijar conceptos y lineamientos en los participantes.
- Incluir en el componente teórico una presentación breve sobre el aseguramiento de la calidad que explique el objetivo de cada una de las actividades y la relevancia de obtener resultados confiables para la atención del paciente y para el sistema de salud. Este escenario es propicio para el reforzamiento sobre el llenado y envío de registros.
- El POE debe indicar la forma como las muestras deben ser examinadas por los participantes. El punto de inicio de lectura debe ser la parte inferior izquierda de la gota gruesa e iniciar la revisión sistemática de abajo para arriba.
- Para considerar aprobado el entrenamiento el participante debe lograr conseguir el valor de las 4 concordancias: resultado (detección), especie, estadio y recuento.
- Establecer los valores de referencia de los indicadores para la aprobación de la capacitación, detallados a continuación:

Tabla 5.7. Valores de referencia para determinar la aprobación de la capacitación

Nombre del indicador	Valor (satisfactorio)
Concordancia de resultado	≥80%
Concordancia de especie	≥80%
Concordancia de estadio	≥80%
Concordancia del recuento	≥40*%

*Este porcentaje corresponde a los recuentos concordantes en parásitos/ μl , considerando la cantidad como concordantes densidades parasitarias entre $\pm 25\%$ del recuento real.

Tabla 5.8. Puntaje de los indicadores de concordancia en el diagnóstico microscópico

Indicador	Puntaje	Explicación
Concordancia de resultado	1 punto	Se asigna un (1) punto a las láminas concordantes (positivas y negativas) entre el Laboratorio Referente y el participante. El puntaje total obtenido por el participante evaluado se divide en el puntaje del laboratorio referente y se multiplica por 100.
Concordancia de especie	Monoinfección: 1 punto. Infección mixta: calificación 0,5 para cada especie para un total de 1 punto por lámina.	Este indicador se trabaja con las láminas positivas. Para monoinfección: - Cuando la especie se diagnostica correctamente como monoinfección se califica con 1 punto. Pero si se diagnostica erradamente se califica cero. - Cuando se diagnostica infección mixta y el resultado incluye la especie correcta de la monoinfección se califica 0,5 y consecuentemente se califica el estadio y el recuento de la especie acertada. Para infección mixta: - Cuando las dos especies se diagnostican correctamente se obtiene 1 punto. - Cuando se acierta una especie y la otra es errada se obtiene 0,5. - Si se diagnostica monoinfección y la especie es correcta se obtiene 0,5. Lo anterior permitirá evaluar estadios y recuento solo para la especie concordante.
Concordancia de estadio	Monoinfección: Cada estadio concordante (EAS o ESS) se califica con 0,5 para un total de 1 punto. Si la monoinfección solo tiene un estadio se califica con 1 punto cuando hay concordancia.	Se trabaja con las láminas positivas. Si en una monoinfección que en el diagnóstico se omite o se le adiciona sin tener un estadio pierde 0,5. Cuando es una monoinfección y el evaluado escribe infección mixta, se califican con los valores de infección

	<p>Infección mixta: La concordancia de cada estadio vale 0,25: <i>P. vivax</i> (EAS): 0,25. <i>P. vivax</i> (ESS): 0,25. <i>P. falciparum</i> (EAS): 0,25. <i>P. falciparum</i> (ESS): 0,25. Total: 1 punto. Pero cuando se trata de una infección mixta y una de las especies solo tiene un estadio, se califica con 0,5 el estadio presente.</p>	<p>mixta para los estadios concordantes de la especie acertada. Cuando es infección mixta y solo acierta una de las especies se califican los estadios de la especie concordante.</p>
<p>Concordancia del recuento</p>	<p>Monoinfección: se califica 1 punto cuando el recuento es concordante y si es discordante se califica cero.</p> <p>Infección mixta: cada recuento por especie se califica con 0,5 para un total de 1 punto. Si es discordante en una de las especies se resta 0,5 y se califica 0,5.</p> <p>Nota Para <i>P. vivax</i>: se cuentan todas las formas en un solo recuento (asexuadas más sexuadas). Para <i>P. falciparum</i>: se cuentan solo las formas asexuadas.</p>	<p>Para monoinfección: Cuando se tiene una monoinfección y el participante diagnostica una infección mixta, se califica 0,5 si hay concordancia del recuento en la especie acertada.</p> <p>Para infección mixta: Cuando es infección mixta y se diagnostica acertadamente una de las especies se califica 0,5 si el recuento es concordante.</p> <p>Un recuento es concordante cuando el participante reporta una densidad parasitaria con un valor entre $\pm 25\%$ del valor real.</p> <p>Cuando una muestra tiene una densidad parasitaria < 50 parásitos/μl se da como concordante parasistemas entre < 50 a 75 parásitos /μl</p>

V. Disposiciones finales

a) Sanciones por el incumplimiento

Es responsabilidad del personal del MINSAL cuando corresponda, dar cumplimiento a los presentes Lineamientos técnicos, caso contrario se aplicarán las sanciones establecidas en la legislación administrativa respectiva.

b) Revisión y actualización

Los presentes Lineamientos técnicos serán revisados y actualizados cuando existan cambios, avances en los tratamientos, abordajes, estructura orgánica, funcionamiento del MINSAL, o cuando se determine necesario por parte del Titular.

c) De lo no previsto

Todo lo que no esté previsto por los presentes Lineamientos técnicos, se resolverá a petición de parte, por medio de escrito dirigido al Titular de esta Cartera de Estado, fundamentando la razón de lo no previsto, técnica y jurídicamente

VI. Vigencia

Los presentes lineamientos técnicos entrarán en vigencia a partir de la fecha de la firma de los mismos, por parte del Titular de esta Cartera de Estado.

San Salvador a los ocho días del mes de junio del año dos mil veinte.



Dr. Francisco José Alabí Montoya
Ministro de Salud *ad honorem*

VII. Glosario

- **Agente infeccioso del paludismo:** parásito del género *plasmodium* de las especies *vivax*, *falciparum*, *malariae* y *ovale*
- **Anillo:** trofozoíto joven del género *Plasmodium* spp 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).
- **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.
- **Esquizonte maduro:** en este estadio del *plasmodium* sp., la división del núcleo y citoplasma es completa. Se observan grupos de parásitos individuales llamados 'merozoitos'. Los gránulos de pigmento están más agrupados.
- **Gametocito:** célula sexual del *plasmodium* que se desarrolla dentro del eritrocito y permanece allí ahí hasta que muere. Es el estado infeccioso para el mosquito; cuando se encuentra dentro de este se convierte en gameto.
- **Granulación:** granulaciones presentes en el citoplasma de los eritrocitos infectados; la granulación de shuffner es característica de infecciones con *p. Vivax* y *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.
- **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.
- **Plasmodium:** protozooario parásito que produce la enfermedad del paludismo.
- **Profesionales de laboratorio:** profesionales en laboratorio clínico, laboratoristas y técnicos capacitados en el diagnóstico microscópico de la malaria del minal.
- **Receptibilidad:** presencia del mosquito transmisor de la enfermedad.
- **Trofozoíto maduro:** trofozoíto más grande y avanzado, generalmente ocupando todo el interior del eritrocito. Presenta una (mica masa de cromatina y granules de pigmento).
- **Trofozoíto:** es el estadio más joven del *plasmodium* (anillo) antes de que ocurra la división celular. Presenta cromatina y citoplasma.
- **Vulnerabilidad:** presencia de tránsito de personas de un área geográfica de influencia a otra.

VIII. Siglas y abreviaturas

BA	Búsqueda activa
CV	Colaborador voluntario
EPP	Equipo de Protección Personal
F	Estadíos asexuales de <i>Plasmodium falciparum</i>
Fg	Gametocitos de <i>Plasmodium falciparum</i>
Hd	Hipoclorito disponible
DLNSP	Departamento de Laboratorio Nacional de Salud Pública
ml	Mililitro
MINSAL	Ministerio de Salud
°C	Grados centígrados
p/p	Peso sobre peso
SMO	Servicio médico oficial
Spp	Especie
V	Estadíos de <i>Plasmodium vivax</i>

IX. Bibliografía

- División de Enfermedades Parasitarias CDC Atlanta. (s.f.). Comparación de las especies de *Plasmodium* spp. que parasitan a los seres humanos. Obtenido de www.cdc.gov
- División de Enfermedades Parasitarias, CDC, Atlanta. (s.f.). Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Image Library. Malaria. www.dpd.cdc.gov/dpdx.
- División de Enfermedades Parasitarias, CDC, Atlanta, GA, Estados Unidos. (s.f.). *Plasmodium* spp. Estadíos sanguíneos, extendido fino. Obtenido de www.cdc.gov
- Fox E and GT Strickland. The interrelationship of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in the Punjab. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. (1989).
- Organización Panamericana de Salud, Fundamentos del diagnóstico microscópico de la malaria. (2014).
- Ministerio de Salud El Salvador, Guía clínica de la profilaxis post exposición. (2012).
- Ministerio de Salud El Salvador. Manual de Procedimientos de Bioseguridad para los Laboratorios clínicos. San Salvador (2008).

- Ministerio de Salud El Salvador. Manual de Procedimientos y Distribución de Reactivos. San Salvador. (2012).
- Ministerio de Salud El Salvador. Memoria de labores. San Salvador. (2013-2018)
- Ministerio de Salud de Costa Rica. Normas técnicas para el control de la Malaria. Costa Rica. (1997).
- Ministerio de Salud El Salvador. Plan Nacional Malaria 2011-2015. San Salvador.
- Organización Mundial de Salud. Bases del Diagnóstico Microscópico del Paludismo. 2a edición. Ginebra: OMS. (2014).
- Organización Panamericana de Salud - Organización Mundial de Salud. (2017). Marco para la Eliminación de la Malaria.
- Secretaría de Salud de Honduras. Manual de Procedimientos Operativos Estándar para el Diagnóstico de Malaria. (2017).
- World Health Organization. (2010). Basic Malaria Microscopy. Part I. Learner's Guide. Geneva: <http://www.who.int>.

X. Anexos

Anexo 1:



Procedimientos de la profilaxis post exposición ocupacional (Guía clínica de la profilaxis post exposición, 2012)

En caso de probable exposición al VIH del personal de salud o de quienes cuidan a persona con VIH al tener contacto con sangre de un paciente mediante punción (pinchazo o pinchadura), cortadura o salpicadura en mucosas o piel con heridas, se deben de realizar en forma inmediata las siguientes acciones:

- Permitir sangrado libremente, no succionar.
- Lavar con abundante agua y jabón las mucosas (boca y nariz). En ojos se debe lavar con suero fisiológico.
- Desinfectar con alcohol etílico al 70%.
- Reportar el accidente al jefe inmediato superior.
- Referir por exposición ocupacional al hospital nacional más cercano o establecimiento autorizado. Usar el formato de referencia a establecimiento de salud. El personal de salud debe hacerse acompañar de la persona fuente o muestra de sangre completa de la fuente al lugar de referencia.
- Evaluar el riesgo de exposición, definiendo el riesgo relativo de la exposición.
- Dependiendo del tipo de material biológico involucrado, la vía de la exposición y la exposición misma.
- Dependiendo del estado de la fuente de exposición: condición VIH, carga viral. Si se desconoce la condición frente al VIH, se debe solicitar la realización de la prueba VIH, idealmente con prueba rápida.
- Iniciar la Consejería describiendo los servicios que pueden administrarse:
- Consejería pre prueba VIH.
- Beneficios de la PPE para prevenir el VIH.
- Importancia y compromiso a la adherencia de la PPE para reducir el riesgo de transmisión al VIH.
- Posibles efectos secundarios del régimen de PPE.
- Llenar íntegramente el formato para Registro de casos post exposición, indicando si es ocupacional o por violencia sexual. Esto con el fin de informar inmediatamente por escrito el incidente a las instancias correspondientes y para la adecuada vigilancia epidemiológica.
- Tomar inmediatamente una muestra sanguínea basal para la detección de anticuerpos contra el VIH, hepatitis B y hepatitis C, serología de sífilis.
- Si se indica e inicia la PPE también se toma creatinina sérica, pruebas de función hepática y hemograma completo. La respuesta de estos exámenes no es razón para retrasar el inicio la PPE.
- Administrar la PPE es una urgencia médica y debe iniciarse en las primeras dos a cuatro horas, idealmente, la primera hora después del accidente ocupacional que produce la exposición al VIH y no después de las setenta y dos horas. El tratamiento es por veintiocho días continuos.
- Brindar apoyo psicológico o psiquiátrico por la ansiedad y estrés resultante del accidente laboral, especialmente cuando la paciente fuente es conocido VIH. Brindar intervención en crisis si es necesaria.
- Hacer prevención contra hepatitis B, hepatitis C y sífilis. Debe cumplir esquema de vacunación contra hepatitis B. Primera dosis ya, luego refuerzo a la semana, al mes y a los seis meses.

Anexo 2



Preparación para una solución porcentual de hipoclorito

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:

Para calcular hipoclorito disponible (Hd)

$$V = \frac{cd \times VD}{cc} = \frac{0.5\% \times 500ml}{5\%} =$$

Para preparar 2000ml de Hipoclorito al 0.5% a partir de lejía con el 6% de cloro activo:

$$V = \frac{0.5 \times 2000 \text{ ml}}{6\%} = 167 \text{ ml de lejía}$$

Volumen de agua adicionado = 2000 ml - 166 ml = 1834 ml.

1834 ml de agua + 166 ml de hipoclorito al 6% = 2000 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).

Anexo 3



Preparación de colorante y soluciones

Colorante de Giemsa

Principio: Esta coloración deshemoglobina los glóbulos rojos, tiñe los leucocitos, parásitos de Plasmodium spp el cual tiñe de rojo su cromatina y azul el resto del parásito; los neutrófilos se tiñen de azul y violeta, los eosinófilos de rojo cobrizo, el citoplasma de los linfocitos de azul pálido y el citoplasma de los monocitos de azul intenso. En cuanto a las plaquetas el color puede variar de rosa a violeta y también varía en forma y tamaño.

Identificación, conservación y almacenamiento del colorante

Envasar el colorante en garrafa de color ámbar para protegerlo de la luz, identificarlo con nombre del reactivo, fecha de preparación, fecha de caducidad, número de lote y las iniciales del profesional dejarlo madurar por dos semanas, agitando diariamente de 1-2 veces al día. Registro en libros de control de calidad

Reactivos y materiales

- Colorante de Giemsa puro N.º CAS 51811-82-6
- Alcohol Metílico N.º CAS 67-56-1
- Glicerina N.º CAS 56-81-5
- Giemsa en polvo
- Metanol (alcohol metílico) absoluto
- Glicerol o Glicerina
- Perlas de vidrio previamente desinfectadas.
- Espátula o una cuchara dosificadora
- Papel de pesada
- Probeta graduada
- Embudo de vidrio o de plástico;
- Frasco limpio y seco de vidrio oscuro o ámbar, con tapón de rosca
- Equipo de protección personal

Equipo

- Balanza granataria de un plato

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- El metanol y el colorante de Giemsa son inflamables y muy tóxicos si se inhalan o se ingieren. Evite entrar en contacto con ellos o inhalarlos. Cuando no se estén utilizando, deberán guardarse en un armario cerrado con llave.
- Es indispensable observar las precauciones universales, que comprenden el uso del equipo de protección individual pertinente, como guantes, gafas protectoras y bata de laboratorio.

Procedimiento para 500 ml de Giemsa.

1. Introduzca unas 50 perlas de vidrio limpiadas con metanol en un frasco de vidrio oscuro o ámbar.
2. Pese 3,8 g de colorante de Giemsa en polvo en una balanza analítica y mediante un embudo viértalos en el frasco que contiene las perlas.

3. Vierta lentamente unos 100 ml de metanol y al hacerlo asegúrese de arrastrar al interior del frasco todos los restos de colorante seco.
4. Cierre a fondo el tapón de rosca del frasco y agite este con un movimiento circular durante 2 o 3 minutos para empezar a disolver los cristales de colorante.
5. Utilice el embudo para añadir 250 ml de glicerol a la mezcla y agite de nuevo el frasco durante 3 a 5 minutos.
6. Vuelva a utilizar el embudo para añadir a la mezcla los 150 ml restantes de metanol, asegurándose de arrastrar al interior del frasco los restos de glicerol.
7. Cierre a fondo el tapón de rosca del frasco.
8. El primer día, agite la mezcla unas seis veces, durante 2 o 3 minutos cada vez.
9. Durante al menos siete días, agite la mezcla unas seis veces al día, durante 2 o 3 minutos cada vez. Puede utilizar un agitador si dispone de él.
10. Rotule claramente el frasco con el número de lote, el nombre de la persona que ha preparado la solución madre, la fecha de preparación y la fecha de caducidad, y documente el proceso en el libro de registro del control de la calidad.
11. Cierre a fondo el tapón de rosca del frasco para impedir la absorción de vapor de agua del aire, y guarde el frasco en un lugar fresco y resguardado de la luz solar directa.

Notas sobre el procedimiento

- El frasco debe estar siempre muy bien cerrado para evitar la absorción de vapor de agua y la evaporación y la oxidación del colorante por el alto grado de humedad. Si el frasco se mantiene cerrado a fondo y sin humedad, el colorante de Giemsa se conservará estable a temperatura ambiente durante más tiempo.
- Guarde el colorante en un frasco de vidrio oscuro y en un lugar fresco, seco y sombreado, resguardado de la luz solar directa.
- Desde al menos 24 horas antes de utilizar la solución madre de colorante de Giemsa, **NO AGITE** el frasco que la contiene, porque así evitará resuspender el precipitado, que se depositaría sobre las extensiones de sangre durante la tinción y ocultaría detalles importantes para el diagnóstico microscópico.
- No contamine la solución madre de colorante de Giemsa con agua; la más mínima cantidad de agua la deterioraría, y la tinción sería cada vez más ineficaz.
- Para cubrir las necesidades diarias, mida y filtre pequeñas cantidades de colorante al interior de un frasco (unos 25-50 ml) y cierre este a fondo; así será menos probable que la solución madre se contamine.
- No introduzca ni utilice una pipeta húmeda o sucia dentro de la solución madre de colorante de Giemsa.
- No vuelva a verter el colorante sobrante o sin usar en el frasco de la solución madre ni en el frasco de la solución de trabajo; el colorante que se ha extraído del frasco debe utilizarse rápidamente o desecharse.

Solución amortiguadora

El pH expresa la acidez o alcalinidad de un líquido en una escala de 0 (muy ácido) a 14 (muy alcalino). Los líquidos que no son ácidos ni alcalinos se llaman neutros y tienen un pH de 7,0. El pH de un líquido puede medirse con un medidor de pH o un indicador de color, como el comparador de Lovibond. También se pueden utilizar tiras de papel indicador, pero se alteran rápidamente y dejan de ser fiables cuando la humedad es elevada.

Materiales para la preparación de la solución amortiguadora

- Una balanza analítica con una precisión de 0,01 g (lo ideal es una balanza de brazos con dos platos); también sirven varios tipos de balanzas eléctricas de un plato, que son fáciles de utilizar;
- Papel de filtro de 11 cm de diámetro;
- Un frasco de vidrio cónico de 1 litro;
- Un vaso de precipitado de vidrio de 250 ml;
- Espátulas de madera (sirven los depresores linguales, fáciles de conseguir);
- Un litro de agua destilada o desionizada;
- Fosfato de potasio dihidrogenado (anhidro) (KH_2PO_4), y
- Fosfato disódico hidrogenado (anhidro) (Na_2HPO_4).

Procedimiento:

Si va a utilizar una balanza analítica tradicional de dos platos, siga todos los pasos del 1 al 10. Si va a utilizar una balanza eléctrica, siga las instrucciones del facilitador, que probablemente empiecen en el paso 5.

1. Asegúrese de que el fiel de la balanza está en el cero, ajustando el tornillo correspondiente del brazo derecho.
2. Ponga un papel de filtro en cada plato; coloque el fiel en el cero, esta vez moviendo la pesa de gramos a lo largo del brazo con la escala de gramos.
3. Mueva la pesa de gramos otros 0,7 g, dejando la balanza lista para pesar el fosfato de potasio dihidrogenado.
4. Con una espátula de madera, coloque una pequeña cantidad de KH_2PO_4 en el papel de filtro del plato de la izquierda.
5. Eche el KH_2PO_4 pesado en el vaso de precipitado de vidrio, añada unos 150 ml de agua y remueva con una espátula limpia hasta que la sal se disuelva.
6. Coloque un nuevo papel de filtro en el plato de la izquierda.
7. Reajuste la balanza como antes, pero esta vez ponga la pesa de gramos en 1 g para pesar el Na_2HPO_4 .
8. Con una espátula limpia y seca, eche el Na_2HPO_4 en el plato de la derecha, equilibrando el peso tal como se ha descrito en el paso 3.
9. Añada el Na_2HPO_4 a la solución que hay en el vaso de precipitado y remueva como en el paso 5.
10. Cuando las sales se hayan disuelto, eche la solución en el frasco cónico y rellene con agua hasta llegar a la marca de 1 litro.

La solución amortiguadora está lista para ajustar el pH a 7,2 después de que se haya preparado el líquido corrector.

Materiales para preparar los líquidos correctores al 2%:

- Una balanza analítica con una precisión de 0,01 g (lo ideal es una balanza de brazos con dos platos, pero también se puede utilizar una balanza eléctrica de un plato);
- Papel de filtro de 11 cm de diámetro;
- Dos frascos con tapón de vidrio, de 100 a 150 ml cada uno;
- Fosfato de potasio dihidrogenado (anhidro) (KH_2PO_4), y
- Fosfato disódico hidrogenado (anhidro) (Na_2HPO_4);
- Unos 200 ml de agua destilada o desionizada;
- Espátulas de madera;
- Dos vasos de precipitado de vidrio de 250 ml;
- Una probeta graduada de 100 ml, y
- Etiquetas.

Método:

1. Siga los pasos 1 y 2 del método de preparación de la solución amortiguadora, y después desplace la pesa de gramos hasta la marca de 2 g de la escala del brazo de la balanza.
2. Pese 2 g de Na_2HPO_4 y añádalos a 100 ml de agua en el vaso de precipitado; remueva con la espátula hasta que la sal se haya disuelto.
3. Introduzca la solución en uno de los frascos de vidrio y etiquételo como « Na_2HPO_4 al 2%».
4. Repita los pasos 1 a 3, sólo que esta vez use 2 g de KH_2PO_4 ; etiquete el frasco como tal.
5. Guárdese en lugar frío, protegido de la luz solar.

Para comprobar y ajustar el pH de la solución amortiguadora

Compruebe sistemáticamente el pH de la solución amortiguadora antes de utilizarla. Para ajustar el pH añádale pequeñas cantidades de los líquidos correctores: Na_2HPO_4 al 2% si el pH es inferior a 7,2 (demasiado ácido) o KH_2PO_4 al 2% si el pH es superior a 7,2 (demasiado alcalino).

Anexo 4



Cuidados y mantenimiento del microscopio

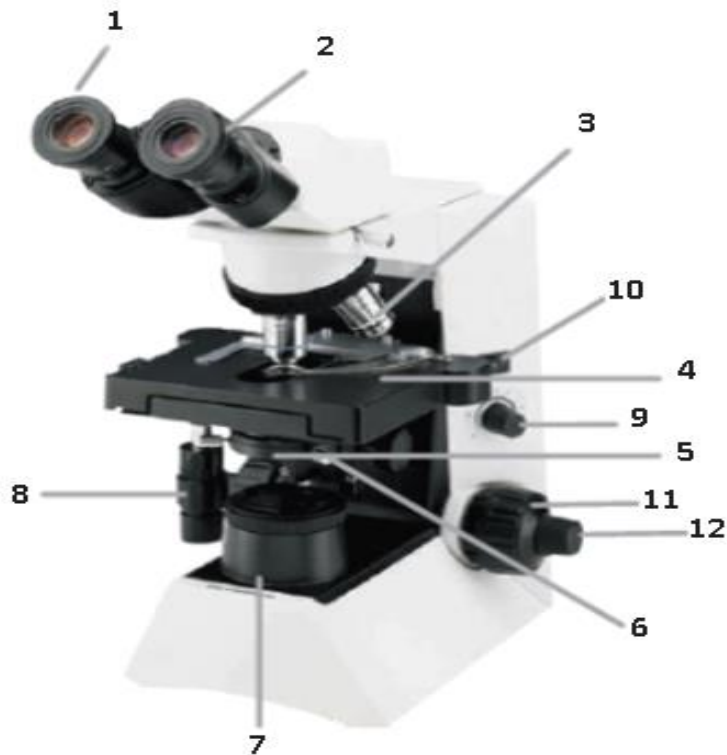
Partes de un microscopio

El microscopio es un instrumento esencial para el diagnóstico de la malaria. Es un instrumento de precisión y requiere mantenimiento adecuado para prevenir daños en sus diferentes sistemas y para evitar el crecimiento de hongos que pueden dañar sus lentes.

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

- 1) Sistema de soporte: (pie, brazo, portaobjetivo giratorio, platina mecánica), 2) Sistema de magnificación (objetivo, ocular), 3) Sistema de iluminación (condensador con diafragma, fuente de luz, filtros y 4) Sistema de ajuste (tornillo macrométrico, tornillo micrométrico, tornillos de ajuste del condensador). Las partes de un microscopio compuesto se ilustran en la figura debajo.

El microscopio óptico compuesto y sus partes: ocular (1), tubo principal (2), objetivo (3), platina (4 platina), condensador (5), diafragma de campo (6), lámpara (7), mecanismos de movimiento coordenadas x-y (8), regulador de la intensidad de la luz (9), interruptor de encendido (10), tornillo macrométrico (11), tornillo micrométrico (12).



Uso del microscopio

Es importante aprender cómo 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 consistentes 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. Cuando se enciende el microscopio se hace subir al máximo el condensador y se regula el diafragma en dos tercios de su apertura máxima. Luego se quita un ocular y se mira por el tubo. De ser necesario se alinea el condensador para que la luz brillante llegue al centro del condensador. Se vuelve a poner el ocular en su sitio. Se aleja el objetivo de la platina. Se aplica una gota de aceite de inmersión en el extremo de la gota gruesa y se coloca la lámina portaobjetos en la platina. Con el tornillo macrométrico se hace descender el objetivo hasta que toque el aceite. La muestra está lista entonces para ser examinada. Accionando el tornillo micrométrico se enfoca el campo y se regula la luz para tener una intensidad adecuada. Se seguirá el mismo procedimiento para observar el extendido fino. Al final de cada sesión se debe limpiar adecuadamente el objetivo de inmersión.

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 confortable. 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.

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 la rosca macrométrica o micrométrica. 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.

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 confortable 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.

Cuidados del microscopio

Se deben cumplir las siguientes recomendaciones para un cuidado óptimo del microscopio:

- Se debe dejar el microscopio en un mismo lugar evitando su transporte constante o frecuente de un sitio a otro.

- Mientras no se utiliza, el microscopio se debe mantener cubierto con una funda de plástico o de tela para protegerlo del polvo, especialmente en zonas de clima cálido seco.
- 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.
- Límpiase el aceite del objetivo de inmersión todos los días.
- Indíquese el número de modelo y de ser posible el número de instrumento y de pieza cuando se pidan piezas de repuesto.
- No se debe desmontar el microscopio para limpiar partes de difícil acceso.
- No se debe utilizar alcohol para limpiar el microscopio.
- No se deben limpiar los oculares con otra cosa que no sea papel seco especial para lentes.
- No se deben dejar abiertos los portales. Si es necesario retirar los objetivos se debe utilizar la tapa provista o una cinta selladora para cerrar la abertura.
- 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.
- No se debe guardar el microscopio en su caja durante largos períodos ni transportarlo sin ajustar el tornillo que lo sujeta.

Anexo 5



Formulario de reporte epidemiológico de malaria LAB-2

<input type="checkbox"/> C.V		Fecha de Examen:				Semana N°:	
<input type="checkbox"/> S.M.O.		Departamento:				Láminas examinadas:	
<input type="checkbox"/> B.A.		Municipio:				Casos:	
Año:		Cantón:				<i>P. Vivax:</i>	
Mes:		Caserío:				<i>P. Falciparum:</i>	
Clave	Lámina N°	Fecha toma de muestra	Fecha de lectura	Edad	Sexo	Código	Resultado

Nombre y firma de responsable: _____

Sello del establecimiento

Instructivo de llenado de formulario LAB-2.

Nombre del formato: Reporte Epidemiológico LAB-2.

Propósito: Que los microscopistas y profesionales de laboratorio clínico del Diagnóstico laboratorial de la Malaria y los profesionales de Laboratorio del MINSAL, 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 MINSAL.

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 este, de igual forma si proviene de

Cantón o caserío.

N° semana: Anotar el N° 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 (USCF u Hospital).

Lámina n°: Se anotará el número correlativo de la muestra del lugar de procedencia.

Fecha toma de muestra: 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.

Nombre y firma del 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 6



Laboratorio Nacional de Salud Pública
Sección Malaria
Reporte Mensual de control de calidad indirecto

Establecimiento: _____

Mes y Año: _____

Muestras recibidas: _____

Muestras analizadas: _____

Observaciones: _____

Recomendaciones: _____

Concordancia o discordancia microscópica por parásitos

Concordancia o discordancia en los procedimientos

Responsable de embalaje: _____

Responsable de microscopia: _____

Anexo 7



Evaluación Directa Externa
Prueba. Evaluación del desempeño Malaria

NOMBRE DEL ESTABLECIMIENTO: _____

Fecha de recepción de panel	_____
Fecha de Realización	_____

Resultados

Código de lámina	Resultados

Comentarios: _____

Firma y sello de J.V.P.L.C. de quien realizó la prueba: _____

Firma y sello de J.V.P.L.C. del jefe de laboratorio: _____

Fecha de envío resultados: _____

Sello del establecimiento

Anexo 8



Registro de respuestas del Control de Calidad Indirecto

Nombre establecimiento de salud:

Total láminas enviadas

Nombre del responsable del diagnóstico de malaria:

Total láminas positivas:

Región:

Departamento:

Municipio:

Fecha de envío:

# correlativo	Datos básicos muestra			Resultados microscopista					Observaciones
	Fecha de muestra (dd/mm/aaaa)	Semana epidemiológica	Código o identificación de muestra	Resultado P: positivo, N: negativo	Especie V: <i>P. vivax</i> , F: <i>P. falciparum</i> , VF: infección mixta por VF	Recuento o - <i>P. vivax</i>	Recuento - <i>P. falciparum</i>	Presencia Fg – Microscopista Marque con equis (X)	

Firma del responsable del diagnóstico

Sello del establecimiento