

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
DE LABORATORIO PARA EL
DIAGNÓSTICO DE MALARIA**

**Serie de Normas
Técnicas N° 39**

Lima - 2003



**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
DE LABORATORIO PARA EL
DIAGNÓSTICO DE MALARIA**

**Serie de Normas
Técnicas N° 39**

Lima - 2003

MINISTERIO DE SALUD

Ministro

Dr. Álvaro Vidal Rivadeneyra

Viceministro

Econ. Carlos Rodríguez Cervantes

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Jefe

Dr. Luis Fernando Llanos Zavalaga

Subjefe

Dra. Aída Cecilia Palacios Ramírez

Centro Nacional de Salud Pública

Dra. Susana Zurita Macalupú
Directora General

Centro Nacional de Alimentación y Nutrición

Dr. Napoleón Chávez Villanueva
Director General

Centro Nacional de Control de Calidad

Dra. Rosa Guevara Ormeño
Directora General

Centro Nacional de Productos Biológicos

Q.F. Ricardo Valera Sánchez
Director General

Centro Nacional de Salud Intercultural

Dr. Carlos del Águila Campos
Director General

**Centro Nacional de Salud Ocupacional y
Protección del Ambiente Para la Salud**

Dr. Enrique P. Swayne Díaz
Director General

Subcomité Editor

Presidente

Dra. Aída Palacios Ramírez

Secretario técnico

Dr. César Cabezas Sánchez

Miembros

Q.F. Zulema Arévalo Chong
Dr. Jorge Barnaby Rodríguez
Dr. Zuño Burstein Alva
Lic. Iván Gómez-Sánchez Prieto
Dr. Alfredo Guillén Oneoglio
Dr. César Náquira Velarde
Q.F. Rosa Mendoza Yanavilca
Dra. Frine Samalvides Cuba
Dr. Víctor Suárez Moreno

Editor

Dr. Leonid Lecca García

Asistente Editorial

Lic. Daniel Cárdenas Rojas

Secretaria

Srta. Rocío Solís Agurto

Carátula: Frontis del local central
del Instituto Nacional de Salud

ARTES & DISEÑOS LASER S.R.LTDA.
Calle Las Turquesas 263-265-269 - Balconcillo - Lima 13
Teléfono: 265-8320 Telefax: 266-0075
e-mail: artesydisenoslaser@hotmail.com

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA

ELABORACIÓN:

Blga. Sonia C. Gutierrez Gonzáles
Blga. Nancy Arróspide Velasco

Laboratorio de Malaria
División de Parasitología
Centro Nacional de Salud Pública
Instituto Nacional de Salud
Lima - Perú

CONSULTORES:

Dr. Wilmer Marquiño Quesada
Laboratorio de Malaria
Instituto Nacional de Salud

Dr. Trenton K. Ruebush II
Centro de Control de Enfermedades
Infecciosas: CDC - Atlanta-USA

AGRADECIMIENTO:

Lic. T.M. Maritza N. Puray Chávez
Téc. Lab. Luz Mendizábal Alvarez
Laboratorio de Malaria
Instituto Nacional de Salud

DEDICATORIA:

A la memoria de nuestra compañera de trabajo
T.M. Blanca Pardavé Lugo.

Catalogación hecha por el Centro de Documentación del INS

Gutierrez Gonzáles, Sonia C. y Arróspide Velasco, Nancy
Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria /
Elaborado por Sonia C. Gutierrez Gonzáles y Nancy Arróspide Velasco. — Lima : Ministerio de
Salud, Instituto Nacional de Salud, 2003.
100 p. : 30 cm. — (Serie de Normas Técnicas; 39)

1. MALARIA /diagnóstico
 2. MALARIA /inmunología
 3. MALARIA /parasitología
 4. PLASMODIUM FALCIPARUM /aislamiento y purificación
 5. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO
- I. Gutierrez Gonzáles, Sonia C.
 - II. Arróspide Velasco, Nancy
 - III. Instituto Nacional de Salud (Perú)
 - IV. Perú. Ministerio de Salud

ISBN 9972 - 857 - 26 - 3 (O.C.)
ISBN 9972 - 857 - 37 - 9 (N°39)
ISSN 1607 - 4904
Hecho el Depósito Legal N° 1501152003-4204

©Ministerio de Salud, 2003
Av. Salaverry cuadra 8 s/n, Jesús María, Lima, Perú
Telf.: 431-0410

©Instituto Nacional de Salud, 2003
Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú
Telf.: 471-9920 Fax 471-0179
e-mail: postmaster@ins.gob.pe
Página Web: www.ins.gob.pe

Publicación aprobada con R.J. N° 461-2003-J-OPD/INS

Se autoriza su reproducción total o parcial siempre y cuando se cite la fuente.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	VII
Malaria	1
Ciclo biológico del <i>Plasmodium</i>	1
Síntomas de la enfermedad	1
Diagnóstico de la enfermedad	2
Diagnóstico clínico	2
Diagnóstico de laboratorio	3
SECCIÓN 1: GENERALIDADES	4
1.1 Objetivo	4
1.2 Campo de aplicación	4
1.3 Responsabilidades	4
1.4 Documentos de referencia	4
1.5 Definiciones y abreviaturas	4
1.6 Condiciones generales para la obtención y manejo de muestras	5
SECCIÓN 2: BIOSEGURIDAD	7
2.1 Medidas de bioseguridad	7
2.2 Medidas de protección	7
2.3 Descontaminación	8
2.4 Limpieza	8
2.5 Desinfección	8
2.6 Esterilización	8
SECCIÓN 3: OBTENCIÓN DE MUESTRA HEMÁTICA	9
3.1 Limpieza y almacenaje de láminas portaobjeto	9
3.2 Registro	9
3.3 Procedimiento para la obtención de la muestra	9
SECCIÓN 4: DESCRIPCIÓN DE GOTA GRUESA Y FROTIS	12
4.1 Gota gruesa	12
4.2 Frotis	12
4.3 Secado de las muestras hemáticas	13
4.4 Errores comunes en la preparación de muestras hemáticas	13
SECCIÓN 5: COLORACIÓN DE LA MUESTRA HEMÁTICA PARA EL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE MALARIA	15
5.1 Uso del colorante giemsa	15
5.2 Recomendaciones para una buena coloración	15
5.3 Coloración de las muestras	16

SECCIÓN 6:	OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE MALARIA	19
6.1	Recomendaciones	19
6.2	Reconocimiento de los plasmodia	19
6.3	Aspectos del parásito de malaria en sus diferentes estadios	19
6.4	Morfología de las especies de <i>Plasmodium</i> en el frotis de sangre	20
6.5	Apariencia de los parásitos en gota gruesa y frotis	21
6.6	Examen de rutina de la gota gruesa y frotis	21
SECCIÓN 7:	DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD PARASITARIA	30
7.1	Consideraciones generales	30
7.2	Métodos de determinación de la densidad parasitaria	30
7.3	Reporte de la densidad parasitaria en caso de malaria por <i>P. falciparum</i>	32
SECCIÓN 8:	RESISTENCIA FARMACOLÓGICA	33
8.1	Evaluación de la resistencia de <i>P. falciparum</i> a los medicamentos antimaláricos mediante el seguimiento <i>in vivo</i>	33
8.2	Evaluación de la resistencia de <i>P. falciparum</i> a los medicamentos antimaláricos en un sistema <i>in vitro</i> mediante la prueba de la microplaca	37
SECCIÓN 9:	CONTROL DE CALIDAD EN EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA	42
9.1	Actividades del laboratorio de referencia nacional	42
9.2	Actividades del laboratorio de referencia regional	42
9.3	Actividades del nivel local e intermedio	43
9.4	Recomendaciones generales para el envío de láminas e informe de resultados	44
9.5	Criterios de evaluación de la calidad técnica de la lámina de gota gruesa	44
9.6	Supervisión directa a los laboratorios	46
9.7	Tipos de supervisión	47
SECCIÓN 10:	CULTIVO <i>in vitro</i> DE <i>Plasmodium falciparum</i>	48
10.1	Equipos	48
10.2	Reactivos	48
10.3	Materiales	48
10.4	Preparación de medios y otros	49
10.5	Procedimiento para el aislamiento de parásitos en pacientes infectados por <i>Plasmodium falciparum</i>	50
10.6	Cambio del medio de cultivo	51
10.7	Criopreservación o congelamiento de los parásitos	51
10.8	Determinación del porcentaje de parasitemia en frotis sanguíneo	53
SECCIÓN 11:	DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO DE MALARIA	54
11.1	Generalidades	54
11.2	Técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI)	54
11.3	Pruebas rápidas para diagnóstico de malaria	59
11.4	Kits existentes en el mercado para su aplicabilidad	62

BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS	74
Anexo A Limpieza y almacenamiento de láminas portaobjeto	75
Anexo B Formato: Solicitud de gota gruesa	75
Anexo C Precoloración de la gota gruesa	76
Anexo D Preparación de colorantes y soluciones	78
Anexo E Evaluación de excreción urinaria de cloroquina y sulfamidas	81
Anexo F Formatos de control de calidad	83
Anexo G Preparación de antígenos	98
Anexo H Titulación de conjugado	100

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria y transmisible que por siglos ha representado una amenaza para la salud del hombre y la economía de los países endémicos.

La Organización Mundial de la Salud estima que anualmente ocurren más de 300 millones de infecciones de malaria y que, 1,5 a 2,5 millones de personas fallecen como consecuencia de esta enfermedad. Esto supone una amenaza para 200 millones de personas, dado que deteriora la salud y bienestar de la población económicamente activa, mermando los escasos recursos de muchos países en vías de desarrollo.

En nuestro país, la población residente en riesgo de enfermar es de aproximadamente 19 millones de habitantes, con un patrón de comportamiento temporal y estacional asociado geográficamente a zonas tropicales y desérticas irrigadas de la costa norte, selva montañosa, selva central y suroriental y la Cuenca Amazónica oriental del país. El comportamiento y tendencia de la enfermedad malárica tiene un patrón en las áreas fronterizas y en el nororiente del Perú, con diseminación a valles interandinos.

Esta población en riesgo ha sido clasificada en áreas definidas de alto, mediano y bajo riesgo de transmisión, presentando el mayor número de casos los departamentos de Loreto, Piura, Tumbes, San Martín, Junín y Madre de Dios.

El presente manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico y control de calidad de malaria tiene como propósito contribuir a que el personal profesional de los Laboratorios de la Red Nacional en Salud Pública, cuente con procedimientos estandarizados para el diagnóstico de malaria y su respectivo control de calidad. Incluye fundamentos, procedimientos y análisis de los resultados obtenidos, todos ellos factibles de realizar en los diferentes niveles intermedios de la red. En el futuro estos métodos pueden ser mejorados o reemplazados por otros de mayor sensibilidad y especificidad.

MALARIA

CICLO BIOLÓGICO DEL *Plasmodium*

El agente etiológico de la malaria es un protozooario del género *Plasmodium* y es transmitido por un vector (mosquito) del género *Anopheles*.

Existen cuatro especies de *Plasmodium* capaces de infectar al hombre: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*; en el Perú se han descrito las tres primeras.

El ciclo biológico del *Plasmodium* comprende tres fases (Figura N°1):

CICLO SEXUAL O ESPOROGÓNICO: la transmisión natural de la enfermedad se produce cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* pica a un huésped infectado de malaria (ser humano), adquiere los gametocitos del *Plasmodium* (macho y hembra), los que ingresan al tubo digestivo del mosquito y luego de la fecundación se reproducen en la pared de éste hasta adquirir la forma infectante denominada esporozoito, los cuales miden de 12 a 15 µm aproximadamente. Estos esporozoitos son fusiformes, poseen un núcleo alargado y están desprovistos de pigmento malárico. Los esporozoitos pasan por todas partes del mosquito y algunos llegan a las glándulas salivales, para ser transmitidos a otro huésped sano, en el momento de la picadura. La forma infectante del *Plasmodium* (esporozoito) ingresa a la vía sanguínea del huésped, en donde permanecen aproximadamente media hora antes de penetrar células hepáticas. Esta fase dura de 14 a 20 días, dependiendo de factores ambientales.

CICLO EXOERITROCÍTICO: Esta fase se inicia en los hepatocitos, donde los esporozoitos se reproducen en grandes cantidades hasta asumir la forma capaz de invadir los glóbulos rojos. En un segundo día de esta fase, en el interior de los hepatocitos se encuentran esquizontes tisulares que aumentan de volumen y se dividen para formar millares de minúsculos merozoitos. Esta fase tiene una duración promedio de 12 días.

CICLO ERITROCÍTICO: Ocurre cuando los merozoitos se liberan del hígado, pasan en grandes cantidades a la sangre e invaden los glóbulos rojos produciendo su destrucción. Ello ocurre en 48 horas en *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. ovale*, y 72 horas en *P. malariae*. Esto quiere decir que cada 48 ó 72 horas se reinicia un nuevo ciclo eritrocítico (trofozoito - esquizonte - trofozoito).

SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD

El período de incubación es el tiempo que transcurre desde la picadura del mosquito infectante hasta la aparición de los síntomas de la enfermedad. En el caso de la malaria dura de 10 a 28 días según la especie de *Plasmodium*.

Luego de este período, los síntomas se presentan bruscamente con escalofríos intensos, fiebre y sudoración profusa; estos se presentan como accesos intermitentes cada 48 ó 72 horas que corresponden a la ruptura de los esquizontes, aunque también se pueden presentar todos los días sin intermitencia. En el caso de *P. falciparum* los síntomas no son tan característicos durante los primeros días, pudiendo confundirse con una infección viral con febrícula, escalofríos, dolor de huesos y dolor de cabeza.

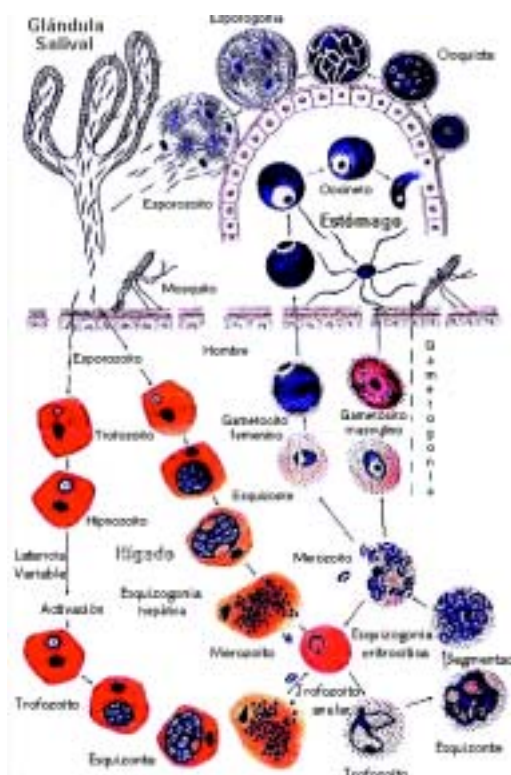


Figura Nº 1. Ciclo biológico del Plasmodium

DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

El diagnóstico de la malaria se realiza considerando las manifestaciones clínicas y la confirmación laboratorial de la gota gruesa u otra prueba de laboratorio que demuestre la presencia del parásito.

Diagnóstico clínico

Las formas clínicas de la malaria se pueden dividir en:

Leve:

Frecuente en individuos parcialmente inmunes, quienes ya han tenido ataques de malaria, o en personas con buena respuesta inmediata del sistema inmune. En estos pacientes la fiebre no es muy alta y los síntomas, si los hay, son discretos. La parasitemia es baja, generalmente por debajo de 0,1% de glóbulos rojos infectados.

Moderada:

Es típica en individuos no inmunes, quienes presentan el característico paroxismo febril con períodos de frío, calor y sudor, la temperatura es alta, con aumentos en la crisis. Los síntomas generales son más intensos, con fuerte cefalea; además, presentan anemia moderada y una parasitemia que varía de 0,1% a 0,5%.

Grave y de urgencia:

Casi siempre se observan en las infecciones producidas por *P. falciparum*. Este tipo de malaria se presenta en individuos no inmunes, mujeres embarazadas y niños. El paciente mantiene una fiebre persistente, la cefalea es fuerte, el vómito es frecuente y puede presentarse delirio. Además, la anemia es intensa y pueden estar parasitados 2% a más de los eritrocitos.

Diagnóstico de laboratorio

Diagnóstico parasitológico

Consiste en el examen microscópico de la muestra de sangre para demostrar la presencia del parásito para lo cual se usa la técnica de coloración de giemsa, con la cual podemos observar la gota gruesa y el frotis.

Gota gruesa:

Es una técnica de rutina y consiste en una muestra de una gota de sangre conformada por numerosas capas en su mayoría de glóbulos rojos, los que son deshemoglobinizados durante la coloración con giemsa. Esta concentración de glóbulos rojos facilita la detección de los parásitos que pudieran estar presentes en su interior en densidades bajas.

Frotis:

Es una capa delgada, única de células sanguíneas, fijadas con metanol y coloreadas con giemsa, que facilitan la observación de las características morfológicas de los parásitos presentes en los glóbulos rojos.

El examen en ambos casos (gota gruesa y frotis) se realiza con aumento de 1000x con aceite de inmersión.

Diagnóstico inmunológico

Abarca métodos inmunoserológicos que evalúan la inmunidad humoral y celular del huésped. La metodología es suficientemente sensible y específica para detectar las infecciones cuando la parasitemia es baja, además de ayudar a diferenciar infecciones pasadas de la actual.

Entre las técnicas que se encuentran para el inmunodiagnóstico de malaria tenemos: inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA, pruebas inmunocromatográficas (Dipstick), hemaglutinación, radioinmunoensayo, etc. La prueba de ELISA no es de mucha utilidad en el diagnóstico clínico de un paciente, su mayor aplicación es en estudios epidemiológicos.

El Instituto Nacional de Salud (Lima-Perú) tiene estandarizada la técnica IFI y técnicas inmunocromatográficas.

SECCIÓN I

GENERALIDADES

1.1 OBJETIVO

Establecer los procedimientos para realizar el diagnóstico de malaria.

1.2 CAMPO DE APLICACIÓN

Se aplica en los laboratorios regionales referenciales y de establecimientos de salud del Sistema de la Red Nacional de Laboratorios en Salud Pública.

1.3 RESPONSABILIDADES

1.3.1 El Centro Nacional de Salud Pública es responsable de autorizar la elaboración, revisión y actualización del presente manual, de acuerdo a los procedimientos aprobados por el Instituto Nacional de Salud.

1.3.2 Los directores de los establecimientos de salud son responsables de autorizar y proporcionar los recursos necesarios para designar al personal que aplicará las disposiciones contenidas en el presente manual.

1.3.3 Los jefes o responsable de los laboratorios, deben asegurar el control interno de la calidad, la idoneidad del personal, equipos, materiales, reactivos e instalaciones.

1.3.4 El personal médico, técnico y operativo, es responsable de seguir las especificaciones contenidas en el presente manual y aplicar los procedimientos específicos indicados.

1.4 DOCUMENTOS DE REFERENCIA

1.4.1 **Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras (I). 2ª ed. Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N° 15.

1.4.2 **Instituto Nacional de Salud.** Normas de bioseguridad. 2ª ed. Lima: INS; 2002. Serie de Normas Técnicas N° 18.

1.5 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

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

1.5.2 **anticuerpo:** proteínas pertenecientes al grupo de las gammaglobulinas o inmunoglobulinas, constituidas por la asociación de cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí mediante puentes disulfuro, dos cadenas se denominan pesadas y las otras dos ligeras. A su vez, cada una de las cadenas ligeras y pesadas, incluye una región variable (cuya secuencia de aminoácidos es peculiar de cada anticuerpo) y una región constante (con la misma secuencia en todos los anticuerpos).

1.5.3 **antígeno:** generador de lo contrario. Sustancia que da lugar a reacciones inmunitarias como los anticuerpos.

- 1.5.4 **bioseguridad:** conjunto de medidas preventivas para proteger la salud, seguridad humana y del medio ambiente frente a los diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos o mecánicos.
- 1.5.5 **desinfección:** proceso que busca eliminar la mayoría de microorganismos que causan enfermedades como hongos, virus, bacterias, etc.
- 1.5.6 **desinfectante:** agente químico utilizado para el proceso de desinfección.
- 1.5.7 **incubación:** mantenimiento de microorganismos en condiciones favorables para su crecimiento y reproducción.
- 1.5.8 **infección:** invasión y multiplicación de microorganismos en un huésped, pudiendo progresar hacia una enfermedad.
- 1.5.9 **limpieza:** remoción de toda materia extraña con la finalidad de disminuir el número de microorganismos, pero sin asegurar la eliminación de ellos.
- 1.5.10 **malaria:** paludismo.
- 1.5.11 **paludismo:** enfermedad infecciosa, febril, producida por protozoarios del género *Plasmodium*, que es transmitida por la picadura de mosquitos infectados del género *Anopheles*. La enfermedad se caracteriza por ataques de escalofríos, fiebre y sudoración.
- 1.5.12 **plasmodia:** plural de *Plasmodium*.
- 1.5.13 **plasmodium:** género de protozoarios plásmidos que comprende numerosas especies de parásitos de los glóbulos rojos del hombre y de diversos vertebrados. Tienen un alto grado de especialización parasitaria y su ciclo evolutivo es muy complejo. Son los agentes etiológicos del paludismo.
- 1.5.14 **parásito:** todo organismo que vive a expensas de otro, causándole daño.
- 1.5.15 **registro:** documento que provee evidencias objetivas de las actividades efectuadas o de los resultados obtenidos.
- 1.5.16 **sincronización:** procedimiento por el cual es posible obtener un solo estadio de *Plasmodium falciparum* luego de haberlo cultivado *in vitro*.

1.6 CONDICIONES GENERALES PARA LA OBTENCIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS

- 1.6.1 Elegir el lugar correcto a partir del cual se obtendrá la muestra empleando la técnica apropiada. Esta debe obtenerse del pulpejo del dedo de la mano, de preferencia los dedos medio o anular por ser los menos usados.
- 1.6.2 Obtener una muestra adecuada para asegurar la calidad técnica.
- 1.6.3 La muestra debe ser obtenida de preferencia antes de que el paciente haya recibido tratamiento antimalárico.

- 1.6.4 Enviar las muestras de gota gruesa al establecimiento de salud más cercano para obtener el diagnóstico.
- 1.6.5 Si fuera una muestra de suero mantenerla a 4°C si se procesará inmediatamente, o a -20°C si el proceso se va a ejecutar después de un tiempo.
- 16.6 En el caso de sangre para cultivo, éstas se enviarán inmediatamente dentro de las 24 horas y a temperatura de refrigeración (2°C - 8°C). En caso contrario, se debe criopreservar y guardar a -70°C o nitrógeno líquido.
- 1.6.7 Las muestras deben ser colocadas para su envío en un recipiente apropiado para su transporte al laboratorio con la finalidad de evitar cualquier derrame o rotura .

SECCIÓN II

BIOSEGURIDAD

2.1 MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

- 2.1.1 Trabajar en un laboratorio aumenta el riesgo de enfermar por la exposición a los agentes biológicos, sea a través de accidentes con agujas o materiales cortopunzantes contaminados, aerosoles, manejo de material contaminado o por falta de vacunación.
- 2.1.2 El personal involucrado en los diferentes procesos para el diagnóstico de malaria debe aplicar las medidas de bioseguridad establecidas en las Normas de Bioseguridad (Serie Normas Técnicas N° 18).
- 2.1.3 Se deben controlar las medidas necesarias aplicables a:
 - 2.1.3.1 El personal.
 - 2.1.3.2 La vestimenta.
 - 2.1.3.3 Los ambientes.
 - 2.1.3.4 La obtención de muestras.
 - 2.1.3.5 El envío de muestras al laboratorio.
 - 2.1.3.6 Los casos de accidentes.
 - 2.1.3.7 El laboratorio.

2.2 MEDIDAS DE PROTECCIÓN

- 2.2.1 Lavarse las manos cada vez que sea necesario.
- 2.2.2 Los objetos afilados y punzantes deben manejarse con sumo cuidado.
- 2.2.3 Desinfectar, esterilizar o descartar adecuadamente los instrumentos después de usarlos.
- 2.2.4 Usar guantes cada vez que maneje sangre o productos de sangre así como mascarilla, bata de protección, anteojos de protección, según los requerimientos de cada procedimiento.
- 2.2.5 Cubrir cualquier corte o abrasión de las manos con adhesivos.
- 2.2.6 Cuidar de punzarse con cualquier instrumento agudo que haya estado en contacto con sangre.
- 2.2.9 Nunca utilizar lancetas o agujas más de una vez.
- 2.2.10 Cualquier material contaminado con sangre, deberá ser colocado en un envase con cloro o hipoclorito de sodio al 1%, y luego para mayor seguridad disponer su entierro o incineración.

2.3 DESCONTAMINACIÓN

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

2.4 LIMPIEZA

Consiste en la eliminación física de sangre, fluidos corporales o cualquier material extraño visible, que pueda encontrarse en la piel o en los objetos inanimados.

2.5 DESINFECCIÓN

Desinfección de alto nivel. Significa eliminar la mayoría de microorganismos que causan enfermedades como hongos, virus, bacterias, etc. Esta puede obtenerse por ebullición y por agentes químicos.

2.6 ESTERILIZACIÓN

Permite eliminar completamente de los objetos todo microorganismo (bacterias, virus, hongos, parásitos, etc., incluido endosporas bacterianas). Es el método más seguro para procesar los instrumentos que entran en contacto con material contaminado. La esterilización puede lograrse por medios físicos o químicos (Tabla N° 1).

Tabla N° 1. Tipos de esterilización

MÉTODOS	MEDIO	TIPOS
FÍSICOS	CALOR HÚMEDO	AUTOCLAVE
	CALOR SECO	HORNO
QUÍMICOS	LÍQUIDO	GLUTARALDEHÍDO AL 2%
	GAS	ÁCIDO PARACÉTICO
		ÓXIDO DE ETILENO
		FORMALDEHIDO
		PEROXIDO DE HIDRÓGENO

SECCIÓN III

OBTENCIÓN DE MUESTRA HEMÁTICA

3.1 LIMPIEZA Y ALMACENAJE DE LÁMINAS PORTAOBJETO

3.1.1 Las láminas portaobjeto para uso de toma de muestra hemática en gota gruesa deberán ser procesadas antes de su uso, (lavadas, secadas y almacenadas correctamente). Las láminas nuevas son lavadas con detergente neutro y agua limpia. Después de estar remojadas en agua con detergente por 30 minutos a 1 hora, enjuagar con agua continua o cambiada varias veces. Cada lámina deberá ser pulida individualmente con esponja para luego secarlas con un trozo de tela de algodón. Las láminas más limpias deberán cogerse sólo por los bordes para evitar dejar grasa sobre su superficie.

3.1.2 Es preferible descartar láminas portaobjeto cuando:

- Tengan coloración iridiscente u opaca.
- Presenten rajaduras o superficies irregulares.
- No estén limpias.

3.1.3 Las láminas portaobjetos limpias podrán ser envueltas en papel delgado (papel copia) en grupos de 10. Los paquetes así seleccionados para uso de toma de muestra serán almacenados en cajas de cartón y en lugares secos (evitando polvo y humedad) para uso posterior, y separando simultáneamente las de uso diario.

Es necesario tomar medidas de protección cuando se manipula sangre para evitar la contaminación con agentes de transmisión sanguínea (hepatitis viral B, C, G, VIH, etc.) cuya manipulación representa un riesgo potencial. El riesgo es que la sangre de un paciente infectado con una de estas enfermedades, puede contaminar accidentalmente a otro paciente o trabajador. Sin embargo, el riesgo de infección de estas enfermedades se reduce tomando en cuenta las medidas de bioseguridad.

3.2 REGISTRO

3.2.1 Para asegurar la fácil localización de los pacientes es importante llenar la información requerida en una ficha de toma de muestra diseñadas por el Ministerio de Salud (MINSA) (Anexo B). *No olvidar que equivocarse en el llenado correcto de estos formatos de registro, puede ser lo mismo que equivocarse en la lectura de la gota gruesa.*

3.3 PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

3.3.1 En malaria, la muestra de sangre periférica se obtiene para preparar dos clases de películas, una gruesa y una delgada (gota gruesa y frotis, respectivamente), para su examen por microscopía directa.

3.3.2 La gota gruesa está conformada por numerosas capas de células sanguíneas, en su mayoría glóbulos rojos, los que son deshemoglobinizados durante la coloración con giemsa. Esta concentración de glóbulos rojos facilita la detección de los parásitos que pudieran estar presentes en el interior de alguno de ellos cuando la densidad es baja (Figura N° 2).

- 3.3.3 El frotis consiste en una capa delgada, única de células sanguíneas. Esto facilita la observación de las características morfológicas de los parásitos presentes en los glóbulos rojos, sobre todo para la identificación de la especie del parásito, cuando este no ha podido ser identificado por gota gruesa. Además, el frotis debe ser utilizado siempre para rotular e identificar al paciente.



Figura Nº 2. Materiales necesarios para diagnóstico de gota gruesa.

- 3.3.4 Después que los datos del paciente han sido registrados en forma apropiada, las muestras de sangre se procesan de la siguiente manera:
- 3.3.4.1 Sostener la mano izquierda del paciente, con la palma hacia abajo seleccionar el tercer dedo a partir del pulgar o el dedo índice (El dedo gordo del pie puede ser utilizado en niños).
- 3.3.4.2 Limpiar el dedo con una pieza o torunda de algodón ligeramente humedecido en alcohol, utilizando golpes firmes para retirar suciedad y grasa de la yema del dedo.
- 3.3.4.3 Secar el dedo con un algodón limpio y seco, utilizando golpes firmes para estimular la circulación de la sangre.
- 3.3.4.4 Sostener el dedo del paciente con la mano izquierda, tomándolo por sus lados y manteniendo una suave presión sobre ellos para favorecer la salida de sangre (Figura Nº 3).



Figura Nº 3. Presionar el dedo antes de la punción.

- 3.3.4.5 Punzar el borde de la yema del dedo con una lanceta estéril y un movimiento rápido, presionar suavemente el dedo para extraer la primera gota de sangre y limpiar con una torunda de algodón seco. Asegúrese que ninguna hilacha de algodón, que pueda mezclarse posteriormente con la sangre, permanezca en el dedo (Figuras N° 4 y N° 5).



Figura N°4. Punción digital.



Figura N° 5. Limpiar con algodón la primera gota de sangre.

- 3.3.4.6 Trabajando rápidamente y manipulando láminas completamente limpias, coleccionar la sangre de la siguiente forma:
- Aplique suave presión al dedo para extraer una gota de sangre y colocarla inmediatamente en contacto con el primer tercio externo de la superficie de la lámina. El tamaño de esta gota se aproxima al tamaño de una cabeza de fósforo.
 - Presionar nuevamente el dedo y coleccionar una segunda gota de sangre más pequeña que la primera, en el centro de la lámina, para realizar el frotis.
 - Limpiar la sangre restante del dedo con una torunda de algodón humedecido en alcohol e indicar al paciente que presione esta torunda contra el lugar de la punción por 5 minutos.

SECCIÓN IV

DESCRIPCIÓN DE GOTA GRUESA Y FROTIS

4.1 GOTA GRUESA

Una vez obtenida la muestra, realizar la gota gruesa de la siguiente manera: utilizando uno de los ángulos de una segunda lámina (lámina auxiliar) esparcir rápidamente la gota de sangre y extenderla uniformemente hasta formar una gota gruesa de 1 cm de lado o de diámetro. La sangre no debe ser excesivamente revuelta, es suficiente con 3 a 6 movimientos. De preferencia, realizar el homogeneizado de la muestra en una sola dirección, en forma concéntrica (de adentro hacia fuera o viceversa).

4.2 FROTIS

4.2.1 Utilizando la misma lámina auxiliar, ponerla en contacto con la superficie de la lámina que contiene la gota central y hacerla correr firmemente a lo largo de su borde en un ángulo de 45°. Asegúrese de que ocurra un contacto parejo con la superficie de la lámina todo el tiempo que la sangre esté siendo esparcida, de tal manera que el frotis sea homogéneo y fino. Siempre manipular las láminas por los bordes o por una esquina para realizar el frotis, como se muestra en la Figura N° 6:

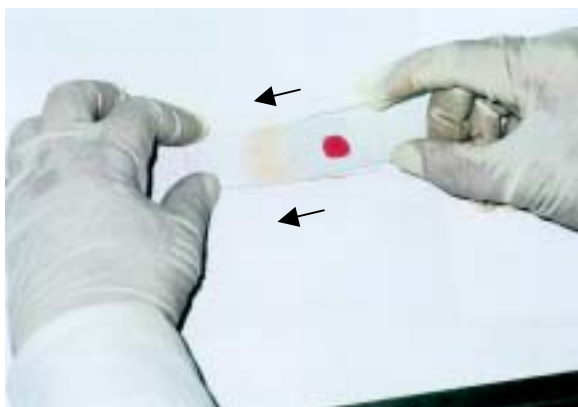


Figura N° 6. Ejecución del frotis en ángulo de 45°C.

4.2.2 Luego de haber secado el frotis, rotular con lápiz de carbón suave, escribiendo en la parte más gruesa el código, número y fecha de la muestra. No utilizar bolígrafo para etiquetar la lámina. Dejar secar la lámina con la gota gruesa en una superficie plana y protegida de polvo, calor e insectos.



Figura N° 7. Rotular las muestras con lápiz.

4.2.3 Si no existiera centro de diagnóstico, envuelva la lámina seca en el formato de registro del paciente y envíe al Laboratorio de Referencia tan pronto como sea posible.

4.2.4 La segunda lámina utilizada para esparcir la sangre puede ahora ser utilizada para el siguiente paciente y una segunda lámina limpia del paquete será usada como lámina extensora.

4.2.5 El frotis se usa como herramienta auxiliar para discriminar entre las diferentes especies.

4.3 SECADO DE LAS MUESTRAS HEMÁTICAS

4.3.1 Las láminas con las muestras de sangre deben permanecer horizontalmente, lo que va a permitir que la gota gruesa esté en un mismo nivel y seque uniformemente.

4.3.2 Proteger las muestras con la ayuda de pequeños mosquiteros para alejarlas de dípteros y otros insectos, así como del polvo.

4.3.3 En climas húmedos y cálidos, la autofijación de las muestras ocurre muy rápidamente, por lo tanto deben ser coloreadas cuanto antes, a más tardar en un plazo no mayor de tres días luego de su colección.

4.3.4 Cuando un largo almacenamiento es inevitable, deben ser precoloreadas dentro de las siguientes 24 horas por el **método de Walker** (Anexo C) para evitar la fijación y contaminación por hongos.

4.4 ERRORES COMUNES EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS HEMÁTICAS

La preparación incorrecta de la muestra hemática puede afectar el etiquetado, la coloración o el examen y, a veces, más de uno de estos. Las fallas más comunes que deben evitar cometerse son:

4.4.1 Mala posición de las muestras de sangre

Las películas de sangre deberán estar situadas correctamente en la lámina. Si no es así, puede dificultar el examen de gota gruesa; incluso porciones de la muestra pueden ser lavadas durante el proceso de coloración.

4.4.2 Mucha sangre

Si se obtiene demasiada sangre al coleccionar la gota gruesa, entonces la coloración puede quedar muy básica (azul), significando que se observarán muchas células blancas por campo pudiendo estas oscurecer o cubrir algunos parásitos de malaria que pueden estar presentes. Si el extendido es demasiado grueso, los glóbulos rojos pueden estar unos encima de otros imposibilitando el examen adecuado después de la fijación.

4.4.3 Poca sangre

Si se emplea poca sangre en la preparación de las muestras, no habrá suficientes células blancas por campo y no se examinará suficiente cantidad de sangre como lo establece la norma.

4.4.4 Lámina con grasa

En una lámina sin desengrasar, la sangre se esparcirá irregularmente, lo que hará difícil el examen; por otro lado, parte de la gota gruesa en algunos casos puede desprenderse durante el proceso de coloración.

4.4.5 Si el borde de la lámina extensora es irregular

Cuando el borde de la lámina empleada como extensora está astillada, el frotis es esparcido irregularmente, afectándose la calidad del frotis.

4.4.6 El frotis demasiado grande y la gota gruesa mal ubicada

Si el frotis es demasiado grande, la gota gruesa estará fuera de lugar, cerca al borde de la lámina, entonces no podrá ser visto fácilmente a través del microscopio. Durante el proceso de coloración o secado porciones de la gota gruesa probablemente pueden ser desprendidas.

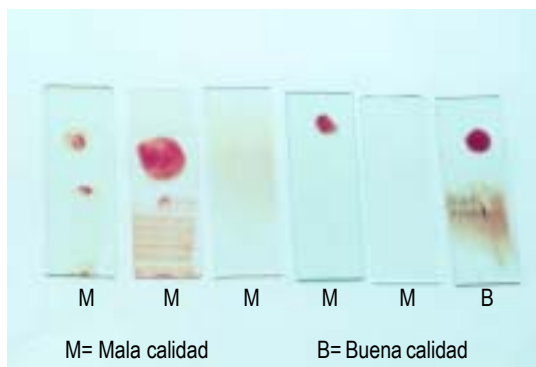


Figura N° 8. Muestras de diferente calidad de gota gruesa

4.4.7 Otros errores comunes

4.4.7.1 Dejar las láminas expuestas a moscas, cucarachas, hormigas y otros insectos que se alimentan de sangre seca y dañan las muestras de sangre.

4.4.7.2 Realizar gotas y frotices en muestras de sangre en láminas mal seleccionadas o rayadas.

4.4.7.3 Secado irregular de la gota gruesa.

4.4.7.4 Permitir la auto fijación de la gota gruesa que ocurre con el transcurrir del tiempo o a través de la exposición al calor, por lo que la coloración se hace difícil e insatisfactoria.

SECCIÓN V

COLORACIÓN DE LA MUESTRA HEMÁTICA PARA EL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE MALARIA

5.1 USO DEL COLORANTE GIEMSA

El constituyente básico del colorante giemsa consiste en cierto tipo de eosinato de azul de metileno, disuelto ya sea en alcohol metílico puro o glicerina pura. La solución alcohólica constituye una forma conveniente en la preparación de la solución acuosa que tiñe simultáneamente en rojo, azul y violeta. Los elementos disueltos permanecen en solución y al cabo de un tiempo todos los elementos activos de coloración se precipitan.

5.2 RECOMENDACIONES PARA UNA BUENA COLORACIÓN

- 5.2.1 Asegúrese que la gota gruesa y el frotis estén secos antes de iniciar el proceso de tinción.
- 5.2.2 Puede acelerarse el secado empleando calor suave, por ejemplo, exponiéndolos al calor generado por una lámpara. Evite utilizar demasiado calor ya que esto puede dificultar la deshemoglobinización.
- 5.2.3 Mantenga el envase (vidrio ámbar u oscuro) que contiene la solución madre giemsa, cerrado y en lugar seco, fresco y protegido de luz solar directa. Así evitará la volatilización del solvente y la oxidación del colorante prolongando la duración de la solución.
- 5.2.4 Nunca añada agua a la solución madre del colorante o deje entrar una pipeta mojada. Esto puede provocar deterioro de la solución de modo que esta no coloree adecuadamente.
- 5.2.5 No agite la botella de colorante antes de utilizarla. Se suspenderían pequeños cristales de colorante que no han sido disueltos, los cuales pueden visualizarse en las muestras de sangre durante el proceso de coloración y dificultarían el examen bajo microscopio.
- 5.2.6 Nunca regrese el colorante diluido no utilizado al envase que contiene la solución madre.
- 5.2.7 El material de vidrio usado para guardar colorante giemsa debe ser lavado en agua limpia inmediatamente después de ser utilizado para retirar los restos del colorante.
- 5.2.8 El material usado debe remojar por algún tiempo, preferiblemente toda la noche, en una solución de detergente y posteriormente, debe ser enjuagado totalmente en agua limpia. Los residuos de detergente en el material de vidrio pueden alterar el pH de su contenido y estropear el colorante.
- 5.2.9 La solución madre constituye el colorante stock (giemsa concentrado), el cual se diluye con buffer o agua destilada para obtener la solución de trabajo o de uso diario.

5.3 COLORACIÓN DE LAS MUESTRAS

- 5.3.1 Antes de proceder a la coloración de la gota gruesa, fije el frotis sumergiéndolo en metanol, por tres segundos y déjelo secar (Figura N° 9).

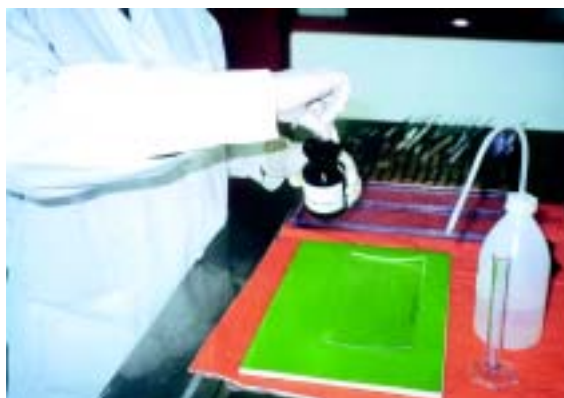


Figura N° 9. Fijar el frotis en metanol.

- 5.3.2 Asegúrese de preparar el volumen de colorante diluido en cantidad suficiente para las láminas que debe colorear (Anexo D).

5.3.3 Método rápido o coloración en varilla

- 5.3.3.1 Este método se usa generalmente para colorear entre 1 a 10 láminas. Debe tenerse en cuenta que la gota de sangre tiene que estar seca antes de ser coloreada, debiéndose evitar secar las muestras con demasiado calor.

5.3.3.2 Procedimiento

- a. Coloque las varillas de vidrio sobre un lavatorio o recipiente de tal forma que facilite la eliminación de los líquidos que se usarán en la coloración y coloque las láminas que debe colorear sobre las varillas, espaciándola de tal forma que pueda manipularlas con seguridad (Figura N° 10).

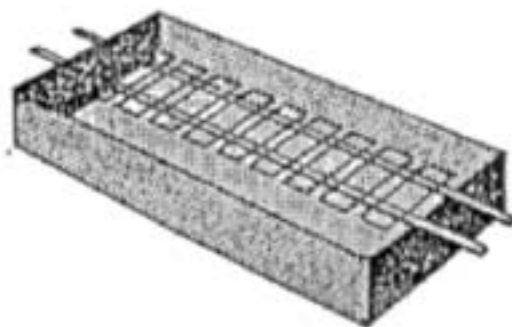


Figura N° 10. Láminas listas para colorear

- b. Vierta colorante diluido sobre la gota gruesa cubriéndola por completo. Haga esto suavemente, a una distancia corta de la lámina y deje actuar el colorante por 10 minutos. La experiencia le puede indicar la necesidad de modificar este tiempo de espera.

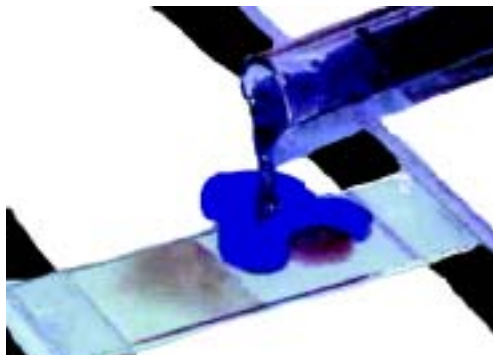


Figura N° 11. Coloración de lámina en varilla.

- c. Descarte el exceso de colorante diluido y lave la lámina con agua corriente, usando una pista, hasta que el agua no desprenda colorante (Figura N° 12).



Figura N° 12. Lavado de lámina de gota gruesa.

- d. Acomode las láminas en una gradilla de madera, de modo que queden inclinadas y con la gota gruesa hacia abajo. Deje secar las láminas en esta posición. En caso de no poder dilucidar las especies en la gota gruesa, colorear el frotis de la misma forma anterior (Figura N° 13).

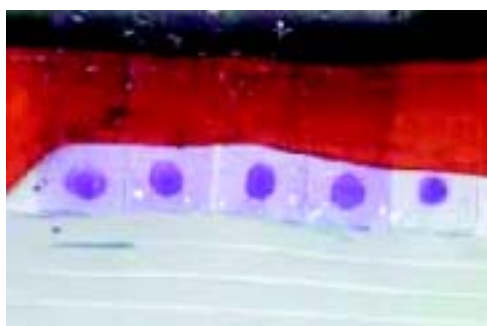


Figura N° 13. Secado de muestras hemáticas de gota gruesa.

5.3.4 Método de lámina invertida

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

5.3.4.2 *Procedimiento*

Coloque la bandeja de coloración sobre una superficie plana (mesa de trabajo) cerca del lavatorio o recipiente, de tal forma que facilite la eliminación de los líquidos que se usarán en la coloración. Acomode las láminas que desea colorear en forma invertida (con la muestra hacia abajo), espaciándolas entre ellas de tal manera que pueda agregarse el colorante lámina por lámina (dejar fluir el colorante por el borde de la lámina (Figura N°14).

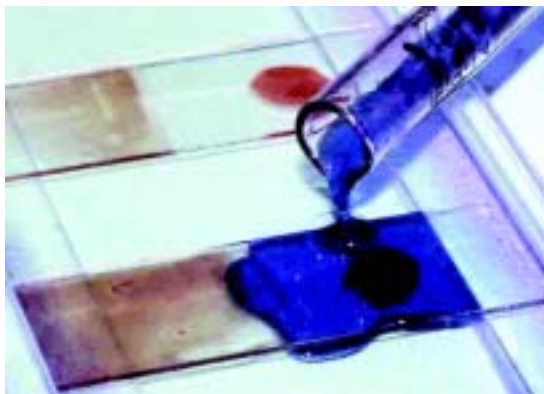


Figura N° 14. Coloración de lámina invertida.

SECCIÓN VI

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS PARÁSITOS DE MALARIA

6.1 RECOMENDACIONES

Se necesita un microscopio compuesto con fuente de luz propia o con sistema de espejos para recibir luz natural o artificial. Si se usa como fuente externa de luz una bombilla incandescente (foco de 100W y pavonado), la luz se debe hacer pasar por un filtro azul (que se puede preparar con la solución azul cielo) (pág. 76), esto facilita la visualización de los parásitos.

6.2 RECONOCIMIENTO DE LOS PLASMODIA

6.2.1 Los parásitos de malaria toman con la coloración de giemsa un aspecto determinado en la gota gruesa y el frotis que permite el reconocimiento del tamaño y la forma del parásito.

6.2.2 El núcleo del parásito (cromatina) es generalmente redondo y se colorea de un rojo intenso (rojo grosella), el citoplasma toma diferentes formas, desde una forma de anillo a una totalmente irregular y se colorea siempre de azul, aunque la tonalidad pueden variar ligeramente.

6.3 ASPECTOS DEL PARÁSITO DE MALARIA EN SUS DIFERENTES ESTADIOS

Las características en los diferentes estadios de los plasmodia que se observan en la gota gruesa y frotis se muestran en las Tablas N° 1, 2 y 3. Para el reconocimiento de la especie y del estadio de los plasmodios, el frotis permite observar mejor las características del parásito.

6.3.1 Etapa de trofozoito joven

6.3.1.1 Esta etapa es la que se observa con mayor frecuencia en las diferentes especies, a veces puede tomar la forma de coma o anillo como en el caso de *Plasmodium falciparum*, o formas ameboideas, como en el caso de *P. vivax*. (Figura N° 15)

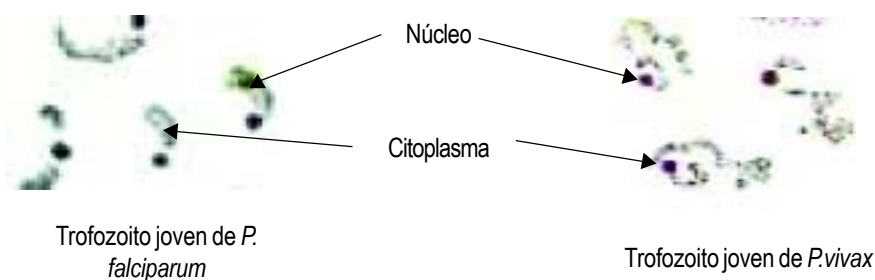


Figura N° 15. Trofozoito joven

6.3.2 Etapa de trofozoito mediano y adulto

6.3.2.1 El trofozoito es una etapa del desarrollo del parásito dentro del glóbulo rojo, puede variar en tamaño desde pequeño a grande. En el trofozoito se visualiza, en la mayoría de las veces, el pigmento malárico el cual aparece a medida que el parásito crece. Este pigmento denominado también hemozoína es un producto del metabolismo celular del parásito y proviene de la descomposición de la hemoglobina en hem y globina. La hemozoína no se colorea, porque adopta un color propio, que puede variar de amarillo pálido a castaño oscuro o negro.

- 6.3.2.2 El trofozoito mediano se caracteriza porque morfológicamente es grande, de citoplasma fragmentado y con presencia de vacuola, pudiendo ser la cromatina o núcleo del parásito de posición central o excéntrica. El trofozoito adulto es de menor tamaño, de citoplasma compacto, la cromatina se ubica por lo general excéntricamente y es más pequeña que la de los gametocitos (Figura N° 16).



Figura N° 16. Trofozoito medianos y adultos.

6.3.3 Etapa de esquizonte

- 6.3.3.1 En la etapa de esquizonte el parásito de malaria comienza a reproducirse. Esta reproducción es conocida como asexual debido a que se reproducen por simple división binaria. El parásito presenta núcleos con cromatina y citoplasma definido. Cuando este estadio está presente el número de núcleos observados son de utilidad para determinar la especie (Figura N° 17).



Figura N° 17. Esquizontes.

6.3.4 Etapa de gametocito

- 6.3.4.1 El gametocito es el estadio sexual en el cual el parásito llega a ser masculino o femenino, éste proceso de maduración se completa en el estómago del anofelino hembra. La morfología de los gametocitos depende de la especie. El gametocito masculino es llamado microgametocito y el gametocito femenino macrogametocito (Figura N° 18).

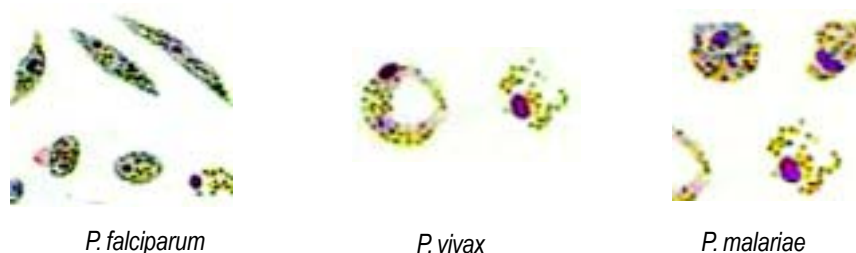


Figura N° 18. Gametocitos.

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

6.4 MORFOLOGÍA DE LAS ESPECIES DE *Plasmodium* EN EL FROTIS DE SANGRE

- 6.4.1 Una simple manera de distinguir entre las cuatro especies de malaria es observar los cambios morfológicos que provoca el parásito al infectar los glóbulos rojos. Los caracteres distintivos son: el tamaño del glóbulo rojo (si está o no agrandado) y si se han coloreado o no las granulaciones de Schuffner dentro de la célula.

- 6.4.2 En las preparaciones sanguíneas de película fina o frotis, las plaquetas adheridas a los eritrocitos pueden confundirse con plasmodios, así como otros contaminantes como bacterias, esporas, hongos, microalgas, precipitado de colorante, etc.

6.5 APARIENCIA DE LOS PARÁSITOS EN GOTTA GRUESA Y FROTIS

- 6.5.1 La morfología de los glóbulos rojos y de los leucocitos cambian en el frotis y en la gota gruesa, lo mismo sucede con la morfología de los parásitos. Los parásitos de malaria pueden ser vistos semejantes a los glóbulos blancos en la gota gruesa, pero aparentan ser más pequeños que en el frotis. Se necesita observarlos muy cuidadosamente antes de identificarlos, enfocando y usando el micrométrico cada vez que mueva un campo microscópico, esto le permitirá examinar la gota gruesa en profundidad. El citoplasma de los anillos finos de los trofozoitos pueden aparecer incompletos o rotos. Esta apariencia es normal en muestras de sangre de gota gruesa. Similarmente, la ausencia de glóbulos rojos puede dificultar la visión de las granulaciones de Schüffner; por tanto, en partes de la muestra no puede ser posible ver el punteado. Observar el parásito en diferentes etapas de desarrollo le ayudará para hacer el diagnóstico. Recordar que las granulaciones de Maurer de *Plasmodium falciparum* no pueden ser vistos en gota gruesa.

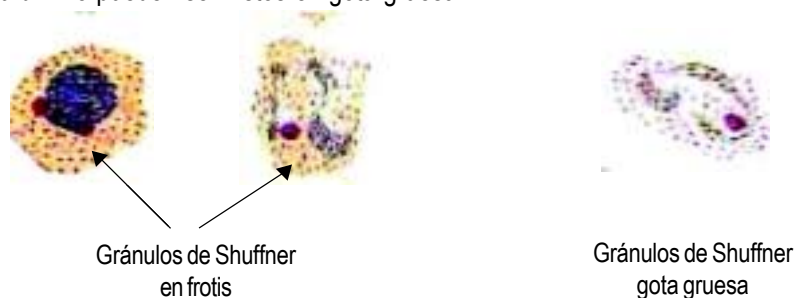


Figura N° 19. Gránulos de Shüffner de *P. vivax*.

- 6.5.2 En el estado de trofozoito, los *Plasmodium* presentan tres características indispensables, presentes tanto en la gota gruesa como en el frotis: citoplasma azul violáceo o azul cielo, núcleo rojo intenso o rojo grosella, y pigmento amarillo pálido o castaño oscuro o negro (dependiendo de la especie y de las formas maduras del parásito).
- 6.5.3 En las preparaciones sanguíneas las siguientes estructuras pueden confundirse con parásitos de malaria: plaquetas adheridas a los eritrocitos en las extensiones sanguíneas, conglomerados de plaquetas, fragmentos de leucocitos en las preparaciones de gota gruesa, colorante precipitado, restos de piel del paciente, polvo, bacterias, levaduras, esporas y otros microorganismos que caen en la preparación (si no se tienen protegidos) mientras se está secando, y algas u otros organismos que pueden estar contaminando el colorante.

6.6 EXAMEN DE RUTINA DE LA GOTTA GRUESA Y DEL FROTIS

El examen de la gota gruesa es recomendable para detectar la presencia de los parásitos de malaria, mientras que el frotis sirve como herramienta auxiliar para determinar la especie de *Plasmodium* en caso de que no sea posible hacerlo en la gota gruesa. El código del paciente es rotulado en la cabeza del frotis.

6.6.1 Examen de la gota gruesa

- 6.6.1.1 El examen de rutina de la gota gruesa requiere observar 100 campos microscópicos óptimos a un aumento final de 1000x, con lente de inmersión.

6.6.1.2 Una lámina puede declararse como negativa, sólo después de observar 100 campos microscópicos sin haber encontrado parásitos. Si se encuentran parásitos, deben examinarse también los 100 campos microscópicos; esto asegura detectar la posibilidad de infección mixta (más de una especie presente en una muestra de sangre).

6.6.1.3 En lo posible, debe identificarse la(s) especie(s) a la(s) que pertenecen los parásitos.

6.6.1.4 *Procedimiento*

- a. Verificar la clave de la lámina que va examinar en la hoja de registro de datos.
- b. Colocar la lámina entre los soportes de la platina mecánica y verificar que esté sostenida firmemente al momento de mover el carro, de lo contrario se pueden perder de vista objetos sospechosos antes de que puedan ser ubicados.
- c. Examinar la gota gruesa completa con el objetivo de 10X, hasta localizar una zona conveniente para la búsqueda de los plasmodia (que se observen leucocitos numerosos y bien coloreados).
- d. Colocar aceite de inmersión sobre la zona seleccionada de la gota gruesa y girar el objetivo de 100X hasta ponerlo en posición sobre ella.
- e. Bajar el objetivo hasta ponerlo en contacto con el aceite de inmersión.
- f. Verificar que la parte seleccionada de la lámina sea óptima (leucocitos de 10 a 20 por campo microscópico).
- g. Examinar 100 campos. Desplazar la lámina que contiene la muestra de sangre siguiendo el patrón mostrado (Figura N° 20). Recuerde usar el ajuste fino para enfocar, accionando el tornillo micrométrico hacia delante y atrás, con el fin de observar el mayor número posible de capas sanguíneas.
- h. Anotar el número de parásitos observados y la especie a la que pertenecen (si le fue posible identificarla).



Figura N° 20. Recorrido de la gota gruesa durante la observación microscópica.

6.6.2 Examen del frotis de sangre

6.6.2.1 Este examen requiere mayor tiempo de observación en comparación con la gota gruesa, debido a que la concentración de los elementos sanguíneos es mucho menor.

6.6.2.2 Se debe realizar en las siguientes circunstancias:

- a. Cuando no es posible examinar la gota gruesa por alguna razón (Ejemplo: por ser muy pequeña).
- b. Cuando no es posible identificar en la gota gruesa la(s) especie(s) de *Plasmodium*.

6.6.2.3 El aspecto que debe presentar esta preparación al microscopio debe ser:

- a. Fondo limpio y libre de residuos los eritrocitos deben estar teñidos de color rosa pálido.
- b. El núcleo de los leucocitos, de color morado oscuro y gránulos bien definidos.
- c. Los gránulos de Schüffner deben verse como un moteado en los eritrocitos que contienen *P. vivax*.
- d. La cromatina de los plasmodia se tiñe de color rojo grosella intenso y el citoplasma de azul violáceo o azul cielo.

6.6.2.4 *Procedimiento*

- Colocar la lámina sobre la platina mecánica entre los soportes de esta.
- Enfocar con el objetivo de 10X el extremo menos denso del frotis, donde los glóbulos rojos estén dispuestos en una sola capa.
- Bajar el objetivo de inmersión hasta poner en contacto con el aceite de inmersión.
- Enfocar y examinar la película de sangre siguiendo el patrón mostrado (Figura N° 21).
- Examinar el mayor número de campos microscópicos (300) para determinar si la muestra de sangre es positiva o negativa para malaria. Si el diagnóstico es dudoso deberá examinar de 400 a 500 campos microscópicos (Figura N° 22).

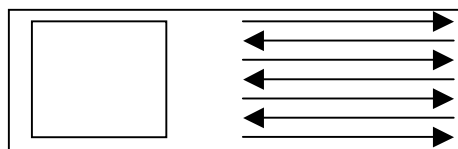


Figura N° 21. Recorrido del frotis durante la observación microscópica

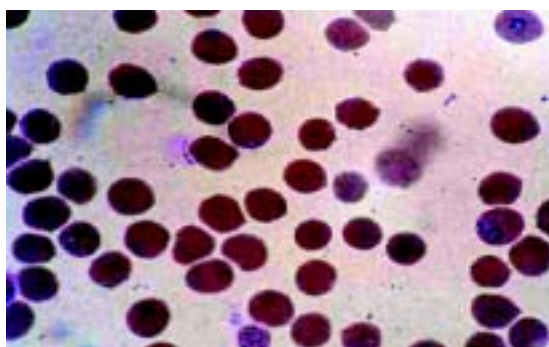


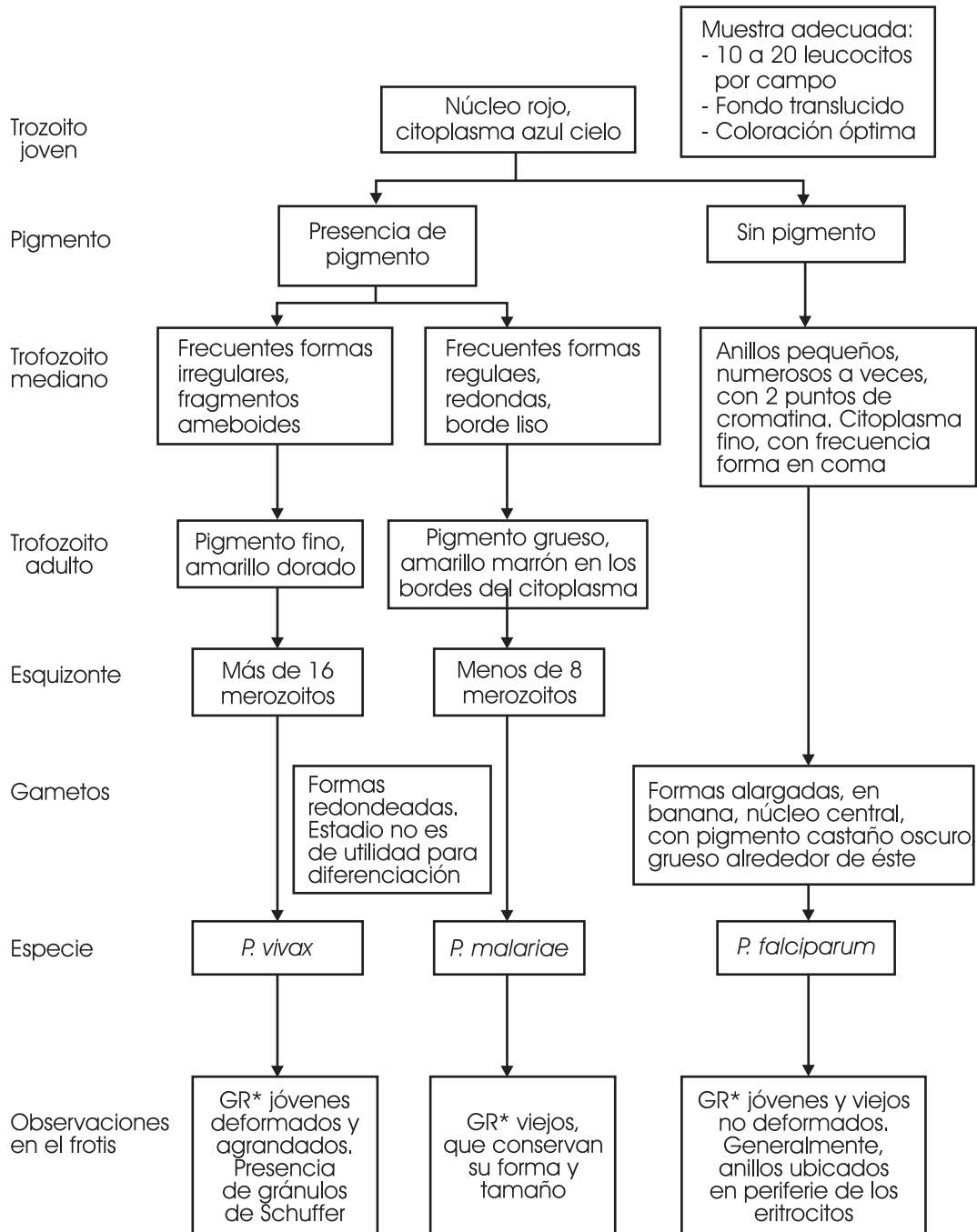
Figura N° 22. Observación microscópica de *P. falciparum* en frotis

Tabla N° 1. Características diferenciales entre plasmodios vistos en frotis de sangre humana

Característica	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>
Glóbulo rojo Aspecto general	- Tamaño aumentado. - Gránulos de Schuffner presentes.	- Tamaño normal	- Tamaño normal o menor
Trofozoito joven (anillos)	- Pequeño a grande, generalmente un anillo por eritrocito.	- Pequeño y delicado, a menudo dos puntos de cromatina y dos o más anillos por eritrocito - La infección múltiple es rara.	- Generalmente uno a dos anillos por eritrocito.
Trofozoito mediano	- Grande, ameboide. - Pigmento en forma de bastones finos.	- Raro en sangre periférica. Si existe, es de tamaño moderado. - Pigmento en forma de gránulos.	- Pequeño y compacto, a menudo en forma de banda. - Pigmento granulado.
Trofozoito maduro o adulto	- Tamaño mediano, con citoplasma compacto. - Pigmento fino.	- Raro en sangre periférica.	
Esquizonte	- Grande, con numerosos merozoitos (12-24). Promedio: 16. - Pigmento concentrado en 1 ó 2 masas.	- Mediano, con numerosos merozoitos (12 - 32). - Pigmento en una masa única - Su presencia es rara en sangre periférica.	- Pequeño, con pocos merozoitos grandes dispuestos en roseta (6 a 12), Promedio: 8. - Pigmento granuloso, ubicado generalmente en la parte central.
Gametocito	- Esféricos, compactos y de núcleo único. - Pigmento difuso y fino.	- Forma de banana o salchicha y de núcleo único central.	- Parecido al <i>P. vivax</i> pero más pequeño y menos numeroso en el frotis.

Nota: Ocasionalmente se puede encontrar dificultades para establecer diferencias entre trofozoitos maduros y gametocitos de *Plasmodium vivax* y entre trofozoitos maduros de *Plasmodium malariae* y gametocitos redondeados de *Plasmodium falciparum*. Tampoco es posible distinguir entre trofozoitos en estadios avanzados y gametocitos de *Plasmodium malariae* en muestras de gota gruesa, aunque si están presentes los gametocitos de *Plasmodium falciparum* es relativamente fácil de realizar el diagnóstico.

Tabla N° 2. Algoritmo para el diagnóstico parasitológico de malaria en gota gruesa.

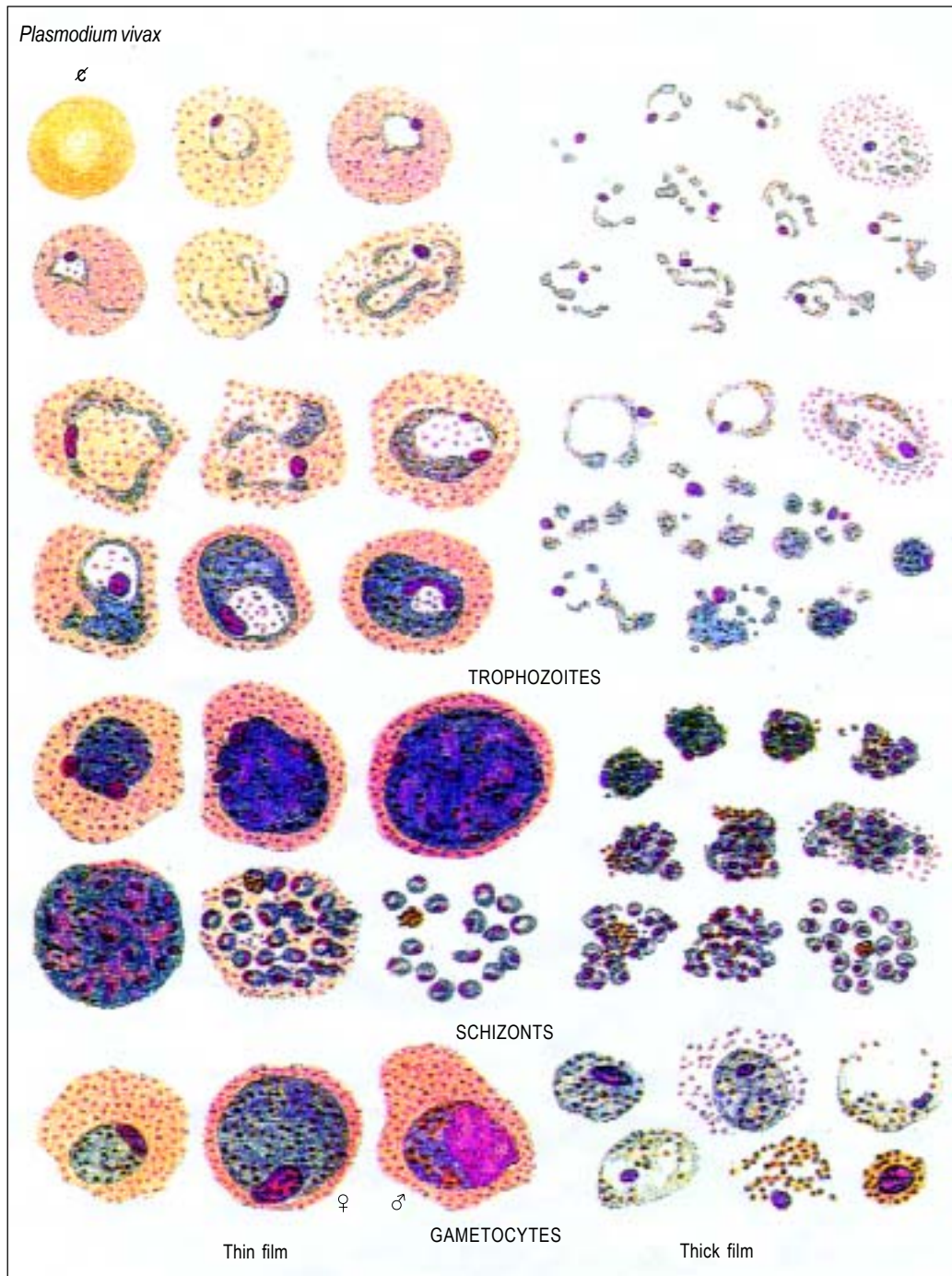


GR* = Hematíes.

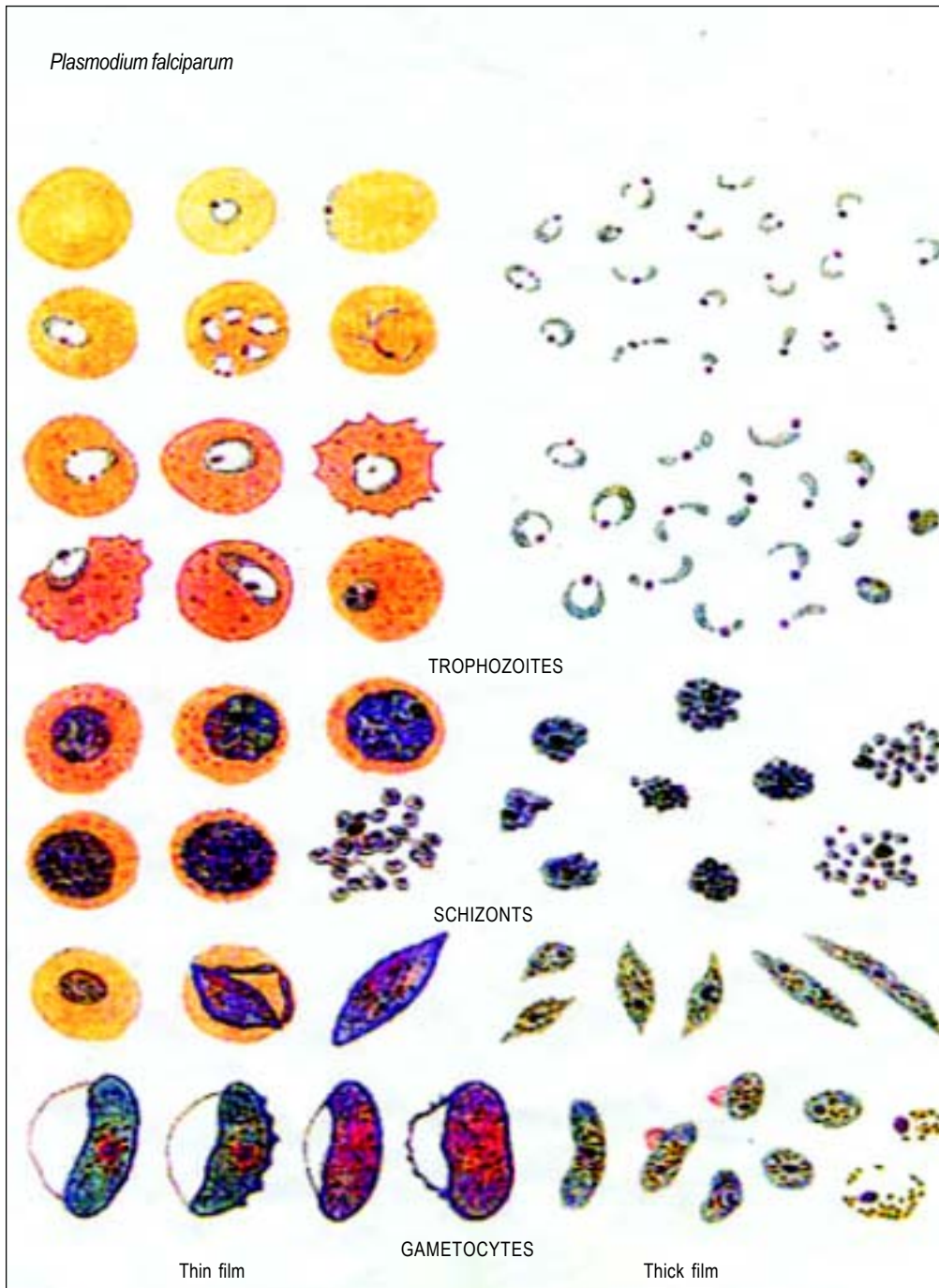
Tabla N° 3. Aspecto de las diferentes especies y estadios de los plasmodia en la gota gruesa.

Estadio característica	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malarie</i>
Trofozoito			
Tamaño	pequeño a grande	pequeño a mediano	pequeño a grande
Número	moderado	por lo general abundante	escaso a moderado
Citoplasma	Fragmentado, de forma irregular	uniforme, fino	regular, denso
Cromatina	única, a veces dos	a menudo dos núcleos	única grande
Formas	Jóvenes: anillos, comas, sin pigmento mediano: citoplasma ameboso, fragmentado, con pigmento. maduro o adulto: compacto.	Frecuentemente anulares y comas. Las formas maduras (compactas) sólo presentes en casos graves	Jóvenes: anulares Adultos: redondos, compactos
Pigmento	Fino, desperdigado	Pocos gránulos o en masa	Abundante, generalmente rodeando el citoplasma
Esquizonte			
Tamaño	grande	pequeño, compacto	pequeño
No en sangre	escaso a moderado	poco frecuente, solo en forma, graves	escaso
N° de merozoitos	12 a 24, generalmente 16	12 a 30, ó mas	6 a 12, generalmente 8
Forma	en conglomerado irregular formas maduras	aglomerados y compactos	merozoitos en conglomerado laxo, de forma madura, algunos aparentemente sin citoplasma
Pigmento	dispuesto en masa suelta	masa única y oscura	concentrado
Gametocito			
Formas inmaduras	difíciles de distinguir de trofozoitos maduros	inmaduras: puntiagudas	Difíciles de distinguir de trofozoitos maduros
Formas maduras	redondas, grandes	en forma de banana o redondeadas	redondeadas, compactas, algunas veces también difícil de distinguir de los Trofozoitos maduros
Cromatina	grande y única, bien definida	bien definida de menor tamaño	bien definida menor tamaño
Pigmento	desperdigado fino	desperdigado, grueso	Desperdigado, rugoso, Puede estar distribuido en la periferie
Formas erosionadas	con citoplasma oscuro o ausente, y solo con cromatina y pigmento	a veces se observa órgano de extrusión de color rosa	solo con cromatina y pigmento

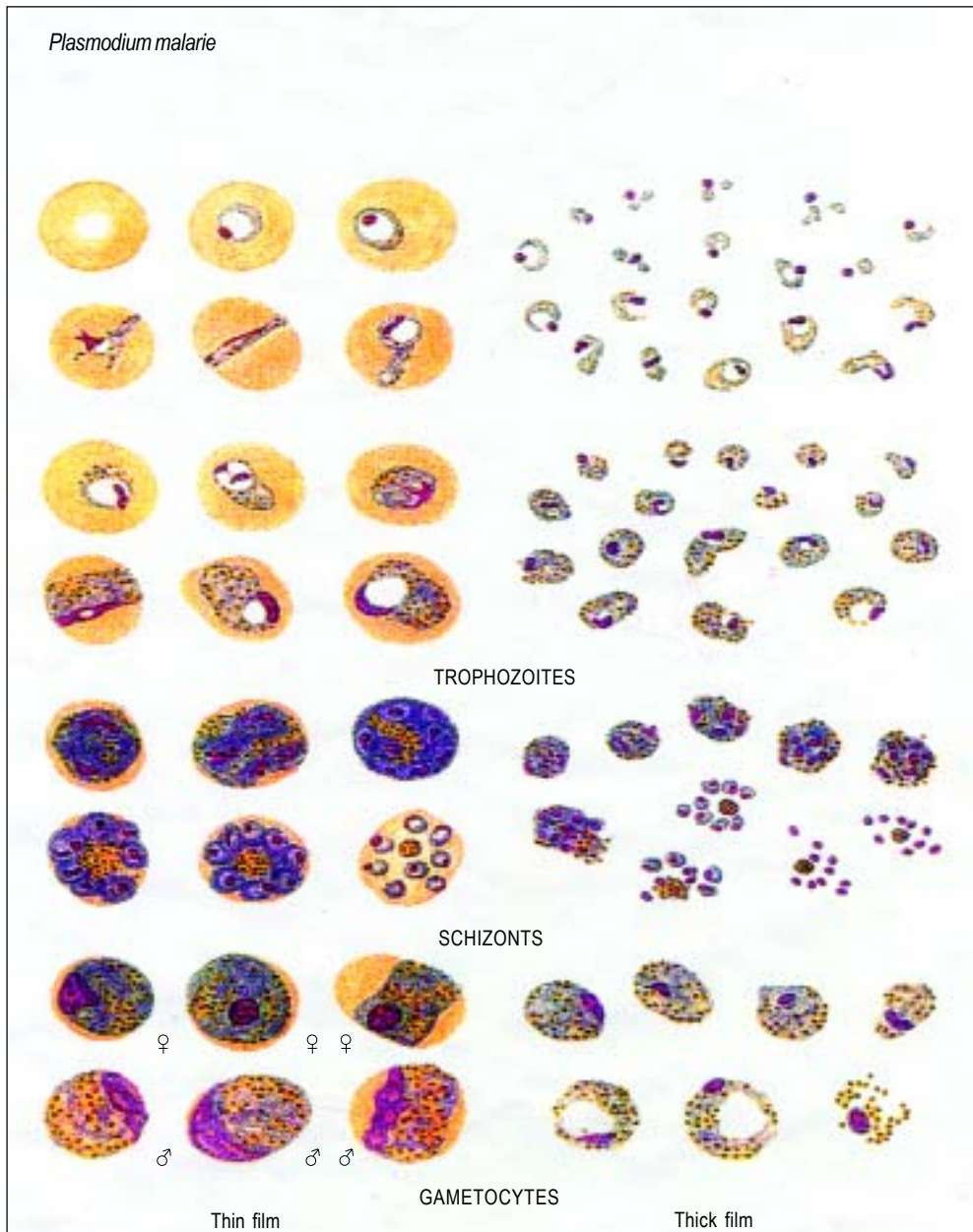
**ESTADIOS PARASITARIOS DE *P. vivax* EN FROTIS (IZQ)
Y GOTA GRUESA (DER.)**



**ESTADIOS PARASITARIOS DE *P. falciparum* EN FROTIS (IZQ)
Y GOTA GRUESA (DER.)**



**ESTADIOS PARASITARIOS DE *P. malariae* EN FROTIS (IZQ)
Y GOTA GRUESA (DER.)**



SECCIÓN VII

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD PARASITARIA

7.1 CONSIDERACIONES GENERALES

- 7.1.1 La determinación de la densidad parasitaria es útil para:
 - 7.1.1.1 Evaluar la severidad de la infección malárica.
 - 7.1.1.2 Evaluar la eficacia del tratamiento antiparasitario, monitoreando la densidad parasitaria durante el tratamiento. Si el tratamiento es eficaz, la densidad parasitaria disminuirá progresivamente.
 - 7.1.1.3 La determinación de la densidad parasitaria es especialmente importante en la infección por *P. falciparum*, la cual se asocia a enfermedad severa y potencialmente fatal, por lo que es necesario el seguimiento de la evolución parasitológica en respuesta al tratamiento instaurado.

7.2 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD PARASITARIA

Los métodos más usados para establecer la densidad parasitaria son dos:

7.2.1 Método 1: Sistema de cruces (+) o método simple (semicuantitativo)

- 7.2.1.1 Sistema indirecto, simple, usado rutinariamente que permite determinar el número de parásitos presentes por microlitro de sangre mediante la suma del total de parásitos observados en 100 campos.
- 7.2.1.2 El resultado se deberá informar de la siguiente manera:

Cualquier número inferior a 40 parásitos en 100 campos debe escribirse el número de parásitos encontrados en la lectura.

Si observó más de 40 parásitos, use la siguiente escala:

- +/2 De 40 a 60 parásitos en 100 campos
- + Un parásito por campo en 100 campos
- ++ De 2 a 20 parásitos por campo en 100 campos
- +++ De 21 a 200 parásitos por campo en 100 campos
- ++++ Más de 200 parásitos por campo en 100 campos

Con un aumento de 750X, 100 campos microscópicos de inmersión, una muestra de gota gruesa bien preparada corresponde aproximadamente a 0,2 mL de sangre.

7.2.2 Método 2: Cálculo del número de parásito por microlitro de sangre

- 7.2.2.1 Método práctico, razonable y de precisión aceptable. El número de parásitos por microlitro de sangre se mide comparando el número de parásitos asexuados con el número de leucocitos en la gota gruesa en base a un recuento medio estimado en cerca de 6000 leucocitos por microlitro de sangre. Aunque existen variaciones este número nos permite comparaciones razonables, particularmente cuando se comparan densidades de muestras obtenidas sucesivamente del mismo paciente. Para poner en práctica este método se necesitan dos contadores: uno para contar los parásitos y otro para los leucocitos.

7.2.2.2 Aplicar los siguientes criterios, según se presente el caso:

- Si después de contar 200 leucocitos, 10 ó más parásitos han sido identificados y contados, anotar los resultados en los formatos de registro en términos de número de parásitos por 200 leucocitos.
- Si después de contar 200 leucocitos, menos de 10 parásitos han sido identificados y contados, continuar el recuento de leucocitos hasta llegar a 500 leucocitos, para luego anotar los resultados en los formatos de registro en términos de número de parásitos por 500 leucocitos.
- En caso de parasitemia alta, realizar el recuento en función del número de parásitos, registrando su recuento hasta 500 y reemplazar su valor en la fórmula con la cantidad de leucocitos encontrados.

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

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

Donde:

N° de parásitos = Número de parásitos contados.

N° de leucocitos = Número de leucocitos contados.

μL = microlitro

Ejemplos:

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

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

- Si se cuentan 508 leucocitos y 7 parásitos, al aplicar la fórmula se tendrá:

$$\text{Parásitos} / \mu\text{L} = \frac{7 \times 6000}{508} = 83$$

- Si se cuentan 501 parásitos y sólo 95 leucocitos, al aplicar la formula se tendrá:

$$\text{Parásitos} / \mu\text{L} = \frac{501 \times 6000}{95} = 31\ 642$$

- Como podemos observar las cantidades de 200 y 500 no siempre son exactas en la práctica del conteo.

7.2.2.4 Si al finalizar los cálculos, se obtienen cifras decimales redondear a números enteros. Ejemplo:

$$\text{Parásitos} / \mu\text{L} = \frac{68 \times 6000}{205} = 1990,24 \text{ esto es: } 1990 \text{ p} / \mu\text{L}$$

7.2.2.5 En el caso de *P. falciparum*, el recuento se realiza de manera independiente para los estadios de trofozoito y gametocito. Para el recuento de *P. vivax*, todos los estadios ingresan al recuento sin independencia alguna.

7.3 REPORTE DE LA DENSIDAD PARASITARIA EN CASO DE MALARIA POR *P. falciparum*

7.3.1 Si la infección malárica es por *P. falciparum*, además de la densidad parasitaria, se debe registrar las fases de desarrollo de la siguiente manera:

F	=	anillos únicamente
F y Fg	=	anillos y gametocitos
Fg	=	gametocitos únicamente

7.3.2 Cuando se detecta un caso positivo de malaria por *P. falciparum*, se debe reportar inmediatamente al jefe inmediato y realizar un seguimiento o control tomando muestras durante los días D3, D7 y D14. En caso de realizar la evaluación de alguna droga antimalárica, el seguimiento de los pacientes se realizará los días D1, D2, D3, D7, D14, D21 y D28.

7.3.3 Para garantizar el diagnóstico en el seguimiento de un caso por *P. falciparum*, se debe observar como mínimo 300 campos microscópicos con la finalidad de detectar la ocurrencia de resistencia a la(s) droga(s) antimalárica(s) o recrudescencia de la infección.

7.3.4 En caso de seguimiento a *P. falciparum*, se identificará la muestra con la clave original (primera muestra) en todas las láminas a tomarse, adicionando un número correlativo para cada una de ellas. Ejemplo:

Clave original	Claves de seguimiento
(201) 15	(201) 15/1, (201) 15/2, (201) 15/3, etc.

7.3.5 El control de casos de malaria por *P. vivax* se realiza de la misma forma que para *P. falciparum*; esto es, determinando la densidad parasitaria los días D3, D7 y D14, a no ser que se esté realizando alguna evaluación de droga antimalárica para *P. vivax*.

SECCIÓN VIII

RESISTENCIA FARMACOLÓGICA

8.1 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE *P. falciparum* A LOS MEDICAMENTOS ANTIMALÁRICOS MEDIANTE EL SEGUIMIENTO *in vivo*

8.1.1 Para la evaluación de la resistencia de *P. falciparum* a los antimaláricos es necesario hacer un seguimiento del paciente, que consiste en la evaluación de la densidad parasitaria (número de parásitos por microlitro de sangre) mediante el examen de la gota gruesa durante los días señalados denominados como días de control.

8.1.2 El incremento o disminución de la densidad parasitaria como respuesta a un antimalárico es considerado como respuesta parasitológica. Un parásito es resistente a una droga cuando sobrevive a una concentración de droga que anteriormente lo eliminaba.

8.1.3 La vigilancia sistemática de los fracasos del tratamiento en lugares donde se puede efectuar el diagnóstico microscópico puede actuar como sistema de alerta acerca de los problemas de eficacia del tratamiento. Las pruebas *in vivo* e *in vitro* recomendadas por la OMS son dirigidas esencialmente a determinar el efecto de un medicamento sobre los parásitos y sirven para la adopción de decisiones en el cambio de la política nacional de medicamentos antimaláricos.

8.1.4 Criterios de inclusión

8.1.4.1 Personas enfermas con diagnóstico parasitológico a malaria por *P. falciparum*.

8.1.4.2 Además, la densidad parasitaria debe ser de 500 a 100,000 parásitos asexuados determinados por examen microscópico de gota gruesa.

8.1.4.3 Edad > 2 años.

8.1.4.4 Fiebre, corroborada por temperatura axilar > de 37,5 °C o antecedente de fiebre de 48 horas previas a la captación.

8.1.4.5 Mono infección a *P. falciparum*.

8.1.4.6 Malaria no complicada.

8.1.4.7 Acceso geográfico y disponibilidad del paciente para asistir regularmente al seguimiento.

8.1.4.8 Hemoglobina > 5gr/dL o hematocrito > 15,0%.

8.1.4.9 Consentimiento informado y autorizado con firma del paciente. En caso de niños, además del asentimiento del menor, se deberá contar con la autorización del padre, madre o tutor, en caso de imposibilidad de firmar, se tomará huella digital.

8.1.5 Criterios de exclusión

- 8.1.5.1 Mujeres embarazadas.
- 8.1.5.2 Presencia de otras causas de fiebre o condiciones médicas agudas o crónicas.
- 8.1.5.3 Infecciones mixtas o de otras especies distintas de *P. falciparum*.
- 8.1.5.4 Presencia de signos de alarma o malaria grave complicada.
- 8.1.5.5 Antecedentes de hipersensibilidad a alguna de las drogas antimaláricas en estudio.
- 8.1.5.6 Contraindicaciones específicas del medicamento a ser utilizado.

8.1.6 Procedimiento

- 8.1.6.1 La identificación del parásito, preparación y examen de láminas y el conteo de parásitos se realizarán de acuerdo a los procedimientos correspondientes desarrollados en los Anexos A, C y D.
- 8.1.6.2 Una vez enrolado el paciente es necesario que este regrese los días que le son señalados como días de control.
- 8.1.6.3 El día del enrolamiento del paciente es considerado como día 0 de seguimiento.
- 8.1.6.4 Todos los pacientes regresarán para sus controles los días 1, 2, 3, 7 y 14, pudiendo extenderse a los días 21 y 28, según el número de días de seguimiento fijado.
- 8.1.6.5 En cada día de control se realizará una evaluación clínica del paciente, un examen de gota gruesa (para determinación de densidad parasitaria) y evaluación de temperatura axilar.

8.1.7 Respuesta parasitológica

Esta se clasifica de la siguiente manera:

8.1.7.1 Resistencia tipo III (RIII):

Si la densidad parasitaria del día 2 es \geq del 100% del día 0.
Si la densidad parasitaria del día 3 es $<$ del 25% del día 0.

8.1.7.2 Resistencia tipo II (RII):

Si la densidad parasitaria del día 3 es $<$ del 25% del día 0, pero reaparece el día 7.

8.1.7.3 Resistencia tipo I (RI) temprana:

Si la densidad parasitaria del día 3 es negativa, pero reaparece entre el día 4 y día 28 inclusive, o si la densidad parasitaria del día 3 es $<$ 25% del día 0, el día 7 es negativa, pero reaparece después del día 7.

8.1.7.4 Resistencia tipo I (RI) tardía:

Considerando los criterios anteriores, pero la parasitemia aparece después del día 14.

8.1.7.5 *Sensible*

Cuando la densidad parasitaria del día 3 es negativa ó < del 25% del día 0, y negativa entre el día 7 y día 28 inclusive.

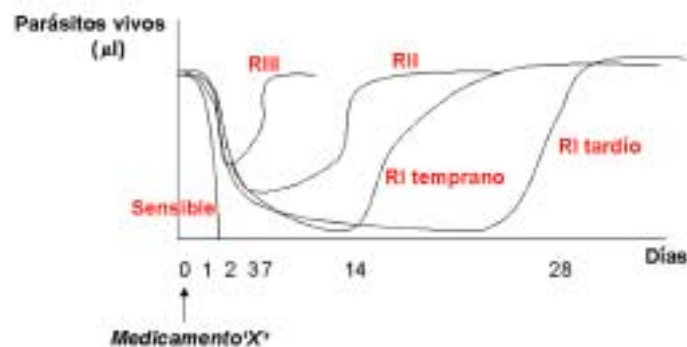


Figura N° 23. Respuesta parasitológica al tratamiento antimalárico

8.1.8 **Respuesta terapéutica**

La respuesta terapéutica se clasifica en tres categorías:

8.1.8.1 *Fracaso precoz del tratamiento (FPT)*

Si el paciente presenta una de las siguientes situaciones durante los 3 primeros días de seguimiento:

- a. Presencia de signos de peligro o signos de malaria grave con presencia de parasitemia el día 1, 2 ó 3.
- b. Si la densidad parasitaria del día 3 es > al 25% del día 0.

8.1.8.2 *Fracaso tardío del tratamiento (FTT)*

Si el paciente presenta una de las siguientes situaciones entre los días 4 y 28 de seguimiento, sin haber tenido anteriormente ninguno de los requisitos que lo calificarían como FPT:

- a. Presencia de signos de peligro o de malaria grave después del día 3, con parasitemia de la misma especie que el día 0.
- b. Regreso no programado del paciente debido a deterioro clínico en presencia de parasitemia.
- c. Presencia de parasitemia entre el día 7 y el día 28.

8.1.8.3 *Respuesta Clínica Adecuada (RCA).*

Si el paciente no presenta ninguno de los criterios de FPT ni FTT y se confirma la desaparición del parásito durante el período de seguimiento.

8.1.9 **Medicamentos estudiados**8.1.9.1 *Cloroquina*

- a. Droga antimalárica de marcada y rápida acción esquizonticida sanguínea contra todas las infecciones por *P. malariae* y *P. ovale* y contra las infecciones por *P. falciparum* y *P. vivax* sensibles a cloroquina.

Ejerce también acción gametocitocida contra *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, así como contra los gametocitos inmaduros de *P. falciparum*. No es activa contra las formas intrahepáticas.

- b. Presenta una composición química de 7-cloro (4-dietilamino-metilbutalamina) quinoleína. Sus nombres comerciales son Aralen, Avovlar, Resoquín y Nivaquina. Se presenta en comprimidos de 50 mg 100 mg y 150 mg de base (como difosfato o sulfato), y en jarabe que contiene 50 mg de base (como difosfato o sulfato) por cada 5 mL (Anexo E).

8.1.9.2 *Sulfadoxina / pirimetamina*

- a. Droga antimalárica de acción esquizonticida sanguínea.
- b. Presenta una composición química de N 5,6 dimetoxi-4-pirimidil sulfanólamida y de 2,4- diamino-clorefenil-6-etilpirimidina. Su nombre comercial es Fansidar. Su presentación es en frascos de comprimidos. Cada comprimido contiene 500 mg de sulfadoxina con 25 mg de pirimetamina.
- c. Los resultados de las pruebas *in vivo* e *in vitro* realizadas para esta droga se registran en formularios recomendados por la OMS (Anexo E).

8.1.9.3 *Mefloquina*

- a. Es un 4 quinolino-metanol químicamente relacionada con la quinina.
- b. Es un potente esquizonticida sanguíneo de acción prolongada contra *P. falciparum*. Es también sumamente activo contra *P. vivax* y *P. malariae*, y probablemente también contra *P. ovale*. No tiene una acción gametocitocida ni contra las etapas tisulares de los plasmodia.
- c. Debido a su larga vida media de eliminación y a la consiguiente concentración subterapéutica prolongada en la sangre, cabe prever la aparición de resistencia, especialmente en lugares con alta transmisión. La mefloquina se fija en gran medida a las proteínas (98% en el plasma) y tiene una larga vida media de eliminación que oscila entre 10 y 40 días en los adultos pero que tiende a ser más corto en los niños y mujeres embarazadas (II y III trimestre). El metabolito principal, la carboximefloquina, aparece de dos a cuatro horas después de la ingestión del medicamento de origen (quinolina metanol).
- d. La mefloquina puede usarse con fines terapéuticos como quimioprolifáctico.
- e. El principal problema de la mefloquina es la posibilidad de reacciones adversas neuropsiquiátricas, además de otros efectos colaterales como mareos, vómitos, diarreas, dolor abdominal así como la probabilidad de un mayor riesgo de estos eventos durante el embarazo y en personas que toman medicamentos cardioactivos.

8.1.9.4 *Artesunato*

- a. El principio activo del artesunato es la artemisinina (compuesto de origen), aislado de la *Artemisia annua*. Es una lactona de sesquiterpeno con un puente de peróxido; la fijación de este peróxido parece ser responsable de su acción antimalárica.

- b. Esta droga antimalárica es un esquizotocida sanguíneo de acción rápida.
- c. Puede ser administrado en terapia combinada , ya sea con sulfadoxina/pirimetamina o con mefloquina. De acuerdo a estudios clínicos realizados, la razón por la cual se administra mefloquina el segundo día de iniciado el tratamiento con artesunato es por que hay menos riesgos de vómitos, debido a que la afección clínica ha mejorado.

8.1.9.5 Quinina

- a. La quinina es eficaz contra infecciones por *P. falciparum* resistentes a sulfadoxina/pirimetamina o a la combinación de sulfadoxina /pirimetamina + artesunato o sulfadoxina /pirimetamina + mefloquina. En algunos lugares de Asia suroriental, donde la quinina se ha usado mucho para el tratamiento de la malaria, se ha detectado una disminución de la sensibilidad a esta droga, especialmente en casos en que se administró tratamiento en un entorno no supervisado y en pacientes ambulatorios en un régimen de más de tres días. Aunque pesar de esto la quinina sigue siendo el medicamento de elección para tratar la malaria por *P. falciparum* grave y complicada.
- b. Las sales de quinina vienen en muchas formas diferentes, tanto en comprimidos como inyectables. Las más comunes son clorhidrato de quinina y sulfato de quinina que contienen 82% y 82,6% de base de quinina, respectivamente. La presentación en forma de bisulfato de quinina (con 59,2%) es la menos común.

8.2 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA *in vitro* DE *P. falciparum* A LAS DROGAS ANTIMALARIAS

8.2.1 Los estudios *in vitro* comparan las reacciones de los parásitos a los antimaláricos bajo condiciones libres de interferencia de factores derivados del sistema inmunológico humano. Al mismo tiempo son estudios complementarios de los estudios *in vivo*.

8.2.2 Criterios de inclusión

- 8.2.2.1 Personas enfermas con diagnóstico parasitológico positivo a *P. falciparum* únicamente.
- 8.2.2.2 Densidad parasitaria > 1000 y < 80 000 parásitos asexuados / μ L.
- 8.2.2.3 Malaria no complicada.

8.2.3 Criterios de Exclusión

- 8.2.3.1 Pacientes que hayan recibido tratamiento antimalárico con 4-aminoquinoleinas los últimos 14 días o sulfadoxina/ pirimetamina en los últimos 28 días.
- 8.2.3.2 Pacientes muy enfermos o con vómitos, con antecedentes recientes de convulsiones, conciencia afectada, no poder sentarse o estar de pie.
- 8.2.3.3 Pacientes positivos a la prueba de Dill-Glazko (evaluación de excreción de metabolitos antimaláricos)
- 8.2.3.4 Infecciones mixtas o de otras especies distintas de *P. falciparum*.

8.2.4 Procedimiento

8.2.4.1 Se empleará el estuche de microprueba *in vitro* (MARK II) que consiste en placas de ELISA para varias determinaciones con pozos que contienen drogas antimaláricas en diferente concentración. Estas placas son utilizadas para la evaluación de la respuesta del *P. falciparum* a la cloroquina, sulfadoxina/ pirimetamina y otras drogas recomendadas por la OMS (1987)(Figura N° 24).

8.2.4.2 Pipetear 0,9 mL de medio RPMI completo en varios tubos Falcon de tapa de presión de 5 mL.

8.2.4.3 Rotular adecuadamente los tubos y colocarlos en posición vertical en la gradilla.

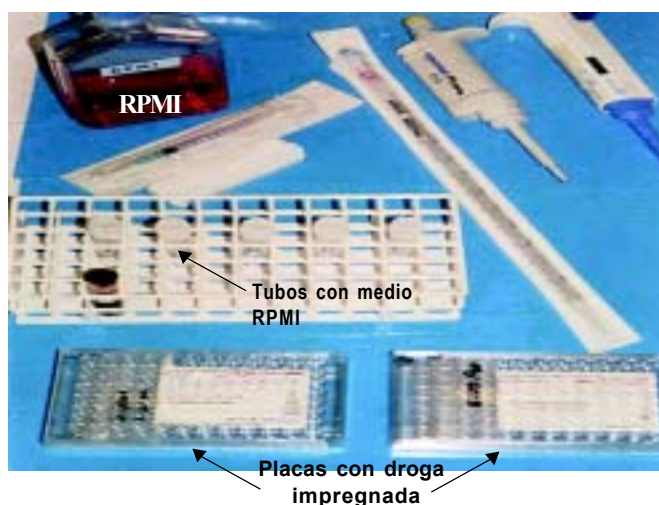


Figura N° 24. Materiales utilizados para la evaluación de resistencia *in vitro*

8.2.4.4 Realizar punción capilar o venosa y tomar 100 μ L de sangre para transferirla rápidamente al tubo Falcon de 5 mL que contiene 0,9 mL de medio. De este modo estaremos preparando una solución de 1/10 de la muestra obtenida (Figura N° 25).

8.2.4.5 El volumen final de la solución 1/10 dependerá del número de drogas a evaluar.

8.2.4.6 Presionar la tapa firmemente y agitar suavemente el tubo para mezclar la sangre.



Figura N° 25. Extracción de 0,1 mL de sangre parasitada para diluir en 0,9 mL de medio.

- 8.2.4.7 La mezcla sangre/medio (1/10) se mantendrá estable varias horas y los tubos podrán transportarse con cuidado en el bolsillo del pecho o del pantalón, para mantener el contenido a una temperatura aproximada a la corporal. Si el tiempo de transporte es mayor a 4 horas, se mantendrá conservado en hielo húmedo.
- 8.2.4.8 Realizar las extensiones y preparaciones en gota gruesa previas al cultivo.
- 8.2.4.9 Retira las tiras del precintado que cubren los pocillos de la placa (viene en el estuche de la microprueba)(Figura N° 26).



Figura N° 26. Retiro del precintado de la muestra.

- 8.2.4.10 Todos los pocillos de la fila apropiada (una fila por cada paciente analizado) se dosifican con 50 μ L de la mezcla sangre/medio (1:9) usando la pipeta eppendorf de 50 μ L y una punta estéril desechable suministrada con el estuche.
- 8.2.4.11 La dosificación se efectuará empezando por el pocillo testigo (A) y se seguirá por orden creciente de concentración hasta el pocillo H (Figura N° 27).



Figura N° 27. Siembra de las muestras.

- 8.2.4.12 Agitar de vez en cuando la mezcla sangre/medio en el tubo de 5 mL para asegurar que la sangre se mantenga en suspensión y se distribuya por igual a todos los pocillos. Luego, quitar y descartar la punta desechable estéril.
- 8.2.4.13 Adaptar una nueva punta desechable estéril a una pipeta eppendorf e instalar la próxima fila exactamente del mismo modo y así sucesivamente hasta que todas las muestras queden repartidas en partes alícuotas sobre la placa.
- 8.2.4.14 Colocar la cubierta sobre la microplaca y con un lápiz graso escribir todos los detalles de cada paciente analizado sobre la fila correspondiente de la placa.

- 8.2.4.15 Agitar la placa suavemente para tener la seguridad de que el fármaco depositado en los pocillos ha quedado completamente disuelto (Figura N° 28).



Figura N° 28. Agitar la placa luego de sembrar las muestras

- 8.2.4.16 Tomar el tarro de velas de la incubadora regulada para asegurar una temperatura interna de 37°C en el tarro; es sumamente necesario precalentar el tarro durante una hora como mínimo y cargar con las placas que van a incubarse.
- 8.2.4.17 Cuando la segunda vela esté a punto de apagarse cerrar el grifo de evacuación.
- 8.2.4.18 Incubar el contenido a 37° C durante 24-30 horas (según la fase de desarrollo de los trofozoitos en el frotis previo al cultivo)(Figura N° 29).



Figura N° 29. Incubación de las muestras en estufa de CO₂.

- 8.2.4.19 Tras la incubación, cosechar el contenido de los pocillos, quitando el líquido sobrenadante con tubos capilares de 50 µL y traspasar los glóbulos rojos depositados en el fondo plano de los pocillos a una lámina portaobjetos limpio, para formar una serie de gotas gruesas dispuestas en serie (Figura N° 30).

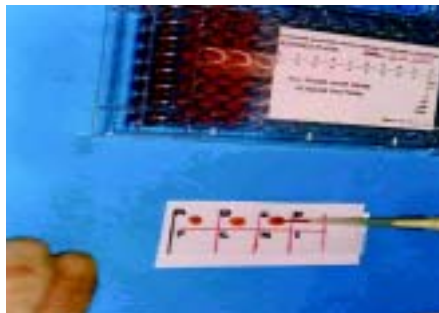


Figura N° 30. Cosecha de muestras luego de incubación.

- 8.2.4.20 Antes de teñirlas, secar cuidadosamente las preparaciones en gota gruesa resultantes, pues de otro modo se desprenderán espontáneamente del portaobjetos. Normalmente se necesita 24 horas para secarlas al aire, pero este plazo puede acortarse secándolas en una estufa a 37°C (30 minutos).
- 8.2.4.21 Las preparaciones en gota gruesa se tiñen durante 30 minutos con giemsa diluido al 1% (v/v) en agua de pH 7,2 (Figura N° 31).



Figura N° 31. Coloración de las gotas gruesas con giemsa.

- 8.2.4.22 Realizar la lectura de la gota gruesa para el recuento de esquizontes. Para que la prueba sea aceptable se tendrá en cuenta que la población de esquizontes maduros debe ser del 10% ó más (es decir, 20 esquizontes con tres o más núcleos por 200 parásitos asexuados).
- 8.2.4.23 Para el caso de las preparaciones en gota gruesa con sulfadoxina/piremetamina (SP), se tendrá en cuenta: presencia de trofozoitos, presencia de esquizontes con 3 a 7 núcleos, esquizontes anormales y esquizontes normales con 8 núcleos o más. Asimismo, se tendrá en cuenta el porcentaje de esquizontes maduros y el porcentaje de esquizontes inhibidos.
- 8.2.4.24 Los resultados de las pruebas inmediatamente después de conocerse se anotarán en las fichas adecuadas.

8.2.4.5 Interpretación de los resultados

Tabla N° 4. Interpretación de los resultados de evaluación formológica

DROGA	RESPUESTA SATISFACTORIA (inhibición completa de esquizontes)	RESISTENCIA (crecimiento de esquizontes)
Cloroquina	≤ 4 pmol	≥ 8 pmol
Mefloquina	(*)	≥ 64 pmol
Quinina	≤ 128 pmol	≥ 256 pmol
Amodiaquina	≤ 2 pmol	≥ 4 pmol
Fansidar	= CI 50%	> CI 90%

SECCIÓN IX

CONTROL DE CALIDAD EN EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA

9.1 ACTIVIDADES DEL LABORATORIO DE REFERENCIA NACIONAL

9.1.1 Recepción de láminas

Recepciona el 100% de láminas positivas y 10% de láminas negativas de la producción de muestras hemáticas de los laboratorios de referencia regional y realiza la evaluación de control de calidad en cuanto a reproducibilidad diagnóstica y calidad técnica de las láminas enviadas por el nivel regional.

9.1.2 Revisión

Para la revisión de láminas se debe tener en cuenta los siguientes criterios:

9.1.2.1 *Criterios de selección*

Revisa 10% de láminas negativas y selecciona las láminas positivas de acuerdo a los siguientes porcentajes:

- 10% de láminas positivas (+)
- 10% de láminas positivas (++)
- 10% de láminas positivas (+++)
- 100% de láminas positivas menores de +/2.

9.1.2.2 *Criterios de evaluación*

Realiza el control de calidad para evaluar:

- Calidad de reproducibilidad diagnóstica: 10 % de láminas negativas y todas las láminas positivas según criterio de selección.
- Calidad técnica de la muestra en gota y frotis: Revisa 10 % de láminas recibidas y registra los resultados en el formato CCM-2 .

9.1.3 Consolidado

Consolida los resultados de reproducibilidad diagnóstica y calidad técnica de la muestra en el formato CCM-5.

9.1.4 Emisión de resultados

Emite los resultados de control de calidad en el formato CCM-5, en un período no mayor de 3 semanas después de recibir las láminas. Califica, de acuerdo a escalas, la reproducibilidad diagnóstica y calidad técnica de la muestra.

9.2 ACTIVIDADES DEL LABORATORIO DE REFERENCIA REGIONAL, Y LABORATORIOS INTERMEDIOS

9.2.1 Recepción de láminas

Recepciona la producción de muestras hemáticas de sus respectivos laboratorios intermedios y locales al 100 % de láminas positivas y negativas.

9.2.2 Revisión

9.2.2.1 Criterios de selección

- a. Revisa 10% de láminas negativas y 10% de láminas positivas de cada una de las siguientes densidades parasitarias: +, ++, +++ y 100% de láminas positivas cuyas densidades son menores de +/2. Para la revisión de láminas utiliza el formato CCM-2
- b. El personal recién capacitado y aquellos que tengan discordancias mayores al 2%, deberán realizar la revisión de láminas, de acuerdo al siguiente porcentaje:

1 ^{ER} . Trimestre	—————>	100 % de positivas y 100 % negativas
2 ^{DO} . Trimestre	—————>	100 % de positivas y 50 % negativas
3 ^{ER} . Trimestre	—————>	100 % de positivas y 25 % negativas
4 ^{TO} . Trimestre	—————>	100 % de positivas y 10 % negativas

Este esquema debe ser considerado, hasta que el personal evaluado logre superar los porcentajes de discordancias.

9.2.2.2 Criterios de evaluación

El nivel regional realiza el control de calidad técnica para evaluar la calidad de muestra y la calidad de coloración al 10 % de láminas recibidas, registrando los resultados en el formato CCM - 2, lo cual le permite tener un sistema de vigilancia permanente en la calidad diagnóstica de la muestra pudiendo tomar decisiones de realizar supervisiones al nivel local e intermedio, si fuera el caso.

9.2.3 Consolidado

Registra y consolida los resultados de producción y control de calidad de las láminas de cada laboratorio evaluado en la fichas CCM-3.

9.2.4 Emisión de resultados

Remite en forma trimestral al Laboratorio de Referencia Nacional de Malaria el informe de producción y reproducibilidad diagnóstica, en el formato CCM-3. Asimismo, remitirá de manera inmediata los resultados de la calidad técnica de gota gruesa y frotis, así como los de reproducibilidad diagnóstica, a los niveles locales e intermedios de su jurisdicción. Envía en el formato CCM-4 al nivel de referencia nacional la relación del total de láminas.

Cuando existan laboratorios intermedios, estos recibirán, revisarán y consolidarán la información con los mismos criterios del regional. El envío de información a su nivel superior lo hará mensualmente.

9.3 ACTIVIDADES DEL NIVEL LOCAL

9.3.1 Envío de láminas

Todos los laboratorios locales que realicen diagnóstico de malaria enviarán 100 % de positivas y

100% de negativas, separando por grupos de láminas positivas y negativas, acompañado de su informe semanal, en el formato CCM-1.

9.4 RECOMENDACIONES GENERALES PARA EL ENVÍO DE LÁMINAS E INFORME DE RESULTADOS

9.4.1 Del envío de láminas

9.4.1.1 Las láminas al momento del envío deben estar limpias. Para ello, eliminar todo residuo de aceite de inmersión.

9.4.1.2 El embalaje se hará con cartón corrugado y asegurado con pabilo, a fin de evitar su deterioro o rotura.

9.4.1.3 Es aceptable el envío de láminas hacia el nivel inmediato superior con un retraso de hasta una semana para el nivel local e intermedio y de un mes para el nivel de referencia regional .

9.4.2 De la emisión de resultados

9.4.2.1 El nivel de referencia regional emitirá su resultado de control de calidad a los niveles intermedios de su jurisdicción en un tiempo no mayor de quince días después de recibir las láminas.

9.4.2.2 El nivel intermedio emitirá sus resultados en un tiempo de una semana.

9.4.2.3 El nivel de referencia nacional emitirá su resultado de control de calidad al nivel de referencia regional en un tiempo no mayor de 3 semanas después de recibir las láminas.

9.5 CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD TÉCNICA DE LA LÁMINA DE GOTA GRUESA

9.5.1 Calidad óptima de la toma de muestra

9.5.1.1 De la gota gruesa

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

9.5.1.2 Del frotis

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

9.5.2 Calidad óptima de la coloración

Tabla N° 5. Características de la lámina de gota gruesa

DESHEMOGLOBINIZACIÓN	Fondo libre de glóbulos rojos.
TONALIDAD	Coloración del parásito: Núcleo: rojo grosella Citoplasma: azul cielo. Pigmento: amarillo sin brillo. Coloración de leucocitos: Linfocitos: Citoplasma basófilo azul cielo Núcleo: azul oscuro. Gránulos inespecíficos: rojo o azul. Monocitos: Citoplasma gris. Núcleo: azul tenue Neutrófilo: Citoplasma rosado. Núcleo: púrpura. Eosinófilos: Citoplasma rosado. Granulos gruesos, rojo salmón. Basófilos: citoplasma y núcleo color azul . Granulaciones burdas.(grosso)
PRECIPITADO	Ausencia de precipitado de colorante

9.5.3 Calidad del diagnóstico

- 9.5.3.1 La reproducibilidad diagnóstica se determinará revisando y confrontando el diagnóstico emitido por el laboratorio a ser evaluado.
- 9.5.3.2 Se considera error diagnóstico la lámina que siendo positiva o negativa en el nivel evaluado, resulte negativa o positiva en el nivel evaluador (Tabla N° 6).

Tabla N° 6. Ejemplos de errores diagnósticos a la lectura de la lámina.

DIAGNÓSTICO	CONTROL DE CALIDAD	ERROR
<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>	<i>N x P (falso positivo)</i>
<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>P x N (falso negativo)</i>

- 9.5.3.3 Se considera error de especie cuando no presenta concordancia con el diagnóstico positivo de especie reportado por el laboratorio que está siendo evaluado.
- 9.5.3.4 La observación microscópica de la revisión estará en relación directa con la calidad y coloración de la muestra, teniendo que observar como mínimo 100 campos microscópicos en una muestra bien preparada (10 a 20 leucocitos por campo). Si esto no se cumple, se empleará un factor de corrección (FC) cuyo resultado nos indicará el número de campos microscópicos a observar antes de considerar un error de diagnóstico:

$$FC = \frac{6,000}{\text{«X» leucocitos en 10 campos}} \times 0,2$$

9.5.4 Informe de resultados

Los laboratorios del nivel local e intermedio elevarán sus resultados de diagnóstico al nivel inmediato superior en el formato CCM-1. Este a su vez lo realizará utilizando el formato CCM-3 y CCM-4. Adjunto a este informe, se remitirán las láminas para su respectivo control de calidad separando las láminas positivas, negativas y discordantes. Asimismo, enviarán el total de láminas positivas a *P. malarie* y *P. falciparum* (en zonas de baja transmisión de esta especie).

9.5.5 Evaluación

9.5.5.1 El porcentaje máximo tolerable de discordancia es de 2%; cuando sea mayor, deberá realizarse una supervisión directa para detectar las causas de la discordancia y corregirlo, dando sugerencias y pautas para ello.

Escala de calificación:

a.	Reproducibilidad :	98 % - 100 %	→	Bueno
		97 % - 95 %	→	Regular
		menos de 95 %	→	Deficiente
b.	Técnica:	80 % - 100 %	→	Bueno
		70% - 79%	→	Regular
		menos de 70 %	→	Deficiente

9.5.5.2 Para la reproducibilidad y concordancia diagnóstica, se determinará la concordancia y discordancia del total de láminas evaluadas expresado en porcentaje.

$$\text{Calificación por evaluación} = \frac{\text{Puntaje obtenido}}{\text{Puntaje total posible}} \times 100$$

El porcentaje máximo de discordancia aceptable es 2%. Cuando sea mayor deberá realizarse una supervisión directa para detectar las causas de la discordancia y corregirlo, dando sugerencias y pautas para ello.

9.6 SUPERVISIÓN DIRECTA A LOS LABORATORIOS

9.6.1 El laboratorio de referencia regional realizará supervisiones periódicas a los laboratorios intermedios y locales de su jurisdicción que realicen diagnóstico parasitológico de malaria; para evaluar el rendimiento del personal y mantenimiento de microscopios e insumos.

9.6.2 La supervisión es necesaria por las siguientes razones:

9.6.2.1 Confirmar si el trabajo que se está realizando está bien hecho y si el personal ha sido entrenado para ello.

9.6.2.2 Facilitar y corregir errores en el procesamiento.

- 9.6.2.3 Indicar la necesidad de readiestramiento.
- 9.6.2.4 Proveer de una buena oportunidad de conversar con el supervisor de alguna dificultad en el trabajo.
- 9.6.3 Las supervisiones podrán ser semestrales o cuando se requiera, según el resultado de evaluaciones indirectas de control de calidad de muestras hemáticas utilizando el formato de evaluación y supervisión del laboratorio de malaria.
- 9.6.4 El laboratorio evaluador preparará láminas con gran rigurosidad técnica, confirmadas en cuanto a su positividad y negatividad, la que se aplicarán durante la supervisión a los laboratorios.

9.7 TIPOS DE SUPERVISIÓN

9.7.1 Supervisión directa

En la supervisión directa se entrará en contacto con el encargado del control de calidad del diagnóstico parasitológico de malaria a través de una visita por un período prolongado. El supervisor observará su trabajo y analizará las dificultades que tiene; además, se tendrá la oportunidad de discutir aspectos importantes de la ejecución de los procesos, promoviendo soluciones que podrían facilitar la labor del microscopista.

9.7.2 Supervisión indirecta

En la supervisión indirecta se conoce el trabajo del personal a través de las láminas enviadas periódicamente a un laboratorio de referencia para la evaluación técnica de la muestra, coloración y reproducibilidad en el resultado de diagnóstico, proceso que se conoce como control de calidad de gota gruesa.

SECCIÓN X

CULTIVO *in vitro* DE *Plasmodium falciparum*

Los plasmodia pueden desarrollarse y ser mantenidos en el laboratorio en su ciclo asexual en cultivos continuos *in vitro*. La técnica está orientada a la obtención de antígenos para estudios serológicos, sensibilidad de los plasmodia a las drogas antimaláricas y estudios de biología molecular. El mantenimiento y cultivo de plasmodia se realiza en medio RPMI 1640 suplementada con HEPES y enriquecida con suero humano a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de bióxido de carbono y 5% de oxígeno. Los cultivos serán realizados según la técnica descrita por Trager y Jensen (1976) modificado por ellos en 1997.

10.1 EQUIPOS

- 10.1.1 Cabina de flujo laminar
- 10.1.2 Incubadora de CO₂ / O₂
- 10.1.3 Refrigeradora 4°C
- 10.1.4 Congeladora de -20°C
- 10.1.5 Congeladora de -80°C
- 10.1.6 Centrífuga refrigerada
- 10.1.7 Microscopio compuesto
- 10.1.8 Autoclave
- 10.1.9 Horno de 30°C-300°C
- 10.1.10 Grid (accesorio de ocular para recuento de células)
- 10.1.11 Dos contadores manuales para recuento de células

10.2 REACTIVOS

- 10.2.1 Medio RPMI 1640
- 10.2.2 HEPES
- 10.2.3 Bicarbonato de sodio (Na HCO₂)
- 10.2.4 Glutamine : N₂ NCO (CH) (NH₂) COOH
- 10.2.5 Cloruro de sodio (NaCl)
- 10.2.6 Gentamicina
- 10.2.7 Agua bidestilada

10.3 MATERIALES

- 10.3.1 Frascos para cultivo celular o placas Petri
- 10.3.2 Pipeteador mecánico.
- 10.3.3 Filtros de 0,22 μm , para botella con adaptador N° 33 ó sistema de filtro completo de 250 mL y 500 mL de capacidad.
- 10.3.4 Botellas de vidrio graduadas de 250, 500 y 1000 mL de capacidad.
- 10.3.5 Beaker graduados de vidrio o polyacrilamida (de preferencia) de 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 y 5000 mL de capacidad.
- 10.3.6 Láminas portaobjetos con borde esmerilado pavonado.
- 10.3.7 Pipetas graduadas de vidrio o descartables estériles de 1, 2, 5, 10 y 25 mL de capacidad.
- 10.3.8 Pipetas pasteur estériles de punta larga.

10.4 PREPARACIÓN DE MEDIO Y OTROS

10.4.1 RPMI 1640 (Medio incompleto): 1 Litro

RPMI 1640 c/s glutamine	10, 20 g
HEPES	5, 95 g
Bicarbonato de sodio	2, 00 g
Glutamine	0, 30 g
Agua bidestilada	950, 00 mL
Gentamicina (10 mg / mL)	2, 5 mL

Ajustar el pH a 7,36, con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N.

Completar a 1L teniendo en cuenta el hidróxido de sodio (NaOH) empleado, para descontar al final.

Esterilizar por filtración al vacío.

10.4.2 Eritrocitos humanos del grupo "O" (Stock)

- 10.4.2.1 Procedente de donantes.
- 10.4.2.2 Colectar asépticamente con heparina, centrifugar a 2200 r.p.m. y separar el plasma.
- 10.4.2.3 Transferir en frascos de 200 mL, mezclar con igual volumen de medio y guardar a 4°C debidamente rotulado. Esto puede durar de 2 a 3 semanas en óptimas condiciones.

10.4.3 SUERO HUMANO GRUPO "O"

- 10.4.3.1 Colectar dentro de bolsas de sangre sin anticoagulante sangre de donantes que no hayan tenido infección de malaria por *P. falciparum*.

10.4.3.2 Mantener a temperatura ambiente por un período de 3 a 5 horas para retraer el coágulo y centrifugar a 2500 r.p.m. por 10 minutos.

10.4.3.3 Colectar en tubos para centrifuga de 50 mL en cantidades de 25 a 30 mL y guardar a -20°C hasta su uso.

10.4.4 RPMI medio completo

10.4.4.1 Descongelar el suero.

10.4.4.2 Añadir suero al 10%.

10.4.4.3 Guardar en refrigeración a 4°C.

10.4.5 Lavado de glóbulos rojos

10.4.5.1 Desde el stock de glóbulos rojos (frasco de 200 mL) tomar 25 mL y colocarlo en tubo de centrifuga de 50 mL.

10.4.5.2 Centrifugar a 2200 r.p.m. por 5 minutos.

10.4.5.3 Descartar el sobrenadante con una pipeta.

10.4.5.4 Agregar medio incompleto, mezclar cuidadosamente y centrifugar a 2200 r.p.m. por 5 minutos.

10.4.5.5 Descartar el sobrenadante y repetir el paso anterior 2 veces más.

10.4.5.6 Resuspender los glóbulos rojos con medio completo al 50% para evitar su deterioro.

10.4.5.7 Guardar en la refrigeradora.

10.4.6 Recomendaciones

10.4.6.1 Todos los procedimientos deben realizarse dentro de la cabina de flujo laminar.

10.4.6.2 Los frascos o placas deben ser previamente rotulados con el nombre o número de la muestra, la fecha de inoculación de los glóbulos rojos parasitados, así como la lámina portaobjetos empleada para el recuento parasitario.

10.5 PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE PARÁSITOS DE PACIENTES INFECTADOS POR *Plasmodium falciparum*

10.5.1 Extraer sangre venosa en tubos al vacío heparinizados o con EDTA de 10 mL de capacidad. También se puede extraer la sangre con una jeringa de 10 mL conteniendo heparina (200 UI) o ACA (1 mL por 10 mL de sangre).

10.5.2 Transferir la sangre a un tubo cónico graduado de 50 mL y centrifugar a 1500 r.p.m. por 5 minutos.

- 10.5.3 Separar el plasma y guardar en tubos para criopreservación (crioviales) de 1,5 - 2 mL a temperatura de congelación de -70 °C.
- 10.5.4 Lavar el sedimento (glóbulos rojos) con medio RPMI incompleto por 3 veces, centrifugando a 1500 r.p.m. por 5 minutos cada vez. Después de cada lavado retire cuidadosamente la capa de glóbulos blancos por aspiración con una pipeta pasteur.
- 10.5.5 Resuspender los eritrocitos con medio completo hasta obtener un hematocrito final de 5 a 10 %. Esta operación debe realizarse en el material donde se van a cultivar los parásitos, que puede ser en placas petri de 35X10 mm (1,5 mL), 60X15 mm (4 mL) ó 100X15 mm (8 mL). Asimismo, se puede cultivar haciendo uso de los frascos para cultivo celular con cuello inclinado de 25 cm² ó 75 cm² (es lo más recomendable para cultivo en masa).
- 10.5.6 Incubar a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 5% de O₂ en una estufa de CO₂/O₂. Estas condiciones también podrían conseguirse haciendo uso de una campana de anaerobiosis o un desecador colocando una vela prendida en su interior, cerrar la campana o desecador, y luego la vela se apagará generando un ambiente de CO₂.
- 10.5.7 Cambiar el medio cada 24 horas y realizar dos frotices del sedimento (a partir del tercer día de siembra), fijar y teñir para evaluar el porcentaje de parasitemia.
- 10.5.8 Al segundo día de haber realizado el cultivo, agregue eritrocitos humanos grupo "O" no infectados.
- 10.5.9 Cuando la parasitemia llegue al 6% u 8% los cultivos también deberán ser diluidos con eritrocitos no infectados.
- 10.5.10 Los porcentajes de parasitemias mayores de 8% son perjudiciales para el desenvolvimiento normal de los parásitos debido al acúmulo de ellos y a la producción de variaciones de pH en el medio por efectos de su metabolismo.

10.6 CAMBIO DEL MEDIO DE CULTIVO

- 10.6.1 Inclinar el frasco o placa suavemente y extraer el sobrenadante con una pipeta Pasteur.
- 10.6.2 Del sedimento preparar dos láminas con frotis, para evaluar el porcentaje de parasitemia.
- 10.6.3 Añadir medio completo (a temperatura ambiente), el mismo volumen que extrajo del frasco o placa, agitar suavemente para homogeneizar e incubar. Al momento de tapar los frascos estos no deberán ser sellados herméticamente, sino que la tapa quedara ligeramente floja, para que ingrese CO₂ / O₂.
- 10.6.4 Las láminas preparadas deberán fijarse y colorearse para ser observadas en microscopio común y con objetivo de inmersión, para evaluar la parasitemia.

10.7 CRIOPRESERVACIÓN O CONGELAMIENTO DE LOS PARÁSITOS

Las cepas de *Plasmodium falciparum* serán criopreservadas con porcentajes de parasitemias de 2% a 3% y con predominio de formas anulares.

10.7.1 Reactivo de Criopreservación (Para 200 mL):

10.7.1.1	Glicerol	114,20 g
10.7.1.2	Solución de lactato de sodio	4,40 g
10.7.1.3	Cloruro de potasio (KCl)	0,07 g
10.7.1.4	Fosfato monobásico de sodio dihidratado NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	0,15 g
10.7.1.5	Agua bidestilada	100 mL

Mezclar bien y ajustar el pH a 6,8 con hidróxido de sodio 1 N. Ajustar el volumen a 200 mL y esterilizar por filtración con filtro de 0,22 µm.

10.7.2 Procedimiento

- 10.7.2.1 Centrifugar el material de cultivo a 1500 r.p.m por 5 minutos.
- 10.7.2.2 Descartar el sobrenadante y medir el volumen del sedimento.
- 10.7.2.3 Añadir 0,4 volúmenes de la solución criopreservante gota a gota, por cada volumen del sedimento.
- 10.7.2.4 Equilibrar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- 10.7.2.5 Agregar 1,2 volúmenes de la solución criopreservante gota a gota y mezclar cuidadosamente.
- 10.7.2.6 Transferir con una pipeta estéril en tubos para criopreservación rotulados correctamente con el código de la muestra, procedencia y la fecha de criopreservación.
- 10.7.2.7 Guardar los tubos dentro de una caja o bolsa con ranura y guardar a -70°C, por un periodo de 48 horas, luego colocarlos en cajas portacrioviales y seguir guardando a -70°C o en nitrógeno líquido.

10.7.3 Descongelamiento de las cepas

- 10.7.3.1 Introducir la muestra en baño María a 37 °C.
- 10.7.3.2 Medir el volumen de la muestra y colocar en un tubo de centrifuga de 15 mL.
- 10.7.3.3 Agregar gota a gota. 0,9 mL de cloruro de sodio al 12 % (por cada mL de la muestra), mezclar suavemente y equilibrar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- 10.7.3.4 Agregar gota a gota, 6,2 mL de cloruro de sodio al 1,6% (por cada mL de la muestra) y mezclar suavemente.
- 10.7.3.5 Centrifugar a 1500 r.p.m. por 5 minutos.
- 10.7.3.6 Descartar el sobrenadante con una pipeta estéril.
- 10.7.3.7 Lavar nuevamente el sedimento con cloruro de sodio al 1,6% de la misma manera descrita anteriormente.

- 10.7.3.8 Descartar el sobrenadante con una pipeta estéril.
- 10.7.3.9 Agregar medio completo y centrifugar a 1500 r.p.m. durante 5 minutos y descartar el sobrenadante.
- 10.7.3.10 Resuspender los eritrocitos con medio completo para continuar con el cultivo de los parásitos.

10.8 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PARASITEMIA EN FROTIS SANGUÍNEO

- 10.8.1 Los frotices fijados y coloreados con giemsa se examinan con el objetivo de inmersión y empleando dos contadores manuales de células.
- 10.8.2 La parasitemia se determina contando el número de eritrocitos infectados en un grupo de 1000 eritrocitos como mínimo. Si la parasitemia es muy baja (menor de 5%) se contará de 5 000 a 10 000 eritrocitos.
Ejemplo:

Eritrocitos contados	Eritrocitos infectados	Porcentaje de parasitemia
1 000	80	8,0%
10 000	80	0,8%

SECCIÓN XI

DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO DE MALARIA

11.1 GENERALIDADES

El inmunodiagnóstico de malaria abarca métodos que evalúan la inmunidad humoral y celular del huésped. Las metodologías son suficientemente sensibles y específicas para detectar las infecciones en las que la parasitemia es baja, diferenciar infecciones pasadas de la actual, la primoinfección de las recrudescencias y las reinfecciones.

11.1.2 Existen métodos de diagnóstico inmunológico directo e indirecto:

11.1.2.1 **Los métodos de diagnóstico inmunológico directo**, como su nombre lo indica, detectan directamente la presencia del parásito mediante la captura de antígenos del parásito durante la infección, estas fracciones antigénicas representan fracciones específicas de la molécula antigénica. Entre las pruebas que tienen este fundamento podemos mencionar las pruebas inmunocromatográficas (Parasight F®, OptiMAL®, ICT®, PATH®) y pruebas de ELISA directo.

11.1.2.2 **Los métodos de diagnóstico indirecto**, detectan fundamentalmente anticuerpos (también inmunoglobulinas) que se producen en respuesta al estímulo antigénico durante la infección del *Plasmodium* y su desarrollo biológico en el huésped vertebrado. Esta respuesta inmune hace posible el inmunodiagnóstico. La inmunofluorescencia, la prueba de ELISA indirecta, el radioinmunoensayo (RIA) y la fitohemaglutinación indirecta son métodos serológicos que se basan en este fundamento.

11.1.3 En este manual se describirán las siguientes técnicas:

De inmunodiagnóstico indirecto

Prueba serológica de "Inmunofluorescencia Indirecta" (IFI).

De inmunodiagnóstico directo

Pruebas inmunocromatográficas, llamadas también pruebas de diagnóstico rápido o dipstick:

- Parasight F®
- OptiMAL®
- ICT®

11.2 TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

11.2.1 Esta prueba se considera de referencia en el serodiagnóstico y seroepidemiología de malaria, sirve para detectar anticuerpos en los sueros, determinar los títulos de éstos y seguir el curso de su producción. Los antígenos se obtienen de cultivos continuos o sangre de personas que tienen una infección primaria activa, los cuales son fijados en láminas portaobjetos sobre las que se agrega el suero del paciente, que contienen anticuerpos contra el agente etiológico (anticuerpo primario) y que se unirán al antígeno. Esta unión se podrá visualizar mediante un microscopio de fluorescencia utilizando una antinmunoglobulina humana marcada con fluoresceína (anticuerpo secundario).

11.2.2 Es útil en zonas endémicas de malaria para medir el grado de la endemidad, verificar la presencia o ausencia de infecciones maláricas, delimitar zonas maláricas, detectar cambios estacionales de transmisión y evaluar actividades antimaláricas. Asimismo, en zonas no endémicas de malaria puede ser utilizada para seleccionar donantes de sangre.

11.2.3 Es importante mencionar que los antígenos homólogos detectan títulos de anticuerpos en niveles más elevados que los antígenos heterólogos y además proveen información retrospectiva sobre la población.

11.2.4 Requisitos para lograr una prueba de IFI óptima

11.2.4.1 Fuente de antígeno (proporción de esquizonte).

11.2.4.2 Preparación y conservación de antígenos en láminas.

11.2.4.3 Diluyente de los sueros.

11.2.4.4 Calidad de microscopio y fuente de iluminación UV.

11.2.5 Ventajas y desventajas

11.2.5.1 El antígeno obtenido en cultivos es de superior calidad al obtenido en huéspedes infectados.

11.2.5.2 La probabilidad de tener reacciones cruzadas es menor al de otros ensayos como ELISA.

11.2.5.3 Su sensibilidad es de 80 % y su especificidad de 99 %.

11.2.5.4 El título de cohorte es 1/16.

11.2.5.5 Las láminas de inmunofluorescencia que contienen la suspensión antigénica se pueden preservar con un agente desecador y por tiempos prolongados a temperatura ambiente, sin pérdida de la actividad inmunológica.

11.2.5.6 Una limitación para la ejecución del ensayo es la disponibilidad de equipos especializados como microscopios de epifluorescencia, incubadora de CO₂ para cultivo de cepas de *P. falciparum* con objeto de producción de antígeno parasitario para preparación de láminas.

11.2.6 Materiales

11.2.6.1 Frascos de vidrio de 1 L de capacidad.

11.2.6.2 Láminas portaobjetos para IFI (12 excavaciones).

11.2.6.3 Laminillas cubreobjetos.

11.2.6.4 Micropipetas graduadas de: 1 - 10 µL ; 10 - 100 µL ; 100 - 1000 µL.

11.2.6.5 Micropipeta multicanal (8 canales). 10 - 100 µL ; 100 - 1000 µL.

11.2.6.6 Tips.

11.2.6.7 Microplacas de 96 hoyos.

11.2.6.8 Pizetas.

- 11.2.6.9 Papel aluminio.
- 11.2.6.10 Bombillas de jebe.
- 11.2.6.11 Bandejas Coplin.



Figura Nº 32. Materiales utilizados en la técnica de inmunofluorescencia.

11.2.7 Reactivos

11.2.7.1 Antígeno

- a. De *Plasmodium vivax* / *Plasmodium falciparum* y *P. malariae*, obtenidos a partir de sangre de individuos con infección primaria reciente (de preferencia) o a partir de cultivos continuos *in vitro*.
- b. La preparación de láminas impregnadas con los antígenos correspondientes se describen en el Anexo G.

11.2.7.2 Sueros

- a. Suero problema.
- b. Suero control positivo y negativo.

11.2.7.3 Conjugados fluorescentes

- a. Conjugados fluorescentes: Anti IgG, anti IgM, anti Ig totales, marcados con isotiocianato de fluoresceína (debidamente titulado).
- b. Para cada lote de conjugado que inicie se recomienda determinar el título óptimo de uso (Anexo H).

11.2.7.4 Soluciones

- a. Solución salina amortiguadora (PBS).

Cloruro de sodio (NaCl)	8,500 g
Fosfato disódico (NaHP04)	1,280 g
Fosfato monosódico hidratado (NaH ₂ P0 ₄ ·2H20)	0,156 g
Agua destilada	1000 mL

pH de la solución: 7,6
- b. Solución bloqueadora (albúmina bovina al 1 % en PBS)

- c. Glicerina al 10% en PBS
- d. Azul de Evans al 1 % (opcional)
Azul de Evans (Evans Blue) 0,500 g
PBS pH 7,6 50,00 mL

11.2.7.5 Equipos

- a. Estufa de 37°C.
- b. Refrigeradora.
- c. Balanza.
- d. Potenciómetro o cinta para medir el pH de soluciones.
- e. Bandeja para cámara húmeda.
- f. Agitador manual o eléctrico.
- g. Microscopio de inmunofluorescencia.
- h. Reloj.

11.2.8 Procedimiento

- 11.2.8.1 Retirar las láminas con antígeno de la congeladora (-70°C) y dejar secar a temperatura ambiente (Anexo E).
- 11.2.8.2 Cubrir los antígenos con 15 µL de solución bloqueadora (con la finalidad de inactivar reacciones inespecíficas), utilizando una micropipeta graduada y colocarlos en cámara húmeda a temperatura ambiente por 30 minutos.
- 11.2.8.3 Paralelamente a la incubación, realizar las diluciones de los sueros empleando las microplacas ELISA de acuerdo al siguiente esquema: Colocar 75 µL de solución bloqueadora en cada uno de los hoyos y 25 µL de los sueros (controles positivo, negativos y sueros a ensayar) sólo en el primer hoyo, mezclar y pasar 25 µL de la mezcla al segundo hoyo, mezclar y pasar 25 µL al tercer hoyo, y así sucesivamente.
- 11.2.8.4 Lavar las láminas con PBS en una bandeja y sobre un vibrador eléctrico durante 5 a 10 minutos por 3 veces.
- 11.2.8.5 Retirar las láminas y secar cuidadosamente el exceso de PBS con un papel absorbente.
- 11.2.8.6 Tomar 15 µL de cada una de las diluciones (sueros positivos, negativos y muestras a ensayar) con una micropipeta y colocar uno a uno empezando por la concentración más baja. Siga el esquema adjunto (Tabla N°7).
- 11.2.8.7 Incubar las láminas en cámara húmeda a 37°C por 30 minutos.
- 11.2.8.8 Lavar las láminas de acuerdo al ítem 11.2.8.4

- 11.2.8.9 Agregar el conjugado marcado con isotiocianato de fluoresceína previamente titulado conteniendo Azul de Evans (1:1000) diluido en solución bloqueadora utilizando una micropipeta y colocar en cada hoyo 15 μ L de la solución.
- 11.2.8.10 Incubar las láminas de acuerdo al ítem 11.2.8.4 en cámara húmeda a 37°C por 30 minutos.
- 11.2.8.11 Lavar las láminas de acuerdo al ítem 11.2.8.4.
- 11.2.8.12 Colocar el glicerol al 10% en PBS sobre la lámina y cubrir con la laminilla cubreobjetos.
- 11.2.8.13 Examinar al microscopio de fluorescencia con objetivo 40X, ocular 10X y filtro de excitación de 450- 520 nm.

Tabla N° 7. Esquema de diluciones

DILUCION SUEROS		1:4 (1)	1:16 (2)	1:64 (3)	1:256 (4)	1:1024 (5)	1:4096 (6)
Soluc. Bloq.	(μ L)	75	75	75	75	75	75
Control Post.	(μ L)	25	-	-	-	-	-
Mezclar y transf.	(μ L)		25 (1)	25 (2)	25 (3)	25 (4)	25 (5)
Soluc. Bloq.	(μ L)	75	75	75	75	75	75
Control Neg.	(μ L)	25	-	-	-	-	-
Mezclar y transf.	(μ L)	25	25 (1)	25 (2)	25 (3)	25 (4)	25 (5)
Soluc. Bloq.	(μ L)	75	75	75	75	75	75
Muestra problema	(μ L)	25	-	-	-	-	-
Mezclar y transf.	(μ L)		25 (1)	25 (2)	25 (3)	25 (4)	25 (5)

11.2.9 Fallas comunes durante el procesamiento

11.2.9.1 Falsos positivos

- Conjugados mal titulados.
- Reacciones cruzadas entre diferentes especies de plasmodios.
- Presencia de anticuerpos.
- Mezcla de distintos sueros en las láminas por confluencia.
- Presencia de factor reumatoide.

11.2.9.2 Falsos negativos

- Iluminación deficiente del microscopio.
- Conjugados mal titulados.

- c. Sueros controles sin actividad inmunológica.
- d. Conservación inadecuada de los reactivos.

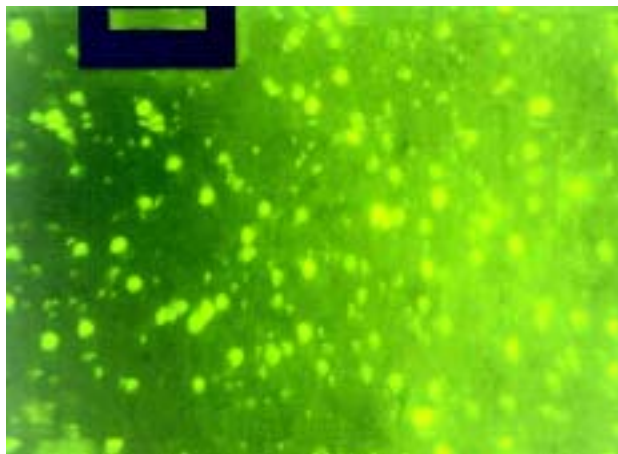


Figura N° 33. Observación microscópica por inmunofluorescencia de una reacción positiva a anticuerpos contra *P. falciparum*.

11.2.10 Observación microscópica

- 11.2.10.1 Rutinariamente las láminas procesadas para observación fluorescente deben ser examinadas al término de la ejecución de la técnica. Si esta ha sido aplicada como se recomendó, la reacción fluorescente debe observarse sólo en el suero control positivo en presencia del antígeno y en los sueros a ensayar que también resulten positivos.
- 11.2.10.2 Como título del suero se considerará la mayor dilución que presente fluorescencia. El suero es negativo cuando no hay fluorescencia.
- 11.2.10.3 Para facilitar la observación microscópica deberá utilizarse una ficha de registro de resultados para prueba IFI, donde se anotarán reacciones positivas como presencia de fluorescencia y reacciones negativas como no fluorescentes, en sus respectivas diluciones de sueros y conjugados.
- 11.2.10.4 Si la observación no pudiera hacerse al término del procesamiento, se pueden guardar las láminas en oscuridad y refrigeración 4°C, hasta realizar la lectura al día siguiente. Considere que con el tiempo la fluorescencia disminuye.

11.3 PRUEBAS RÁPIDAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA

- 11.3.1 Las pruebas rápidas para el diagnóstico malaria denominadas también pruebas inmunocromatográficas o "dipstick", se basan en la detección de antígenos presentes en los parásitos del género *Plasmodium*, mediante reacciones antígeno - anticuerpo que se producen sobre tiras de nitrocelulosa (inmunocromatografía).
- 11.3.2 Estas pruebas consisten en una tira de papel revestida por una membrana de nitrocelulosa, en la cual se han impregnado anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para ciertos antígenos de las cuatro especies del género *Plasmodium* que parasitan al hombre. La reacción anti-

geno- anticuerpo, en presencia del conjugado, expresa la formación de una banda de color que es posible ser visualizada macroscópicamente.

11.3.3 Estas pruebas han sido validadas en diferentes partes del mundo alcanzando niveles de sensibilidad (S) y especificidad (E) óptimos mayores al 90% con relación a la gota gruesa.

11.3.4 La ventaja de esta prueba es fundamentalmente que los procedimientos se pueden ejecutar en un tiempo promedio de 15 a 20 minutos.

11.3.5 Antígenos detectados mediante el uso de pruebas rápidas

11.3.5.1 *Proteína II rica en Histidina (PfHRP-II)*

a. Es una molécula soluble en agua, secretada por los estadios de trofozoitos y gametocitos jóvenes del *Plasmodium falciparum*.

b. Para la reacción antígeno - anticuerpo utiliza un conjugado que contiene sulfonaminas (PATH, parasight) y oro coloidal (ICT), ligadas a un colorante para fijar la reacción.

c. Este antígeno puede seguir circulando en la sangre de la persona hasta por 72 horas después de negativizarse la gota gruesa, fenómeno conocido como antigenemia.

d. En el mercado existen varios kits que utilizan PfHRP-II como fuente de antígeno, entre ellos tenemos: Parasight f, PATH, ICT Pf, ICT Pf/Pv, etc.

11.3.5.2 *Lactato deshidrogenasa (pLDH)*

a. Es una isoenzima glicolítica producida y expresada en altos niveles durante el estadio eritrocítico del parásito, por tanto es producida únicamente por parásitos vivos de las diferentes especies de *Plasmodium*.

b. Esta prueba también utiliza tiras de nitrocelulosa, las cuales contienen un "pool" de anticuerpos de carácter monoclonal dirigidos específicamente hacia una epitope de la pLDH. Esta reacción antígeno - anticuerpo es fijada por la presencia de anti-anticuerpos policlonales contenidos en la solución de conjugado en soportes de liposomas ligados a un colorante que permite la visualización de los resultados.

c. En el mercado existen "kits" que pueden detectar las 4 especies de este género que parasitan al hombre, pero sólo pueden diferenciar *P. falciparum* de los no falciparum, más no distingue entre *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*.

11.3.5.3 Existen también otros antígenos que están presentes en las cuatro especies de *Plasmodium*, que son utilizados en combinación a la detección de la PfHRP II de *P. falciparum*. Estos se denominan "antígenos pan maláricos".

11.3.6 Limitaciones de las pruebas rápidas

11.3.6.1 En el caso de las que detectan HRP-II, son específicas para *P. falciparum*.

- 11.3.6.2 No permiten la cuantificación parasitaria.
- 11.3.6.3 Presenta fenómeno de antigenemia (presencia de HRP-II circulante hasta 72 horas después de que el paciente es gota gruesa negativo a la infección por *P. falciparum*).
- 11.3.6.4 Detecta parasitemias por encima de 100 parásitos / μ L sangre.
- 11.3.6.5 El umbral de detección de estas pruebas disminuyen en parasitemias bajas.
- 11.3.6.6 Presenta reacción cruzada con el factor reumatoideo en el caso de HRP-II, y leishmaniasis en el caso de LDH.
- 11.3.6.7 Detecta antígenos producidos por gametocitos inmaduros, que pueden persistir posteriormente al tratamiento, lo cual puede llevar a una falsa interpretación del resultado.
- 11.3.6.8 El costo varía de \$ 1,50 - 3,00.
- 11.3.6.9 No es posible diferenciar especies entre *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*.
- 11.3.6.10 No detecta infecciones mixtas.

11.3.7 Ventajas de las pruebas rápidas

- 11.3.7.1 Emplea poco tiempo de proceso (entre 10 a 20 minutos).
- 11.3.7.2 Tiene buen porcentaje de especificidad y sensibilidad.
- 11.3.7.3 Muy útil en comunidades rurales donde no se cuenta con microscopio óptico.
- 11.3.7.4 Puede ser usado como prueba confirmatoria de gota gruesa en caso de dudas por falta de entrenamiento del microscopista.
- 11.3.7.5 Son de fácil uso e interpretación y no requieren microscopios ni personal especializado.
- 11.3.7.6 Pueden detectar una infección cuando los parásitos se encuentran secuestrados en los vasos (pLDH).

Tabla N° 8. Investigaciones de pruebas rápidas realizadas por el Instituto Nacional de Salud

AÑO	PRUEBA RÁPIDA	Sensibilidad	Especificidad	ESPECIE	PUBLICACIÓN
1998	Path	97,1 %	97,2 %	P.f	Stanies GM, Marquiño W, Paradve B, Roper M, Cabezas C, Noriega V, et al. Assessment of two immunochromatographic strip test for the rapid diagnosis of <i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i> in Iquitos-Perú. Am J Trop Med Hyg 1998; 59 (Suppl): 112-3.
	OptiMAL FLOW (1era Generación)	97,8 % 89,4 %	93,2 % 99,4 %	P.f P. v	
1999	OptiMAL FLOW (1era Generación)	88,5 %	90,1 %	Pf/Pv	Marquiño W, Cabezas C, Arróspide N, Gutiérrez S, Calampa C, Nappay R, et al. Evaluation of the use of an immunochromatographic rapid test for malaria diagnosis by village health promoters in rural areas of the peruvian amazon. Am J Trop Med Hyg 2000; 62 (Suppl): 278-9.
1999	OptiMAL FLOW (1era Generación)	87,3 % 100,0 %	99,0 % 99,6 %	P.f P. v	Gutiérrez S, Arróspide N, Pardave B. Sensitivity and specificity of rapid immunochromatographic test (OptiMAL) for diagnosis of malaria peruvian coast region. Am J Trop Med Hyg 2001; 65 (Suppl): 319.
2000	ICT Pf/Pv	94,0 % 75,8 %	98,5 % 97,8 %	P.f P. v	Arróspide N, Gutierrez S, Ylquimiche L, Hermeregildo Y, Palacios A, Alva V, et al. Assessment of an immunochromatographic assay (ICT malaria <i>P. falciparum</i> / <i>P. vivax</i>) for diagnosing malaria by health technical personel in three sites in the northern region of Perú. Am J Trop Med Hyg 2001; 65 (Suppl): 319.
2001	OptiMAL Diamed	100,0 %	98,0 %	P.f	Arróspide N, Puray M, Guzmán E, Verano M, Medina del Rosario X, Mendizábal L, et al. Uso de pruebas rápidas para la detección de <i>Plasmodium falciparum</i> en donantes de sangre en Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2002; 19(Supl). S11.
2001	OptiMAL Diamed	90,5 % 92,0 %	97,3 % 99,0 %	Pf P. v	Arróspide N, Puray M, Guzmán E, Verano M, Medina del Rosario X, Mendizábal L, et al. Estudio multicéntrico de DIAMED Optimal para el diagnóstico de <i>P.falciparum</i> y <i>P.vivax</i> en áreas endémicas del Perú-2001. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2002; 19(Supl). S11.

11.4 PRUEBAS EXISTENTES EN EL MERCADO

11.4.1 Prueba que detecta HRPII (ICT® AMRAD Pf/Pv)

11.4.1.1 El ICT® AMRAD Pf/Pv para el diagnóstico de malaria es una prueba rápida de inmunodiagnóstico *in vitro* para la detección de antígenos de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* en sangre entera (Figuras N°34 y N°35).



Figura N° 34. ICT® AMRAD Pf/Pv
Presentación comercial de la tira ICT® AMRAD Pf/Pv

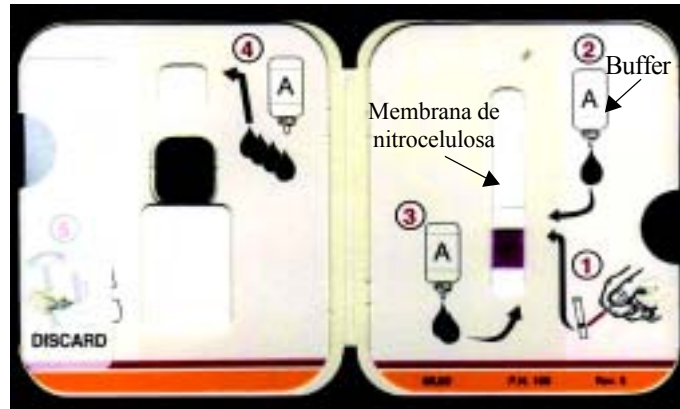


Figura N°35. Partes de la tira de ICT

11.4.1.2 Esta prueba utiliza dos anticuerpos que han sido inmovilizados formando líneas separadas a través de una lámina de test. Un anticuerpo (área de prueba 1) es específico para el antígeno de *P. falciparum* de proteína II, rica en histidina (P.f.HRP II). El otro anticuerpo (área de test 2) es específico para un antígeno de malaria que es común tanto para la especie de *P. falciparum* y *P. vivax*.

c. El procedimiento consiste en aplicar sangre entera (15µL) a una almohadilla de muestra impregnada con anticuerpos agregados a oro coloidal que apuntan a los dos antígenos de malaria (Figura N° 36).

Figura N°36. Procedimientos para realizar la prueba utilizando ICT® AMRAD Pf/Pv (8 pasos)



Abrir la tarjeta y colocarla sobre la mesa.



Obtener sangre del dedo con un capilar.



Aplicar la sangre sobre la almohadilla color lila.



Aplicar una gota del reactivo A por encima de la muestra.



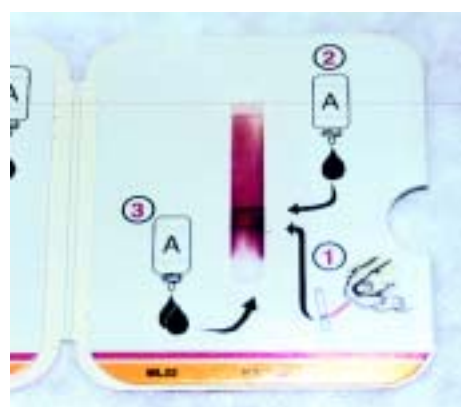
Aplicar 2 gotas del reactivo A por debajo de la muestra.



Dejar que la sangre ascienda a lo largo de toda la columna hasta que llegue a la base de la almohadilla (1 minuto). Para ello invierte la tarjeta.



Aplicar 4 gotas del reactivo A en la almohadilla de la contratapa de la tarjeta.

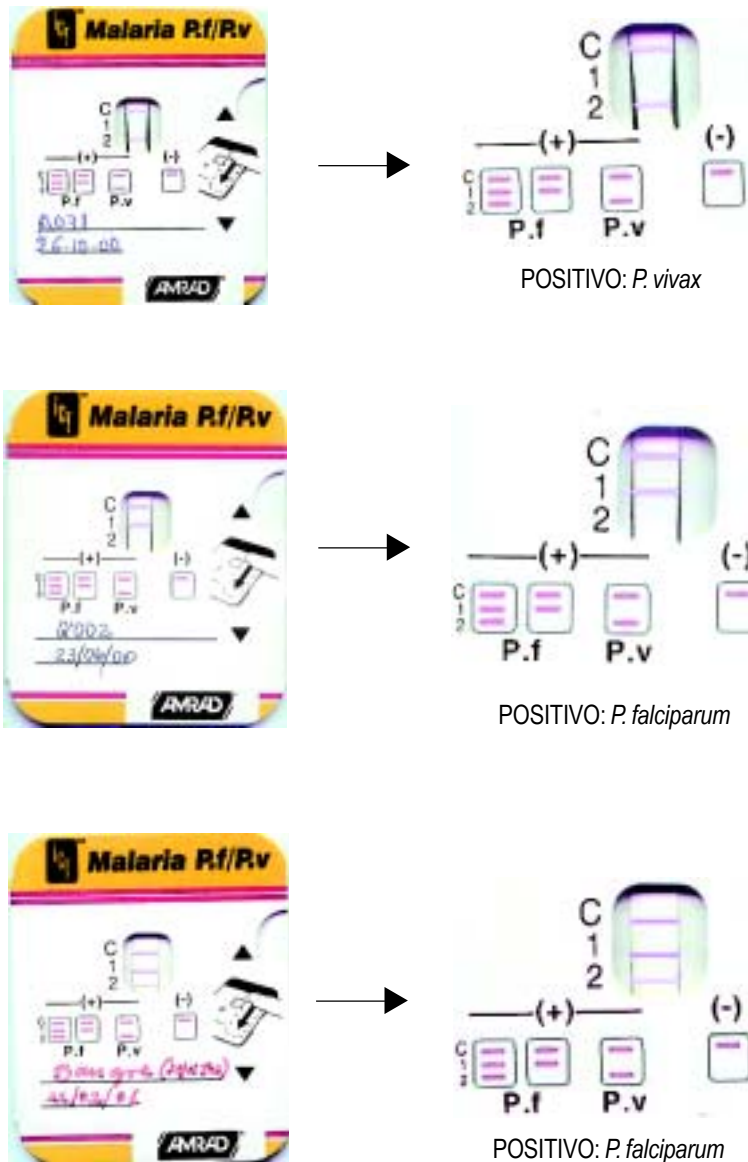


Retirar la cinta adhesiva y cerrar la tarjeta. Espere la visualización de las bandas y anote los resultados.

- d. Cuando se aplica una muestra positiva, los antígenos de malaria se juntan a los anticuerpos adheridos al oro coloidal en la almohadilla, y los complejos inmunes que se forman emigran a lo largo de la lámina de la prueba donde son capturados por los anticuerpos inmobilizados. Una vez que ocurre la captura, se forma una línea rosada en el área 1 y/o 2 de la ventana del test. Estas líneas no se forman cuando se aplica una muestra negativa. Si el test ha sido ejecutado correctamente, en el área C de la ventana del test asomará una línea de procedimiento de control (Figura N° 37).

Figura N° 37. Interpretación





- e. Este kit diagnóstico no necesita refrigeración, sus componentes pueden ser conservados a temperatura medio ambiente.
- f. Entre las limitaciones de la prueba podemos mencionar la incapacidad para especificar infecciones mixtas y el hecho de que puede ser positiva siendo el paciente gota gruesa negativo, esto por el fenómeno de antigenemia propia de la proteína de P.f.HRP2 como en el caso del PATH® y Parasight®.

11.4.2 Prueba que detecta LDH (OptiMAL®)

Es otra prueba inmunológica en estudio basada en la detección de la isoenzima lactato-deshidrogenasa (LDH) del parásito vivo y que puede diferenciar la especie del parásito, *P. falciparum* y *P. vivax*. (Figuras N° 38, N° 39 y N° 40).

Figura N° 38. Procedimientos para realizar la prueba utilizando OptiMAL® (10 pasos)



Coloque un microtubo con conjugado y un microtubo para lavado en porta-tubos.



Dispense una gota del buffer en el microtubo de conjugado y cuatro gotas en el microtubo de lavado y espere un minuto.



Limpie asépticamente la superficie de la piel y pinche el dedo utilizando siempre una nueva lanceta. Deposite la sangre en la pipeta plástica.



Dispense una gota de sangre en el microtubo con conjugado.



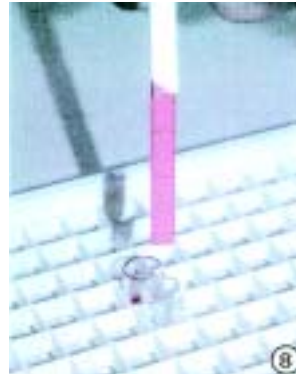
Mezcle suavemente con el extremo sellado de la pipeta y espere un minuto.



Coloque la tira verticalmente en el microtubo con conjugado.



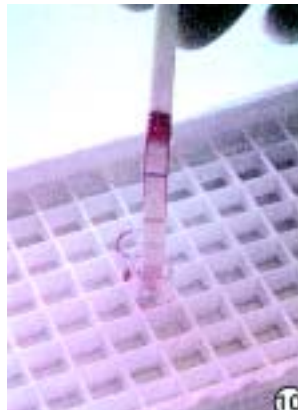
Deje la tira de 10 a quince minutos



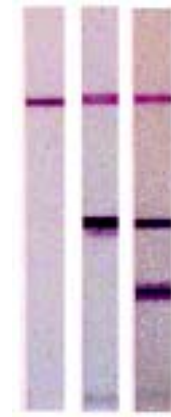
Transfiera la tira del microtubo del conjugado al microtubo para lavado



Deje la tira en el microtubo de lavado hasta que el campo de reacción se aclare (5 - 10 m).



Lea los resultados

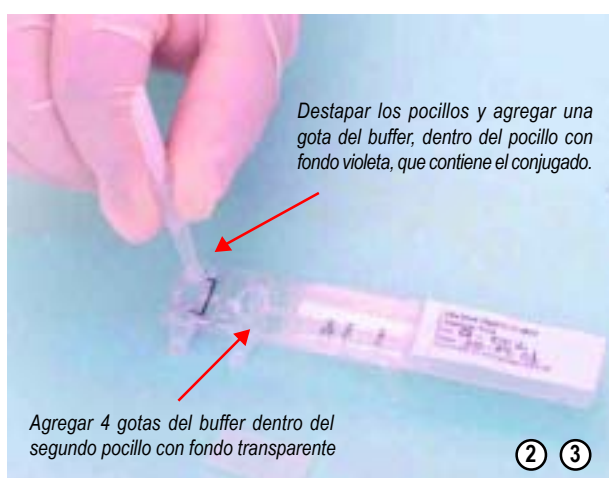


N P.v P.f

Figura N°39. Procedimientos para realizar la prueba utilizando la presentación individual OptiMAL® (11 pasos)

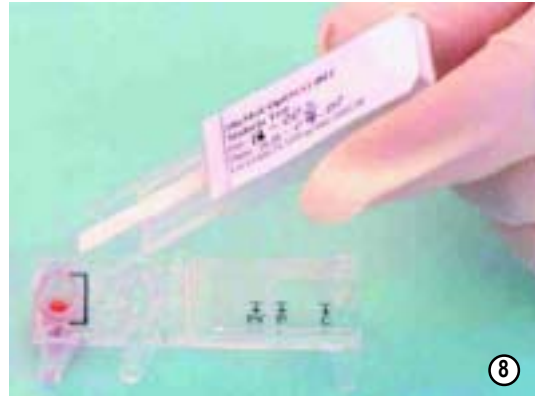


Con un lápiz escribir el código del paciente y la fecha de obtención de muestra





Retirar la tira del estuche.



Introduzca la tira dentro del pocillo que contiene la sangre.



Esperar 10 minutos hasta que la sangre haya migrado por la tira.

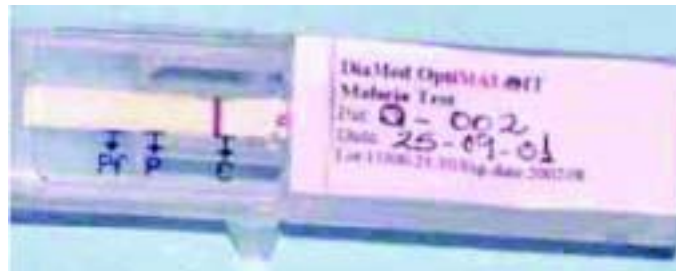


Transferir la tira al pocillo que contiene el reactivo o buffer del lavado.



Tapar los pocillos y eliminarlos, quebrando el estuche por las marcas señaladas.

Figura N° 40. Interpretación de bandas en OptiMAL®



NEGATIVO



P. vivax



P. falciparum

BIBLIOGRAFÍA

1. **Arróspide N, Gutierrez S, Yliquimiche L, Hermeregildo Y, Palacios A, Alva V, et al.** Assessment of an immunochromatographic assay (ICT malaria *P. falciparum* / *P. vivax*) for diagnosing malaria by health technical personnel in three sites in the northern region of Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 65 (Suppl): 319.
2. **Arróspide N, Puray M, Guzmán E, Verano M, Medina Del Rosario X, Mendizábal L, et al.** Uso de pruebas rápidas para la detección de *Plasmodium falciparum* en donantes de sangre en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2002; 19(Supl): 11.
3. **Arróspide N, Puray M, Guzmán E, Verano M, Medina Del Rosario X, Mendizábal L, et al.** Estudio multicéntrico de DIAMED Optimal para el diagnóstico de *P. falciparum* y *P. vivax* en áreas endémicas del Perú-2001. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2002; 19(supl): 11.
4. **Almeida-Filho J.** Prueba sencilla para determinar sulfonamidas en orina. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 1983; 10: 378-9.
5. **Ambroise-Thomas, P.** L'immunofluorescence dans la serologie du paludisme. Ginebra: WHO/MAL; 1981;81.953:1-6.
6. **Beadle C, Long GW, Weiss WR.** Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRPII antigen with a rapid dipstick antigen capture assay. *Lancet* 1994; 343: 564-8.
7. **Fajfar JO, Collins WE, Ristec M.** *In vitro* and *in vivo* adaptation of the Geneva/SGE-1 strain of *Plasmodium falciparum* to growth in a squirrel monkey (*Saimiri Sciureus*) model. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36(2): 221-227.
8. **García J, Ngirabega JD, Soldevila M, Navarro R, Bada JL.** Evolution of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in Rwanda 1985-1987. *Tran R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 490.
9. **Gutiérrez S, Arróspide N, Pardavé B.** Sensitivity and specificity of rapid immunochromatographic test (OptiMAL) for diagnosis of malaria peruvian coast region. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65 (Suppl): 319.
10. **Hall CI, Haynes JD.** Cultured *Plasmodium falciparum* used as in a malaria indirect fluorescent antibody test. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27: 849-52.
11. **Jensen B.** *In vitro* cultivation of malaria parasites. In: W H Mc. Gregor Sir I (eds): *Malaria principles and practices of malariology*. Vol. I. Wernsdorfer. London: Churchill Livingstone. p. 307-29.
12. **Jelinek T, Grobush MP, Schwenke S, Steidl S, Von Sonnenburg F, Nothdurft HD, et al.** Sensitivity and specificity of dipstick tests for rapid diagnosis of malaria in nonimmune travelers. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 721-3.

13. **Lelijld JA; Kortmann H.** The eosin colour tes of Dill an Glazko: a simple field test to detect chloroquine in urine. Bull World Health Org an 1970; 42: 477-479.
14. **Marquiño W, Cabezas C, Arróspide N, Gutiérrez S, Calampa C, Naupay R, et al.** Evaluation of the use of an immunocromatographic rapid test for malaria diagnosis by village health promotorsin rural areas of the peruvian amazon. Am J Trop Med Hyg 2000; 62 (Suppl): 278-9.
15. **Makler MT, Hinrichs DJ.** Measurement of the lactate deshydrogenase activity of *Plasmodium* as an assessment of parasitemia. Am J Trop Med Hyg 1993; 48: 739-41.
16. **Ministerio de Salud.** Doctrina, normas y procedimientos para el control de la malaria en el Perú. Lima: MINSA; 1994.
17. **Najera JA, Liese BH, Hammer J.** Malaria: new patterns and perspectives. Geneva:World Bank; 1992. Technical Paper Number 183. p.7.
18. **Nguyen-DP, Trager W.** Chloroquine resistance produced *in vitro* in a African strain of human malaria. Science 1978; 200: 1397-8.
19. **Nguyen-DP.** Etudes sur la chimiresistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique: donnees actuelles. Anlaes de la Societe Belge de Medecine Tropicale 1985; 65(Suppl 2): 105-13.
20. **Nguyen-DP.** Handling, preservation, storage and transportation of malaria parasites: In: Wernsdorfer W H and Mc. Gregor Sir Y (Eds). Malaria principles and practice of malariology. 1988. London: Churchill Livingstone. p. 1801-11.
21. **Onor E, Payne D, Grab B, Horst HI, Almeida Franco J, Joia H.** Incipient resistance of *Plasmodium falciparum* to chloroquine among a seminmune population of the United Republic of Tanzania. 1. Results of *in vivo* and *in vitro* studies and of and ophthalmological survey. Bull World Health Organ 1982; 60: 77-87.
22. **Organización Mundial de la Salud.** Quimioterapia del paludismo y resistencia a los medicamentos antipalúdicos. Ginebra: OMS; 1973. Serie de Informes Tecnicos Nro 711. p. 30-45
23. **Organización Mundial de la Salud.** Manual para el diagnóstico microscópico de la malaria. 4^{ta} Edición. Ginebra: OMS; 1975. Publicación Científica Nro 276. p. 1-105.
24. **Organización Mundial de la Salud.** Una prueba de captura rápida de antígenos con tiras reactivas para el diagnostico de malaria por *P. falciparum*. Rev Panam Salud Pública 1997; 1:41-7.
25. **Organización Mundial de la Salud.** Evaluación de la eficacia terapéutica de los medicamentos antipalúdicos en zonas de transmisión intensa. Ginebra: OMS; 1996. WHO/MAL/96.1077.
26. **Organización Mundial de la Salud.** Evaluación de la eficacia terapéutica de los medicamentos para el tratamiento del paludismo por *Plasmodium falciparum* sin complicaciones en las Américas. Ginebra: OMS; 1998. OPS/HCP/HCT/113/98.
27. **Payne D.** Practical aspects of the use of the standard WHO *in vitro* macro and microtests systems for the determination of the sensivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, amodiaquine and quinine. Geneva: WHO; 1984. MAP/84.2.

28. **Piper RC, LeBras J, Wentworth L, Hunt-Cooke A, Houze S, Chiodine P, et al.** Immuno- capture diagnostic assay for malaria utilizing *Plasmodium* Lactate Deshydrogenase (pLDH). Am J Trop Med Hyg 1999; 60: 109-18.
29. **Restrepo M.** Resistencia de *P. falciparum* a la sulfadoxina/pirimetamina Congreso Latinoamericano de Parasitología. Ecuador, 1985.
30. **Ricse C.** Evaluacion de la efectividad de la cloroquina y fansidar primaquina en el tratamiento de la malaria por *P. falciparum* en el Valle San Juan de Bigote, Piura. Congreso Peruano de Parasitología y Enfermedades Infecciosas. Trop, 1993.
31. **Rieckmann KH, López FJ.** Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* in Brazil detected by a simple *in vitro* method. Bull World Health Organ 1971; 45: 157-67.
32. **Spenceer HC.** Drug resistant malaria-chasmping patterns mean difficult decisions. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985; 79: 748-58.
33. **Sulzer AJ, Wilson M.** Indirect fluorescent-antibody test for parasitic diseases. Am J Trop Med Hyg 1969; 18: 1999-2005.
34. **Stanies GM, MarquiñoW, Paradavé B, Roper M, Cabezas C, Noriega V, et al.** Assessment of two immunochromatographic strip test for the rapid diagnosis of *P. falciparum* and *P. vivax* en Iquitos Perú. Am J Trop Med Hyg 1998; 59(Suppl): 112-3.
35. **Trager W.** Human malaria parasito in continuos culture. Science 1976; 193: 675.
36. **Valera CV, Shute GT.** Preliminary studies on the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine in the Philippines with the *in vitro* technique Bull WHO 1976; 53: 371-8.
37. **Voller AR.** A microplate method of enzyme linked inmunosorbent assay and application to malaria. Bull World Health Organ 1974: 51: 209-11.
38. **Voller C.** The inmunodiagnosis of malaria. In: Wenrsdorfer W H Mc. Gregor, I. Malaria principles and practice of malariology; 1988. London: Churchill, Livingstone. p. 815-25.
39. **World Health Organization.** Instructions for use of the *in vitro* microtest Kit for the assesment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, sulfadoxine/pyrimetamine and amodiaquine. Geneva: WHO; 1995. MAP/87/2.
40. **World Health Organization.** A rapid dipstick antigen capture assay for the diagnosis of *falciparum* malaria. Geneva: WHO; 1995. WHO/MAL/95.1072.
41. **World Health Organization.** Guidelines for good clinical practice for trials on pharmaceutical products. Geneva: WHO; 1995. WHO Technical Report Series N° 850.
42. **World Health Organization.** New perspectives malaria diagnosis. Geneva: WHO; 2000. WHO/MAL/2000.1091.

ANEXOS

ANEXO A

LIMPIEZA Y ALMACENAJE DE LÁMINAS PORTAOBJETO

A.1 Recomendaciones

- A.1.1 Las láminas portaobjeto a utilizarse en la toma de muestra hemáticas para el diagnóstico de malaria mediante el examen de gota gruesa y el frotis deben ser secadas correctamente antes de ser usadas o almacenadas.
- A.1.2 No poner muchas láminas en el recipiente o lavadero, ya que esto favorece que unas rayen a otras.
- A.1.3 Las láminas limpias deben ser recogidas solamente por los bordes, para evitar dejar sobre su superficie grasa o suciedad de los dedos.
- A.1.4 Es mejor descartar las láminas portaobjetos cuando: tengan coloración iridiscente, estén opacas, presentan rayaduras, rajaduras u otras alteraciones de la superficie.

A.2 LIMPIEZA DE LÁMINAS NUEVAS

- A.2.1 Lavar las láminas con detergente (remojuéndolas durante 30 minutos en agua con detergente).
- A.2.2 Enjuágarlas con agua a "chorro continuo", o cambiando el agua varias veces si se enjuagan en un recipiente.
- A.2.3 Utilizar una esponja para lavar cada lámina en forma individual, secarla luego con un trozo de tela de algodón limpia.

A.3 LIMPIEZA DE LÁMINAS USADAS

- A.3.1 Sumergir las láminas por 60 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (lejía) antes de lavarlas.
- A.3.2 Lavarlas, una por una, con agua jabonosa caliente y frotar ambas caras con un cepillo.
- A.3.3 Limpiar, uno por uno, con una gasa o torunda de algodón.
- A.3.4 Séquelas con un paño limpio de algodón.

Los portaobjetos ligeramente rayados, inservibles para las extensiones sanguíneas, pueden aprovecharse en otros laboratorios.

A.4 ALMACENAMIENTO

Para su almacenamiento se pueden envolver en papel delgado, en conjunto de 10 ó más láminas limpias. Los paquetes así formados se deben guardar en lugares secos (evitando la exposición al polvo y humedad), de donde se tomarán cuando sean necesarias.

ANEXO B

FORMATO: SOLICITUD DE GOTA GRUESA

SOLICITUD DE GOTA GRUESA MALARIA	SOLICITUD DE GOTA GRUESA MALARIA
N°	N°
Localidad.....	Localidad.....
Nombre del paciente.....	Nombre del paciente.....
Procedencia..... Edad.....	Procedencia..... Edad.....
Sexo.....	Sexo.....
Dirección actual	Dirección actual
Diagnóstico..... Control Día de tto.....	Diagnóstico..... Control Día de tto.....
Fecha de toma.....	Fecha de toma.....
Tratamiento y N° de pastillas.....	Tratamiento y N° de pastillas.....
Nombre del solicitante.....	Nombre del solicitante.....
Fecha de examen Resultado.....	Fecha de examen Resultado.....
Laboratorio..... Microscopista	Laboratorio..... Microscopista

ANEXO C

PRECOLORACION DE LA GOTA GRUESA

La precoloración es el tratamiento de la gota gruesa con azul de metileno fosfatado, que se realiza en el campo antes de someterla al proceso completo de coloración. Tiene por objeto procurar una mejor coloración y por ende, facilitar el diagnóstico; además, evita que las láminas que se demoran en el campo se contaminen con hongos, la precoloración debe hacerse no antes de 2 horas ni después de 24 horas de tomada la muestra. Si se hace antes de las dos horas la gota se desprende y se pierde la muestra. Si se hace después de 24 horas la sangre se reseca, la deshemoglobinización se dificulta o la gota se contamina con hongos.

C.1 TÉCNICAS DE LA PRECOLORACIÓN

- C.1.1 Preparar la solución de azul de metileno fosfatado siguiendo las indicaciones del sobre (diluir un gramo en 1/4 de litro de agua destilada). Preparar también el agua amortiguada siguiendo las indicaciones del sobre.
- C.1.2 Las soluciones así preparadas se guardarán cada una en un frasco diferente. La solución azul de metileno podrá ser usada hasta que se observen precipitaciones, de acuerdo al volumen de muestras deshemoglobinizadas, al cabo de las cuales, se desecha y se prepara nuevamente.
- C.1.3 En un vaso verter la solución de azul de metileno en cantidad suficiente de manera que en una lámina en posición vertical sea cubierta la gota gruesa por la solución. Contar "uno", "dos" "tres", (tres segundos), sacarla inmediatamente y hacerla escurrir verticalmente sobre una esponja de plástico o papel absorbente.
Tener la precaución de no dejar el "extendido" del lado en que se encuentra la identificación de la muestra; porque si se mojara esta se perdería.
- C.1.4 En un vaso que contenga agua tamponada, hacer el primer enjuague, introduciendo la lámina hasta que el agua cubra la gota. Mantenerla introducida mientras se cuenta "uno", "dos". Sacarla inmediatamente después y hacerla escurrir nuevamente sobre la esponja de plástico o el papel absorbente.
- C.1.5 En otro vaso que contenga agua tamponada, hacer el segundo enjuague, introduciendo la lámina hasta que cubra únicamente la gota, sucesiva y rápidamente de 5 a 10 veces, inmediatamente después hacerla escurrir, por tercera vez, en la esponja.
- C.1.6 Dejar que seque la gota, colocándola verticalmente en un soporte de madera .

C.2 MÉTODO DE WALKER

- C.2.1 Sumergir la lámina en solución de azul de metileno por dos segundos.
- C.2.2 Eliminar el exceso de colorante enjuagando en agua amortiguadora hasta que los bordes de la muestra se tornen ligeramente gris azulado. El lavado continúa hasta que se elimine el color rojo.
- C.2.3 Secar las láminas en calor suave y envolverlas con su ficha para ser remitida al centro de diagnóstico para la coloración con giemsá.

Azul de metileno fosfatado

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

Mezclar completamente en un mortero seco; disolver un gramo de la mezcla en 300 mL de agua destilada y filtrar en papel filtro N° 4.

Embalaje y envío

- Después de la precoloración, cada lámina o grupo de láminas deben envolverse en el formulario correspondiente de solicitud de diagnóstico de malaria, proporcionado por el Ministerio de Salud.
- Para enviar las muestras al laboratorio correspondiente, se hará un paquete cuidadosamente protegido con cartón y marcando la dirección correspondiente, indicando:
 - Nombre del destinatario.
 - Nombre del remitente.
 - Cantidad de láminas remitidas.

ANEXO D**PREPARACIÓN DE COLORANTES Y SOLUCIONES****D.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN GIEMSA (STOCK)****D.1.1 Fórmula**

Colorante giemsa en polvo, certificado	0,75 g
Alcohol metílico puro (sin acetona)	65,00 mL
Glicerina pura	35,00 mL

* Cantidades para 100 mL de solución "madre".

D.1.2 Procedimiento

Mezclar el giemsa en polvo con el alcohol metílico puro y la glicerina en un balón con perlas de vidrio y agitarlo en círculos fuertemente para conseguir una buena disolución del colorante. Filtrar pequeñas cantidades y experimentar con muestras hemáticas, si los elementos se colorean adecuadamente el colorante está listo para ser filtrado en el papel filtro N° 4 en un embudo hacia un frasco color caramelo.

D.1.3 Recomendaciones

El colorante es un elemento de suma importancia para el diagnóstico parasitológico, por lo tanto, debe ser preparado y almacenado con mucho cuidado. Para ello se deben tomar en cuenta las siguientes indicaciones:

- D.1.3.1 El material de vidrio empleado en su preparación debe estar limpio, seco y sin residuos de detergente.
- D.1.3.2 El material de vidrio para almacenar la solución "madre" debe igualmente estar limpio y seco.
- D.1.3.3 Nunca se debe añadir agua a la solución "madre" del colorante porque produce su completo deterioro.
- D.1.3.4 El frasco de almacenamiento no se debe nunca agitar antes de usar porque suspendería cristales que pudieran encontrarse en el fondo, perjudicando la coloración.
- D.1.3.5 Nunca regrese el colorante no utilizado a las botellas que contengan la solución "madre" por ello es mejor medir las cantidades de acuerdo a la cantidad de muestras.

D.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN: AGUA AMORTIGUADORA**D.2.1 Fórmula**

Ortofosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4)	4 g
Ortofosfato monopotásico (KH_2PO_4)	5 g

D.2.2 Procedimiento

Tomar 1 g de la mezcla de las sales y disolver en 1 litro de agua destilada, agitar y ajustar a pH 7,2

D.2.3 Recomendaciones

Las sustancias amortiguadoras actúan como un elemento químico inactivador de cantidades variables de ácido o álcali. En términos generales la reacción de los diluyentes que habían dado mejores resultados se acercaba al punto de neutralidad (pH 7,0). En la práctica, la escala oscila generalmente entre un pH 6,6 - 7,4 que es por coincidencia, la escala del indicador rojo de fenol.

El ortofosfato disódico y el ortofosfato monopotásico son las sales amortiguadoras que se usan con más frecuencia. En la práctica, se puede preparar rápidamente soluciones amortiguadoras eficaces agregando 1 g de mezcla de sales de sodio y de potasio por cada litro de agua destilada en la proporción de 4:5 ó en cualquier otra proporción que haya resultado satisfactoria. Se mezclan perfectamente dichas sales en las proporciones seleccionadas, se pesa el polvo homogéneo en lotes de un gramo y se puede envolver en papel glasinge o bien disolver en pequeñas cantidades de agua.

Actualmente existen buffers en tabletas para diluir como el BUFFER GURR DE GIBCO.

D.2.4 Preparación de colorante diluido*D.2.4.1 Procedimiento*

Utilizar una probeta de vidrio para diluir el colorante.

Preparar la solución de trabajo diluyendo la solución "madre" 1/10, con agua destilada o solución amortiguadora de pH 7,2 (puede ser reemplazada por agua de lluvia o agua hervida fría).

Solución "madre" giemsa	0,100 mL
Agua destilada	0,900 mL

Una forma sencilla de preparar la dilución es agregando 2 gotas de solución "madre" por mililitro de agua destilada o solución amortiguadora.

D.2.5 Preparación de solución: luz azul cielo

Para el diagnóstico parasitológico de malaria no se puede utilizar luz solar directa debido al principio físico de reflexión de la luz, por esta misma razón se deben descartar focos de vidrio transparente reemplazándolos por los de vidrio esmerilado. Es indispensable el uso de un filtro azul con el objeto de obtener el fondo blanco necesario para la observación de elementos celulares y parásitos.

Quizá una de las mejores adaptaciones es el uso de un balón conteniendo la solución luz azul cielo que hace las veces de filtro.

D.2.6 Fórmula

Agua destilada	c.s.p.	250 mL
Amoniaco		40 mL
Solución de sulfato de cobre al 20 %		8-10 gotas

D.2.7 Procedimiento

Al mezclar los componentes tener la precaución de usar bulbo de jebes para extraer el amoníaco, agitar suavemente y tapar.

D.2.8 Recomendaciones

El exceso de azul es peor que su escasez porque reduce en gran medida la cantidad de luz. Se puede cambiar esta solución conforme a las necesidades. Con frecuencia se puede aclarar una ligera turbidez agregando algunas gotas de ácido acético glacial o amoníaco.

ANEXO E**EVALUACIÓN DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE CLOROQUINA Y SULFAMIDAS****E.1 EVALUACIÓN DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE CLOROQUINA (PRUEBA DE DILL Y GLASKO)****E.1.1 Reactivos**

Eosina (amarillenta)	50 mg
Cloroformo	100 mL
Ácido clorhídrico 1 N	1mL

Pesar 50 mg de eosina (amarillenta) y depositarlo en un pequeño embudo por separado con tapón de vidrio. Añadir 100 mL de cloroformo (con calidad de reactivo) y 1 mL de ácido clorhídrico 1 N y agitar la mezcla manualmente durante unos minutos, hasta que el cloroformo tome un color amarillo claro por dilución de la eosina. Dejar en reposo hasta que se separe la capa de cloroformo que puede pasarse a un frasco color pardo con tapón de vidrio para su conservación.

Procedimiento

Verter 10 gotas de reactivo Dill-Glasco en un pequeño tubo de ensayo de 2 mL de orina y mezclar agitando, enérgicamente, unos minutos. El cambio de color amarillo a rojo- violeta en la capa de cloroformo precipitado indica la presencia de amodiaquina o cloroquina en la orina.

Los resultados obtenidos en esta prueba de coloración son totalmente fiables durante el periodo de 48 horas después del tratamiento.

E.2 EVALUACIÓN DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE SULFAMIDAS (PRUEBA DE BRATTON-MARSHALL MODIFICADA)**E.2.1 Reactivos****E.2.1.1 Reactivo 1:**

Solución de nitrito de sodio, 0,03 mmol/ L ó 0,2 mg/ L ó 0,2% (p/v) en agua destilada.

E.2.1.2 Reactivo 2:

Ácido clorhídrico (concentrado).

E.2.1.3 Reactivo 3:

Solución de Bratton-Marshall: disuélvanse 20 mg de clorhidrato de N-(1-naptil)etileno diamina en 20 mL de agua destilada, agregando 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado.

Los reactivos 1 y 2 son estables a temperatura ambiente. El reactivo 3 es estable durante un mínimo de dos meses si se mantiene a 5°C-10°C en un frasco oscuro.

E.2.2 Procedimiento

E.2.2.1 Con una pipeta se coloca 1 mL de orina en un tubo de ensayo.

E.2.2.2 Se agrega una gota de solución de nitrito sódico (reactivo 1) y 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, y se mezcla con cuidado. Se deja reposar durante un minuto.

E.2.2.3 Se agregan 3 gotas de Bratton-Marshall (reactivo 3) y se mezcla.

E.2.3 La evaluación de la prueba

E.2.3.1 Es positiva para sulfadoxina libre y para otras arilaminas diazotizables cuando la solución adopta un color púrpura persistente.

E.2.3.2 Es negativa si la solución no adopta el color púrpura o si este color desaparece rápidamente y se transforma en un tono verduzco o marrón.

MINISTERIO DE SALUD
 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
 CENTRO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
 LABORATORIO REFERENCIAL DE MALARIA

REGISTRO DE LA CALIDAD TÉCNICA DE GOTAS GRUESAS Y FROTIS DE LOS LABORATORIOS
 CCM-2

Laboratorio revisor: _____ Microscopista: _____
 Doc. referencia: _____ Trimestre: _____ Fecha de ingreso: _____ Fecha de emisión: _____

FECHA DE EVALUAC.	CÓDIGO DE LAB. EVAL.	CÓDIGO DE LAM. EVAL.	DE LA GOTAS GRUESAS					DEL FROTIS			LABORAT. EMISOR		LABORATORIO REVISOR RESULTADO							
			MUESTRA			COLORACIÓN		PP	N	P	R	CONCORD.		DISCORDANCIA						
			Tam	Ubic.	Calid.	Desh.	Ton.					P	N	P	N	P/N	N/P	Sp.		

Tam: Tamaño
 Ubic: Ubicación
 Calid: Calidad
 Desh: Deshemoglobinización
 Ton: Tonalidad
 PP: Precipitado
 Exten: Extendido
 N: Negativo
 P: Positivo
 Sp: Especie
 Concord: Concordancia
 Lab. eval: Laboratorio evaluado
 Lam. eval: Lámina evaluada

**MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE LABORATORIOS EN SALUD PÚBLICA
LABORATORIO REFERENCIAL DE MALARIA**

FORMATO DE RELACIÓN TOTAL DE LÁMINAS

CCM-4

Laboratorio revisor: _____ Trimestre: _____

Microscopista: _____

N° ORDEN	CÓDIGO DE LAB. EVAL.	CÓDIGO DE LÁMINA	RESULTADO LAB. LOC. O INTERMEDIO		RESULTADO LAB. REF.REGIONAL	
			POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO

LAB. EVAL: Laboratorio evaluado
LAB. LOC: Laboratorio local
LAB. REF: Laboratorio referencial

MINISTERIO DE SALUD
 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
 CENTRO NACIONAL DE LABORATORIOS EN SALUD PÚBLICA
 LABORATORIO REFERENCIAL DE MALARIA

RESULTADO DE CONTROL DE CALIDAD DEL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE MALARIA

CCM-5

DOC. REFERENCIA:

LAMINAS RECIBIDAS					
N	POSITIVAS				TOTAL
	P.v.	P.f.	P.m.	Mx.	

LAMINAS REVISADAS						
N	POSITIVAS				TOTAL	% REV.
	P.v.	P.f.	P.m.	Mx.		

RESULTADO			
ERRORES			%
N/P	P/N	Sp.	Error

P.v: *Plasmodium vivax*
 P.f: *Plasmodium falciparum*
 P.m: *Plasmodium malariae*
 Mx: Mixta

P: Positivo
 N: Negativo
 N/P: Negativo por positivo (Falso positivo)
 P/N: Positivo por negativo (Falso negativo)

% REV: Porcentaje de revisadas.
 Sp: Especie

Porcentaje aceptable de discordancia: 2 %

CALIDAD TÉCNICA DE LA MUESTRA

A) DE LA OBTENCIÓN DE MUESTRA (Gota gruesa)

Tamaño:
 Ubicación:
 Calidad:

B) DE LA COLORACIÓN

Deshemoglobinización:
 Tonalidad:
 Precipitado:

C) DEL FROTIS:

Tamaño:
 Ubicación:
 Extendido:

ESCALA DE CALIFICACIÓN

A) DE LA REPRODUCIBILIDAD DIAGNÓSTICA

Bueno: 100 - 98% concordancia
 Regular: 97 - 95 % concordancia
 Deficiente: < 95% concordancia

B) DE LA CALIDAD TÉCNICA

Bueno: 100 - 80%
 Regular: 79 - 70 %
 Deficiente: < 70%

Revisor:

Fecha:

MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
 Centro Nacional de Salud Pública
 División de Parasitología

**FORMATO DE SUPERVISIÓN DEL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE MALARIA
 DEL NIVEL LOCAL**

I. DE LA IDENTIFICACIÓN

Nombre del establecimiento de salud.....
 Región de salud Localidad

Jefe del establecimiento de salud.....
 Responsable de diagnóstico parasitológico de malaria

Nº de supervisión

II. DE LOS ASPECTOS TÉCNICOS

Del personal responsable de diagnóstico
 Capacitado: SI () NO () Fecha:..... Lugar:

Sobre medidas de bioseguridad

Infraestructura

INFRAESTRUCTURA	OBSERVACIONES
Área construida en m ² :..... Área del terreno en m ² :.....	
Iluminación y ventilación: Adecuada [] Inadecuada []	
Abastecimiento de agua: Adecuada [] Inadecuada []	
Desagüe: Regular [] Irregular []	
Luz eléctrica: Regular [] Irregular []	
Material del techo Noble [] Otro []	
Material de las paredes: Noble [] Otro []	
Material del piso: Noble [] Otro..... []	
Instalaciones de gas: Adecuada [] Inadecuada [] Usa balones de gas..... []	
Ubicación de laboratorio: Extrahospitalario [] Intrahospitalario []	
Mobiliario de laboratorio: Adecuada [] Inadecuada [] En implementación []	

En la lista de supervisión los números tienen el siguiente significado:

0= No observado o ausente.

1= Inadecuado.

2= Adecuado.

Actividades que se ejecutan en el espacio asignado:

.....

OBSERVACIONES

.....

I. DEL MANEJO DE MUESTRAS

CRITERIO	EVALUACIÓN		
▫ Cuenta con ambiente apropiado para obtención de muestras	2	1	0
▫ Se utiliza métodos de punción digital recomendadas.	2	1	0
▫ Se observa medidas de bioseguridad en la obtención y manipulación de las muestras.	2	1	0
▫ Los técnicos tienen actitudes adecuadas para atender a los pacientes.	2	1	0
▫ Las láminas son rotuladas correctamente.	2	1	0
▫ Las láminas de gota gruesa son almacenadas bajo condiciones recomendadas para su posterior envío a control de calidad.	2	1	0
▫ Maneja los cuadernos de registro de muestras otorgado por el programa.	2	1	0
▫ Utiliza numeración correlativa.	2	1	0

Ha brindado capacitación en cuanto a obtención de muestras a los promotores o colaboradores voluntarios de salud.....Sí () NO ()

Persona(s) capacitada(s) del establecimiento en obtención de muestras: Sí () NO () Cuantas.....

Criterios de bioseguridad

▫ Se toman medidas de bioseguridad en el caso que el personal tenga heridas en la piel.	2	1	0
▫ El personal de laboratorio utiliza técnicas apropiadas de lavado de manos.	2	1	0
▫ Se observa que el personal use mandil de laboratorio en el área de trabajo.	2	1	0
▫ Se observará que no se ingiera alimentos, no se fume, ni se beba dentro del laboratorio.	2	1	0
▫ Se observará que se utilicen campos descartables sobre la superficie de trabajo.	2	1	0
▫ Existen afiches de bioseguridad en el laboratorio.	2	1	0
▫ Se restringe la entrada al laboratorio sólo al personal autorizado.	2	1	0
▫ Los desechos y el material empleado en los ensayos se eliminan correctamente.	2	1	0
▫ Cuenta con vacuna para hepatitis B.	2	1	0
▫ Cuenta con vacuna para fiebre amarilla.	2	1	0
▫ Existen espacios administrativos.	2	1	0

Del control del funcionamiento y mantenimiento de las instalaciones:

INSTALACIONES			
▫ Las instalaciones eléctricas funcionan correctamente.	2	1	0
▫ Cuentan con estabilizador.	2	1	0
▫ El nivel de iluminación dentro del laboratorio es satisfactorio.	2	1	0
▫ Hay adecuada ventilación en el laboratorio.	2	1	0
▫ La temperatura dentro del laboratorio es $\leq 30^{\circ}\text{C}$.	2	1	0
▫ Los lavaderos y desagües funcionan.	2	1	0
▫ Los grifos funcionan correctamente.	2	1	0
▫ Hay abastecimiento adecuado de agua.	2	1	0

II. DEL MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

Tiene Sí () NO () Cuál(es)? Lo utiliza Sí () NO ()
 Lo utiliza Sí () NO ()

De los formatos que utiliza

Tiene Sí () NO () Lo utiliza Sí () NO () Tipos de formatos

I. DEL ABASTECIMIENTO DE INSUMOS

INSUMOS	ABASTECIMIENTOS DE INSUMOS		
	Malaria (DISA o MINSAs)	Laboratorio intermedio o regional	Otros
Giemsa			
Aceite de inmersión			
Láminas			
Papel lente			
Agua para dilución de giemsa			
Formatos de diagnóstico			
Formatos CCM-1			
Otros			

Observaciones:.....

De las soluciones y colorante:

Conserva adecuadamente la solución stock del colorante giemsa Sí () NO ()

Prepara soluciones o colorantes Sí () NO ()

Cuales..... Utiliza buffers o agua para dilución?.....

Utiliza las varillas de coloración Sí () NO ()

Utiliza probeta de dilución Sí () NO ()

REGISTRO DE LAS MUESTRAS DEL LABORATORIO LOCAL POR SEMANA EPIDEMIOLÓGICA

Semana	P.f.	P.v.	P.m.	Neg	Ctr.	Total	Semana	P.f.	P.v.	P.m.	Neg	Ctr.	Total
01							28						
02							29						
03							30						
04							31						
05							32						
06							33						
07							34						
08							35						
09							36						
10							37						
11							38						
12							39						
13							40						
14							41						
15							42						
16							43						
17							44						
18							45						
19							46						
20							47						
21							48						
22							49						
23							50						
24							51						
25							52						
26							53						
27													

CONSOLIDADO					
Especies	P. f.	P. v	P.m.	Neg	Total
Total hasta la fecha					

Del informe de resultados

Remite láminas de gota gruesa para el control de calidad al nivel de referencia intermedio o regional Sí () NO ()
 Frecuencia..... Existe documentación al respecto Sí () NO ()
 Envía al nivel de referencia regional o Intermedio la relación de láminas con sus resultados en su respectivo formato SI () NO ()

Otros formatos que se utilizan.....
 Supervisa periódicamente a los puestos de salud de su microred Sí () NO ()
 Cuáles?.....
 Frecuencia.....

Referente a equipo:

Microscopio Operativo: Sí () NO ()
 Marca Sí () NO ()
 Código.....
Condiciones de:
 Oculares:.....
 Objetivos:.....
 Carril:.....
 Micrométrico:.....
 Macrométrico:.....
 Fuente de luz:.....
 Mantenimiento, conservación y protección
 Cuenta con programación para su mantenimiento
 Sí () NO () Frecuencia
 Fecha última de mantenimiento.....

Referente a equipo:

Microscopio Operativo: Sí () NO ()
 Marca Sí () NO ()
 Código.....
Condiciones de:
 Oculares:.....
 Objetivos:.....
 Carril:.....
 Micrométrico:.....
 Macrométrico:.....
 Mantenimiento, conservación y protección
 Cuenta con programación para su mantenimiento
 Sí () NO () Frecuencia
 Fecha última de mantenimiento.....

Tipo de aceite de inmersión que utiliza.....Viscosidad.....

OTROS EQUIPOS

.....

CONTROL DE CALIDAD DEL DIAGNÓSTICO DEL LABORATORIO LOCAL

Muestras de diagnóstico supervisadas

DEL DIAGNÓSTICO:

LAMINAS REVISADAS						RESULTADO			
N	P.v.	P. f.	P.m.	M.x.	TOTAL	ERROR			%
						N/P	P/N	Especie	ERROR

Calificación:

P.v. *Plasmodium vivax*
 P.f. *Plasmodium falciparum*
 P.m. *Plasmodium malariae*

N: Negativo
 INS: Instituto Nacional de Salud
 Mx. Mixta

DE LA CALIDAD TÉCNICA:

- A) **De la obtención de muestra**
Tamaño:.....
Ubicación:.....
Calidad:.....

- B) **De la coloración**
Deshemoglobinización.....
Tonalidad.....
Precipitado.....

Escala de calificación:

- De la reproducibilidad diagnóstica:**
Bueno: 100% – 98%
Regular: 97% -95 %
Deficiente: < 95%

- De la calidad técnica**
Bueno: 100% – 80%
Regular: 79% – 70%
Deficiente: <70%

- C) **Del frotis**
Tamaño
Ubicación
Extendido

DE LOS PROBLEMAS

.....
.....
.....
.....
.....
.....

RECOMENDACIONES

Readiestramiento en el diagnóstico parasitológico de malaria

- Obtención de muestras ()
Coloración ()
Diagnóstico del *Plasmodium* ()
Diferenciación de especies ()
Utilización de formatos ()
Canalización de información ()

Sobre microscopio

- Mantenimiento ()
Limpieza ()
Reparación ()

Fecha:.....

Hora:.....

.....
Firma del supervisor
Nombre

.....
Firma del supervisado
Nombre

MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
 Centro Nacional de Salud Pública
 División de Parasitología

**FORMATO DE SUPERVISIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE CALIDAD DE MALARIA
 DEL NIVEL REGIONAL**

I. DE LA IDENTIFICACIÓN

Nombre del establecimiento de salud.....
 Región de salud..... Localidad.....
 Jefe del laboratorio regional :.....
 Responsable de diagnóstico parasitológico de malaria:.....
 N° de Supervisión.....

II. DE LOS ASPECTOS TÉCNICOS

Del personal responsable de diagnóstico
 Capacitado: SI () NO () Fecha:.....

Sobre medidas de bioseguridad

Infraestructura

INFRAESTRUCTURA	OBSERVACIONES
Área construida :.....m ²	
Área del terreno :.....m ² .	
Iluminación y ventilación: Adecuada [] Inadecuada []	
Abastecimiento de agua: Adecuada [] Inadecuada []	
Desagüe: Regular [] Irregular []	
Luz eléctrica: Regular [] Irregular []	
Material del techo Noble [] Otro []	
Material de las paredes: Noble [] Otro []	
Material del piso: Noble [] Otro..... []	
Instalaciones de gas: Adecuada [] Inadecuada [] Usa balones de gas..... []	
Ubicación de laboratorio: Extrahospitalario [] Intrahospitalario []	
Mobiliario de laboratorio: Adecuada [] Inadecuada [] En implementación []	

En la lista de supervisión los números tienen el siguiente significado:

0= No observado o ausente.

1= Inadecuado.

2= Adecuado.

Actividades que se ejecutan en el espacio asignado:

.....

OBSERVACIONES:

.....

I. DEL MANEJO DE MUESTRAS

CRITERIO	EVALUACIÓN		
□ Cuenta con ambiente para la obtención de muestras	2	1	0
□ Se utilizan métodos de punción digital recomendadas.	2	1	0
□ Se observan medidas de bioseguridad en la obtención y manipulación de las muestras.	2	1	0
□ Los técnicos tienen actitudes adecuadas para atender a los pacientes.	2	1	0
□ Las láminas son rotuladas correctamente.	2	1	0
□ Las láminas de gota gruesa son almacenadas bajo condiciones recomendadas para su posterior envío a control de calidad.	2	1	0
□ Maneja los cuadernos de registro de muestras otorgado por el programa.	2	1	0
□ Utiliza numeración correlativa.	2	1	0

Ha brindado capacitación en cuanto a obtención de muestras a los promotores o colaboradores voluntarios de salud.....Sí () NO ()

Persona (s) capacitada(s) del lab. regional en obtención de muestras..... Sí () NO () Cuántas.....

Criterios de bioseguridad

□ Se toman medidas de bioseguridad en el caso que el personal tenga heridas en la piel.	2	1	0
□ El personal de laboratorio utiliza técnicas apropiadas de lavado de manos.	2	1	0
□ Se observa que el personal use mandil de laboratorio en el área de trabajo.	2	1	0
□ Se observará que no se ingiera alimentos, no se fume, ni se beba dentro del laboratorio.	2	1	0
□ Se observará que se utilicen campos descartables sobre la superficie de trabajo.	2	1	0
□ Existen afiches de bioseguridad en el laboratorio.	2	1	0
□ Se restringe la entrada al laboratorio sólo al personal autorizado.	2	1	0
□ Los desechos y el material empleado en los ensayos de eliminan correctamente.	2	1	0
□ Cuenta con vacuna para hepatitis B.	2	1	0
□ Cuenta con vacuna para fiebre amarilla.	2	1	0
□ Existen espacios administrativos.	2	1	0

Del control del funcionamiento y mantenimiento de las instalaciones:

INSTALACIONES			
□ Las instalaciones eléctricas funcionan correctamente.	2	1	0
□ Cuentan con estabilizador.	2	1	0
□ El nivel de iluminación dentro del laboratorio es satisfactorio.	2	1	0
□ Hay adecuada ventilación en el laboratorio.	2	1	0
□ La temperatura dentro del laboratorio es $\leq 30^{\circ} \text{C}$.	2	1	0
□ Los lavaderos y desagües funcionan.	2	1	0
□ Los grifos funcionan correctamente.	2	1	0
□ Hay abastecimiento adecuado de agua.	2	1	0

II. DEL MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

Tiene Sí () NO () Cuál?..... Lo utiliza Sí () NO ()

De los formatos que utiliza

Tiene Sí () NO () Lo utiliza Sí () NO () Tipos de formatos

I. DEL ABASTECIMIENTO DE INSUMOS

INSUMOS	ABASTECIMIENTOS DE INSUMOS		
	Malaria (DISA o MINSA)	Laboratorio intermedio o regional	Otros
Giemsa			
Aceite de inmersión			
Láminas			
Papel lente			
Papel higiénico			
Agua para dilución de Giemsa			
Formatos de diagnóstico			
Formatos CCM-1			
Otros			

Observaciones:
.....
.....

De las soluciones y colorantes:

Conserva adecuadamente la solución stock del colorante Giemsa Sí () NO ()

Prepara soluciones o colorantes Sí () NO ()

Cuales..... Utiliza Buffers o agua para dilución?.....

Utiliza las varillas de coloración Sí () NO ()

Utiliza probeta para dilución del colorante Sí () NO ()

Nº DE MUESTRAS TOMADAS EN EL LABORATORIO REGIONAL PARA DIAGNÓSTICO

MUESTRAS	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	TOTAL
Positivas													
Negativas													
Total													

VI. SOBRE EL CONTROL DE CALIDAD

Nº de personas que ejecutan el control de calidad:

LAM. EVALUADAS POR EL LAB. REGIONAL	I TRIMESTRE 2002	II TRIMESTRE 2002	III TRIMESTRE 2002	IV TRIMESTRE 2002
Láminas positivas				
Láminas negativas				
Láminas discordantes				
Total				

De las normas técnicas para el control de calidad de malaria

Tiene SI () NO () Cuál?..... Lo utiliza Sí () NO ()

Nº DE MUESTRAS EVALUADAS EN LA SUPERVISIÓN

LÁMINAS REVISADAS POR LAB. REGIONAL						LÁMINAS REVISADAS POR INS						RESULTADO			
N	P.v.	P.f.	P.m.	M.x.	TOTAL	N	P.v.	P.f.	P.m.	M.x.	TOTAL	ERROR			% Error
												N/P	P/N	Especie	

P.v. *Plasmodium vivax* Mx. Mixta
P.f. *Plasmodium falciparum* LRRCUSCO: Laboratorio de Referencia Regional del Cusco
P.m. *Plasmodium malariae* INS: Instituto Nacional de Salud

CALIDAD TÉCNICA DE LA MUESTRA

A) DE LA OBTENCIÓN DE MUESTRA (Gota gruesa)

Tamaño:
Ubicación
Calidad:

B) DE LA COLORACIÓN

Deshemoglobinización:
Tonalidad:
Precipitado:

C) DEL FROTIS

Tamaño:
Ubicación:
Extendido:

ESCALA DE CALIFICACIÓN

A) DE LA REPRODUCIBILIDAD DIAGNÓSTICA

Bueno: 100 – 98% concordancia
Regular: 97 – 95% concordancia
Deficiente: < 95% concordancia

B) DE LA CALIDAD TÉCNICA

Bueno: 100 – 80%
Regular: 79 – 70%
Deficiente: < 70%

Del informe de resultados

Remite láminas de gota gruesa para el control de calidad al nivel de referencia nacional Sí () NO () Frecuencia.....
Existe documentación al respecto Sí () NO ()

Envía relación de láminas con resultados de control de calidad a sus niveles inferiores en su respectivo formato Sí () NO ()

Frecuencia de entrega de resultados a su nivel inmediato inferior (intermedios o locales):

Otros formatos que se utilizan.....

Supervisa periódicamente a los establecimientos de salud de su jurisdicción Sí () NO ()

Cuáles?.....

Frecuencia.....

Referente a equipo

Microscopio operativo: Sí () NO ()

Marca Sí () NO ()

Código.....

Condiciones de:

Oculares:.....

Objetivos:.....

Carril:.....

Micrométrico:.....

Macrométrico:.....

Fuente de luz:.....

Mantenimiento, conservación y protección

Cuenta con programación para su mantenimiento

Sí () NO () Frecuencia

Fecha última de mantenimiento.....

Referente a equipo:

Microscopio operativo: Sí () NO ()

Marca Sí () NO ()

Código.....

Condiciones de:

Oculares:.....

Objetivos:.....

Carril:.....

Micrométrico:.....

Macrométrico:.....

Mantenimiento, conservación y protección

Cuenta con programación para su mantenimiento

Sí () NO () Frecuencia

Fecha última de mantenimiento.....

Tipo de aceite de inmersión que utiliza.....Viscosidad.....

OTROS EQUIPOS:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

DE LOS PROBLEMAS

.....
.....
.....
.....
.....

RECOMENDACIONES

Readiestramiento en el diagnóstico parasitológico de malaria

- Obtención de muestras ()
- Coloración ()
- Diagnostico del *Plasmodium* ()
- Diferenciación de especies ()
- Utilización de formatos ()
- Canalización de información ()

Sobre microscopio

- Mantenimiento ()
- Limpieza ()
- Reparación ()

Fecha:.....

Hora.....

.....
Firma del supervisor
Nombre

.....
Firma del supervisado
Nombre

ANEXO G

PREPARACIÓN DE LOS ANTÍGENOS

Se obtienen buenos resultados cuando se utiliza sangre con parasitemia mínima del 1% y predominio de esquizontes.

G.1 OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS DE *P. falciparum* y *P. vivax* DE SANGRE HUMANA PARASITADA

G.1.1 Preparar un extendido de sangre completa y teñir con coloración giemsa para contar el número de hematíes parasitados por campo.

G.1.2 Recoger la sangre con anticoagulante (heparina 200 UI para 10 mL ó 1 mL de ACD para 10 mL).

G.2 PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS DE *P. vivax*

G.2.1 Después de colectar la sangre, se centrifuga a 1500 rpm por 5 minutos.

G.2.2 Se separa el plasma y la capa de leucocitos. Esta operación se debe realizar cuidadosamente dado que los glóbulos rojos parasitados están inmediatamente por debajo de la capa de leucocitos.

G.2.3 Lavar los glóbulos rojos 3 veces por centrifugación a 1500 r.p.m. 5 minutos en volúmenes de PBS 10 veces mayores que el volumen de sedimento de hematíes.

G.2.4 Resuspender las células en PBS a su volumen original, colocar varias gotas de la suspensión en dos láminas con una micropipeta, secar y colorear por el método giemsa para determinar el N° de esquizontes por campo (Se recomienda 20 - 30 para determinar esquizontes por campo con objetivo de 40). Lo ideal 2000 parásitos/hoyo.

Cuando el número de esquizontes es muy alto se diluyen las células con PBS y si el número de esquizontes es muy bajo, concentrar por centrifugación y retirar el exceso de PBS.

G.2.5 Depositar 5 µL de la suspensión obtenida en cada hoyo de la lámina.

G.2.6 Secar las láminas a temperatura ambiente o con una secadora de cabello frío, en la opción de aire frío.

G.2.7 Guardar las láminas a - 70°C en un ambiente libre de humedad, después de envolver individualmente con papel absorbente y luego en grupos de diez láminas con papel aluminio o en bolsas de plástico sellado conteniendo silica gel.

G.3 PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS DE *P. falciparum* DE CULTIVO *in vitro*

Se obtienen buenos resultados con cultivos en medio RPMI 1640, sincronizados y con alta densidad de esquizontes cuyo procedimiento se detalla en capítulo "CULTIVOS". Se emplea el mismo proceso para la preparación de antígeno de *P. vivax* con sangre humana parasitada.

G.4 SINCRONIZACIÓN

Este procedimiento es empleado para obtener esquizontes (método en masa) para la preparación de antígenos utilizados en las pruebas serológicas.

G.5 REACTIVOS**G.5.1 Solución de gelatina**

G.5.1.1	RPM1 1640	10,2 g
	HEPES	5,9 g
	Agua destilada	1000,0 mL

G.5.1.2 Tomar 192 mL de solución (paso 1) disolver 2,0 gr de gelatina en una botella de vidrio en baño María con agitador a 60°C.

G.5.1.3 Estabilizar a temperatura ambiente y esterilizar por filtración con filtro 0,22 µm (micropore).

G.5.1.4 Agregar 8 mL de NaHCO₃ al 5% para completar a 200 mL.

G.6 PROCEDIMIENTO

G.6.1 Centrifugar el material de cultivo en tubo de centrifuga de 50 mL a 1500 r.p.m por 10 minutos.

G.6.2 Descartar el sobrenadante.

G.6.3 Medir el volumen del sedimento con una pipeta y hacer una suspensión al 20 % con medio completo, mezclar cuidadosamente.

G.6.4 Agregar el mismo volumen de la solución de gelatina (Ej. Si la suspensión es de 15 mL, entonces agregar 15 mL de solución de gelatina, mezclar y distribuir a tubos de centrifuga a 15 mL: 5 mL en cada tubo, colocar la tapa rosca y girar la tapa sin cerrar completamente.

G.6.5 Incubar a 37°C por 30 minutos.

G.6.6 Colectar cuidadosamente el sobrenadante en tubos de centrifuga de 50 mL y centrifugar a 1500 r.p.m. por 10 minutos.

G.6.7 Descartar cuidadosamente el sobrenadante, preparar con el sedimento dos extendidos fijar y secar para colorear con giemsa y observar a 100X la presencia de esquizontes.

G.6.8 Lavar las células (sedimento) con PBS a 1500 r.p.m. por 10 minutos.

G.6.9 Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 10 mL de PBS.

G.6.10 Preparar dos láminas con 3 gotas de 50 µL de la suspensión cada una, secar, colorear con giemsa y observar con objetivo de 40 para ver la concentración de esquizontes. La concentración ideal es de 20-30 esquizontes por campo.

G.6.11 Si la concentración es alta se diluye con PBS y si es baja se concentra centrifugando y separando el sobrenadante.

ANEXO H

TITULACIÓN DEL CONJUGADO

Cada vez que utilice un nuevo lote de antígeno y conjugado tendrá que ensayar o estandarizar los parámetros de cada reactivo.

La titulación se realiza en bloque utilizando diluciones crecientes del conjugado contra diluciones crecientes de sueros positivos y negativos conocidos.

Como título del conjugado se considerará la dilución que proporcione la máxima sensibilidad y especificidad.

H.1 PROCEDIMIENTO

- H.1.1 Seguir los pasos del procedimiento de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), hasta paso 9.
- H.1.2 Diluir el conjugado a evaluar en solución bloqueadora conteniendo 0,01 mgr % del azul de Evans en 2 diluciones inferiores y 2 superiores a la dilución del conjugado que indica el fabricante.
- H.1.3 Diluir el suero positivo hasta dilución N°12 en solución bloqueadora en proporción doble y depositar para la reacción en forma alternada. Igualmente diluir sueros negativos hasta la dilución N°3, depositar en forma consecutiva.
- H.1.4 Preparar las láminas con antígenos para cada dilución de conjugado a ensayar. (Paso 2:5 láminas).
- H.1.5 Seguir el mismo proceso de incubación descrito en el procedimiento de la técnica IFI (paso 2) y lavados (paso 4).
- H.1.6 Efectuar la lectura anotando intensidad de fluorescencia en cada reacción.
- H.1.7 Como título de la prueba se considerará la mayor dilución que presente fluorescencia nítida en toda la superficie del parásito. En las reacciones negativas los plasmodia no presentan fluorescencia.

H.2 DILUCIÓN DEL CONJUGADO

Nro. Tubo	1	2	3	4	5
Sol. bloqueadora	350 µl	180 µl	180 µl	180 µl	180 µl
Conjugado	25 µl	-	-	-	-
Evans blue	40 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Transferencia	-	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Dilución	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256

H.3 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se considerara el título óptimo aquel donde se observe fluorescencia fuerte y nítida en toda la superficie del parásito.

Al momento de titular se debe tener en cuenta: Lote conjugado.
Fecha de expiración
Fecha de titulación.

ARTES Y DISEÑOS LASER S.R.Ltda.

Calle Las Turquesas 269-265,263
Balconcillo

Lima 13 - Perú
Telf.: 265-8320 Telefax: 266-0075

Tiraje: 3000 ejemplares
Setiembre de 2003

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
SEDE CENTRAL**

Cápac Yupanqui N° 1400, Jesús María
Lima 11, Apartado N° 451

Telf.: (51-1) 471 9920 - Fax: (51-1) 471 0179

E-mail: postmaster@ins.gob.pe

■ Página Web: www.ins.gob.pe